



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y
Molecular de Plantas

TESIS DOCTORAL

**Homeostasis de Na⁺ y K⁺ mediante transportadores
de Na⁺ de tipo HKT1 y su papel en la tolerancia del
tomate a la salinidad**

Noelia Jaime Pérez

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA
FUNDAMENTAL Y DE SISTEMAS**

Director: Dr. Andrés Belver Cano



Granada, 2018

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Noelia Jaime Pérez
ISBN: 978-84-9163-830-8
URI: <http://hdl.handle.net/10481/50918>

UNIVERSIDAD DE GRANADA
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN,
CSIC, GRANADA

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y
Molecular de Plantas

**Homeostasis de Na⁺ y K⁺ mediante transportadores de Na⁺ de tipo
HKT1 y su papel en la tolerancia del tomate a la salinidad**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la Licenciada en Biología, Noelia Jaime Pérez, para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada, en el Programa de Doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas.

La doctoranda, Noelia Jaime Pérez y el director de la Tesis, Andrés Belver Cano, garantizamos, al firmar la presente Tesis Doctoral, que este trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la supervisión del director de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, para su realización, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Director/es de la Tesis

Doctorando/a

Fdo.: Dr. Andrés Belver Cano
Científico Titular del CSIC

Fdo.: Noelia Jaime Pérez

Granada, febrero de 2018

FINANCIACIÓN

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el **Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas**, de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Granada, en el Grupo de Investigación de Homeostasis Iónica y Transportadores de Membrana.

Dicho trabajo ha sido posible gracias a una ayuda predoctoral para la **Formación de Personal Investigador (BES-2011-046906)**, a los **Proyectos de Plan Nacional AGL2010-17090 y AGL2013-41733-R**, cofinanciados con fondos FEDER y a dos ayudas para la realización de **Estancias Breves en otros Centros I+D (EEBB-I-13-06904 y EEBB-I-14-08682)**, todos ellos financiados por el **Ministerio de Economía, Industria y Competitividad**, así como al **Proyecto de Excelencia CVI-7558**, financiado por la **Junta de Andalucía**.

Las Estancias Breves se realizaron en 2013 en el **Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas** de la Universidad Politécnica de Madrid (España) y en 2014 en el *Australian Centre for Plant Functional Genomics* de la Universidad de Adelaida (Australia), bajo la supervisión de la **Dra. Rosario Haro** y el **Prof. Matthew Gilliam**, respectivamente.

PROYECTO COFINANCIADO POR FEDER



MINISTERIO
DE ECONOMÍA, INDUSTRIA
Y COMPETITIVIDAD



Unión Europea
Fondo Europeo de
Desarrollo Regional



PUBLICACIONES Y CONGRESOS

Parte de los resultados presentados en esta Memoria de Tesis Doctoral han sido incluidos en las siguientes publicaciones, reuniones y/o congresos nacionales e internacionales:

PUBLICACIONES:

- Jaime-Pérez N, Pineda B, García-Sogo B, Atares A, Athman A, Byrt CS, Olías R, Asíns MJ, Gilliam M, Moreno V and Belver A (2017) **The sodium transporter encoded by the *HKT1;2* gene modulates sodium/potassium homeostasis in tomato shoots under salinity.** *Plant Cell & Environment* **40**: 658-671.
- Asíns MJ, Villalta I, Aly MM, Olías R, Álvarez De Morales P, Huertas R, Li J, Jaime-Pérez N, Haro R, Raga V, Carbonell EA and Belver A (2013) **Two closely linked tomato *HKT* coding genes are positional candidates for the major tomato QTL involved in Na⁺/K⁺ homeostasis.** *Plant Cell & Environment* **36**: 1171-1191.
- Belver A, Olías R, Cagnac O, Aranda-Sicilia MN, Gálvez FJ, Ortega AP, Jaime-Pérez N, Aboukila A, Gaspar MI, Sánchez ME, Venema K and Rodríguez-Rosales P (2013) **Microscopy to study ion homeostasis and membrane transporters. 30 years of (e-) microscopy at the EEZ in images.** Editors: Antonio Jesús Castro López and Juan de Dios Alché Ramírez. *Published by the Plant Reproductive Biology Research Group, Estación Experimental del Zaidín*, pp 13-14. (ISBN 13: 978-84-616-7277-6)

CONGRESOS:

- Jaime-Pérez N, Pineda B, García-Sogo B, Ortega AP, Olías R, Atares A, Asins MJ, Moreno V and Belver A (2016) **Role of *HKT1*-like Na⁺ transporters in tomato salt tolerance.** *VIII Reunión de Biología Molecular de Plantas (RBMP)*, 22-24 junio de 2016, Oviedo.
- Jaime-Pérez N, Athman A, Byrt C, Gilliam M, Roy S, Olías R, Asíns MJ and Belver A (2015) **Localization of genes involved in K⁺/Na⁺ homeostasis in tomato by in situ PCR.** *VISCEA, Plant Abiotic Stress Tolerance III*, 29 Junio-1 Julio de 2015, Viena.
- Jaime-Pérez N, Gálvez FJ, Olías R, Ortega AP, Pérez-Tienda J, Granum E and Belver A (2015) **Functional relationship between *SOS1* and *HKT1*-like transporters in long distance Na⁺ transport in tomato plants under saline conditions.** *XXI Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal, XIV Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal*, 14-17 Junio de 2015, Toledo.
- Pérez-Tienda J, Curado C, Sánchez-Gallardo R, González-Cañas G, Jaime-Pérez N, Traverso JA, Cano C, Bago A and Belver A (2015) **Molecular basis of K⁺/Na⁺ homeostasis in arbuscular mycorrhizal plants under saline conditions.** *XXI Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal, XIV Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal*, 14-17 Junio de 2015, Toledo.
- Clemente S, Maldonado Á, Vilchez P, Pérez E, López A, Jaime-Pérez N, Olías R, Belver A. (2014) **Can we produce tomatoes with a pinch of salt? (Or how to reduce the negative impact of water and soil salinity on cultivated tomato)** *3rd Congress PIISA (Proyecto de Iniciación a la Investigación e Innovación en Secundaria en Andalucía), Facultad de Farmacia, Universidad de Granada (UGR)*, 22 Mayo de 2014, Granada.

- Asíns MJ, Villalta I, Olías R, Álvarez De Morales P, Huertas R, Jaime-Pérez N, Haro R, Raga V, Carbonell EA and Belver A (2013) **HKT genes could underlie a major tomato QTL for shoot Na^+/K^+** . *Environment Workshop "Genomic, Physiological and Breeding Approaches For Enhancing Drought Resistance In Crops"*, Universidad Internacional de Andalucía (UNIA), Septiembre de 2013, Baeza, Jaén.
- Belver A, Venema KM, Olías R, Cagnac O, Ortega A, Gálvez FJ, Abushamsiya K, Aboukila A, Jaime-Pérez N, Fernández TA and Rodríguez-Rosales P (2012). **Na^+ and K^+ transporters involved in ionic homeostasis under saline conditions in Arabidopsis and Tomato.** *V Reunión de la Red de Estrés Abiótico de Plantas (REAP)* CEBAS-CSIC, 19-21 Septiembre de 2012, Murcia.

ÍNDICE

INDEX

ÍNDICE	1
INDEX	1
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	7
INDEX OF FIGURES AND TABLES.....	7
I. RESUMEN	17
I. ABSTRACT	25
II. INTRODUCCIÓN.....	31
II. INTRODUCTION	31
I1. LA SALINIDAD DE LOS SUELOS: CONCEPTO, IMPACTO GLOBAL Y CAUSAS	33
I1.1. CONCEPTO DE SALINIDAD	33
I1.1.1. Suelos salinos o <i>white alkali</i>	33
I1.1.2. Suelos sódicos o <i>black alkali</i>	33
I1.1.3. Suelos salino-sódicos	34
I1.2. IMPACTO GLOBAL DE LA SALINIDAD	34
I1.2.1. Problemática de la salinidad en la agricultura.....	35
I1.3. CAUSAS DE LA SALINIDAD.....	36
I1.3.1. Causas naturales: salinidad primaria	37
I1.3.2. Causas humanas: salinidad secundaria	37
I1.4. POSIBLES SOLUCIONES A LA PROBLEMÁTICA DE LA SALINIDAD	37
I1.4.1. Mejora de las prácticas de cultivo	38
I1.4.2. Mejora de la tolerancia de las plantas a la salinidad.....	39
I2. RESPUESTAS DE LAS PLANTAS FRENTE AL ESTRÉS SALINO.....	39
I2.1. SUSCEPTIBILIDAD DE LAS PLANTAS AL ESTRÉS SALINO	39
I2.2. EFECTOS DE LA SALINIDAD EN LAS PLANTAS	41
I2.2.1. Estrés hídrico	41
I2.2.2. Toxicidad iónica	43
I2.2.3. Perturbación de la nutrición mineral	44
I2.2.4. Estrés oxidativo	44
I3. MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS IÓNICA	46
I3.1. TRANSPORTADORES IMPLICADOS EN LA HOMEOSTASIS DE SODIO Y POTASIO.....	46
I3.1.1. Entrada de Na ⁺ a través de la raíz	49
I3.1.2. Eflujo de Na ⁺ : SOS1.....	54
I3.1.3. Compartimentación vacuolar de Na ⁺ : NHX1	56
I3.1.4. Transporte de Na ⁺ larga distancia: SOS1 y HKT	61
I3.2. OTROS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA TOLERANCIA A LA SALINIDAD	66
I3.2.1. Producción de osmolitos	66
I3.2.2. Producción de ROS	69
I4. TRANSPORTADORES HKT: IMPORTANCIA Y FUNCIÓN	70
I4.1. FILOGENIA DE LOS TRANSPORTADORES HKT	70
I4.1.1. Subfamilia I (<i>HKT1-like</i>): implicados en la detoxificación de Na ⁺	74

14.1.2. Subfamilia II (<i>HKT2-like</i>): regulados por K ⁺	75
14.1.3. Subfamilia III (<i>HKT3-like</i>): no regulados por K ⁺ ni por Na ⁺	76
14.2. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS TRANSPORTADORES HKT	77
14.2.1. Selectividad iónica de los transportadores HKT	77
14.3. FUNCIONES DE HKT EN LA TOLERANCIA DE LAS PLANTAS A LA SALINIDAD	82
15. EL TOMATE COMO PLANTA MODELO EN ESTUDIOS DE SALINIDAD...	84
15.1. DESCRIPCIÓN DEL TOMATE CULTIVADO (<i>S. LYCOPERSICUM</i>)	85
15.1.1. Taxonomía y características del tomate	85
15.1.2. Importancia agronómica del tomate	86
15.1.3. El tomate como planta modelo en la investigación de los mecanismos de tolerancia a la salinidad	89
15.2. ESPECIES SILVESTRES DEL TOMATE COMO FUENTE DE VARIABILIDAD GENÉTICA	91
15.2.1. Taxonomía y características de <i>S. cheesmaniae</i>	93
15.3. MEJORA DE LA TOLERANCIA DEL TOMATE A LA SALINIDAD	94
15.3.1. La mejora clásica en el cultivo del tomate	94
15.3.2. La ingeniería genética en el cultivo del tomate	95
16. AVANCES EN LA GENÉTICA MOLECULAR DEL ESTRÉS SALINO	98
16.1. TÉCNICAS GENÉTICAS ENFOCADAS A LA MEJORA DE LA TOLERANCIA AL ESTRÉS SALINO	98
16.1.1. Mapeo de loci de rasgos cuantitativos (<i>QTL mapping</i>)	99
16.1.2. Análisis de mutantes	100
16.1.3. Expresión heteróloga en levaduras	100
16.1.4. Silenciamiento génico postranscripcional	102
III. OBJETIVOS	107
III. OBJECTIVES	111
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	115
IV. MATERIAL AND METHODS	115
M1. MATERIAL BIOLÓGICO	117
M1.1. BACTERIAS	117
M1.1.1. Cepas bacterianas utilizadas	117
M1.1.2. Cultivo de bacterias	117
M1.1.3. Obtención de células competentes de <i>E.coli</i>	118
M1.1.4. Transformación de <i>E.coli</i>	119
M1.1.5. Obtención de células competentes de <i>A. tumefaciens</i>	119
M1.1.6. Transformación de <i>A. tumefaciens</i>	119
M1.2. LEVADURAS	120
M1.2.1. Cepas de levadura utilizadas	120
M1.2.2. Cultivo de levaduras	120
M1.2.3. Transformación de levaduras	121
M1.3. MATERIAL VEGETAL	122
M1.3.1. Plantas de tomate utilizadas	122
M1.3.2. Plantas de <i>Arabidopsis</i> utilizadas	133

M2. MÉTODOS GENERALES DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	137
M2.1. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA MEDIANTE PCR.....	137
M2.1.1. Oligonucleótidos cebadores	138
M2.1.2. DNA polimerasas	141
M2.2. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA	142
M2.2.1. Extracción y purificación de DNA en geles de agarosa	143
M2.2.2. Ligación y subclonado del producto de PCR	143
M2.2.3. Digestión de DNA con enzimas de restricción.....	143
M2.2.4. Subclonado en vectores de expresión de levaduras y plantas	144
M2.3. SECUENCIACIÓN DEL DNA Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	144
M2.3.1. Secuenciación del DNA	144
M2.3.2. Análisis bioinformático de las secuencias	145
M2.4. PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA PLASMÍDICO.....	146
M2.4.1. Minipreparaciones de DNA plasmídico.....	146
M2.4.2. Cuantificación de DNA plasmídico	146
M2.4.3. Plásmidos utilizados	146
M3. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE PLANTAS	147
M3.1. PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE ADN Y ARN DE PLANTAS	147
M3.1.1. Extracción de DNA genómico.....	147
M3.1.2. Purificación y análisis de RNA	147
M4. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE TRANSPORTADORES HKT1 EN LEVADURAS	151
M4.1. MINIPREPARACIONES DE DNA PLASMÍDICO PARA LEVADURAS	151
M4.2. CLONAJE EN LEVADURAS	151
M4.2.1 Clonaje <i>in vivo</i>	152
M4.3. TEST DE COMPLEMENTACIÓN (DROP-TEST)	153
M4.4. ENSAYOS DE TRANSPORTE DE CATIONES EN LEVADURAS.....	154
M4.4.1. Método de la depleción.....	155
M4.4.2. Método de la filtración.....	156
M5. GENÉTICA REVERSA MEDIANTE SILENCIAMIENTO GÉNICO ESTABLE DE HKT1 EN TOMATE (RNAi)	156
M5.1. CONSTRUCCIONES GÉNICAS <i>iHPRNA</i>	157
M5.2. TRANSFORMACIÓN DE COTILEDONES DE TOMATE	159
M5.3. REGENERACIÓN DE PLANTAS A PARTIR DE LOS COTILEDONES TRANSFORMADOS.	161
M5.4. SELECCIÓN DE LÍNEAS SILENCIADAS DE TOMATE (GENOTIPADO, SEGREGACIÓN Y OBTENCIÓN DE LÍNEAS HOMOZIGOTAS)	163
M5.4.1. Test de segregación y obtención de líneas homocigotas	164
M5.5. RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE SEMILLAS DE PLANTAS TRANSFORMADAS.	165
M6. GENÉTICA REVERSA EN ARABIDOPSIS MEDIANTE MUTAGÉNESIS INSERCIONAL DE T-DNA EN EL GEN <i>AtHKT1</i>	165
M6.1. INSERCIONES DE T-DNA.....	166

M6.2. SELECCIÓN DE MUTANTES DE <i>ARABIDOPSIS</i> (GENOTIPADO, SEGREGACIÓN Y OBTENCIÓN DE LÍNEAS HOMÓZIGOTAS).....	167
M6.3. RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE SEMILLAS.....	169
M7. EVALUACIÓN DE FENOTIPOS.....	170
M7.1. DETERMINACIÓN DEL PESO FRESCO Y PESO SECO	170
M7.1.1. Determinación del peso fresco y peso seco en plantas de tomate.....	170
M7.1.1. Determinación del peso fresco y peso seco en plantas de <i>Arabidopsis</i>	170
M7.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN SODIO Y POTASIO	170
M8. LOCALIZACIÓN TISULAR DE LA EXPRESIÓN DE GENES <i>HKT1</i> DE TOMATE.....	171
M8.1. TÉCNICA DE PCR <i>IN SITU</i>	171
V. RESULTADOS	175
V. RESULTS	175
R1. ANÁLISIS MOLECULAR DE <i>SLHKT1;1</i> Y <i>SLHKT1;2</i> Y EXPRESIÓN FUNCIONAL EN LEVADURAS	177
R1.1. AISLAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE CDNA DE <i>SLHKT1;1</i> Y <i>SLHKT1;2</i>	177
R1.2. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE CDNA DE <i>SLHKT1;1</i> Y <i>SLHKT1;2</i>	177
R1.3. EXPRESIÓN GÉNICA DE <i>SLHKT1;1</i> Y <i>SLHKT1;2</i> EN DIFERENTES TEJIDOS DE TOMATE	183
R1.4. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS TRANSPORTADORES <i>SLHKT1;1</i> Y <i>SLHKT1;2</i> EN LEVADURA	183
R2. <i>HKT1;1/HKT1;2</i> COMO GENES CANDIDATOS RESPONSABLES DE UN QTL MAYORITARIO QUE DETERMINA LA CONCENTRACIÓN DE SODIO Y POTASIO EN LA PARTE AÉREA DE TOMATE.....	184
R2.1. DATOS GENÉTICOS PREVIOS: LOCALIZACIÓN GENÉTICA DE <i>SLHKT1;1</i> Y <i>SLHKT1;2</i> EN EL CROMOSOMA 7 EN POBLACIONES DE <i>CHEESMANIAE</i> Y <i>PIMPINELLIFOLIUM</i> . ANÁLISIS DE QTLs	185
R2.2. ANÁLISIS MOLECULAR DE <i>SC/SLHKT1;1</i> Y <i>SC/SLHKT1;2</i> Y EXPRESIÓN FUNCIONAL EN LEVADURAS	189
2.2.1. Análisis de las secuencias de las variantes alélicas de <i>Sl/ScHKT1;1</i> y <i>Sl/ScHKT1;2</i> en las líneas NILs de tomate	189
2.2.2. Análisis funcional de las variantes alélicas de <i>Sl/ScHKT1;1</i> y <i>Sl/ScHKT1;2</i> en levaduras	194
R2.3. FENOTIPOS DE TOLERANCIA A LA SALINIDAD Y EXPRESIÓN GÉNICA DE <i>HKT1; 1</i> Y <i>HKT1; 2</i> EN NIL17 Y NIL14.....	198
R2.4. ANÁLISIS FUNCIONAL DE <i>SC/SLHKT1;1</i> Y <i>SC/SLHKT1;2</i> IN PLANTA MEDIANTE SILENCIAMIENTO GÉNICO POR RNAi.	202
R2.4.1. Selección de líneas silenciadas de tomate. Genotipado de plantas T ₀ de tomate mediante PCR.....	203
R2.4.2. Análisis de expresión de plantas T ₀ de tomate mediante RT-qPCR	204
R2.4.3. Estudio de segregación de plantas T ₁ seleccionadas de tomate.....	204

R2.4.4. Fenotipado de plantas silenciadas de tomate	208
R2.5. ANÁLISIS FUNCIONAL COMPARATIVO DE MUTANTES <i>HKT1;1</i> EN <i>ARABIDOPSIS</i>	215
2.5.1. Selección de líneas mutantes <i>hkt1;1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> . Genotipado de plantas de <i>Arabidopsis</i> mediante PCR.....	215
2.5.2. Análisis de expresión de <i>AtHKT1;1</i> en las líneas <i>athkt1,1</i>	217
2.5.3. Estudio de segregación de plantas de <i>Arabidopsis</i>	218
2.5.4. Fenotipado de plantas mutantes de <i>Arabidopsis</i> en función de su tolerancia al estrés salino.....	220
R3. COORDINACIÓN DE <i>SLSOS1</i> Y <i>SLHKT1</i> EN EL TRANSPORTE DE SODIO Y POTASIO A LARGA DISTANCIA.....	224
R3.1. LOCALIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES HKT1 Y SOS1 MEDIANTE RT-PCR <i>IN SITU</i>	225
R3.2. EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>HKT1;1</i> Y <i>HKT1;2</i> EN LINEAS SILENCIADAS <i>SLSOS1</i>	227
VI. DISCUSIÓN	229
VI. DISCUSSION.....	229
D1. <i>HKT1;1</i> Y <i>HKT1;2</i> SON DOS GENES DE TOMATE QUE CODIFICAN A SENDOS TRANSPORTADORES ESPECÍFICOS DE SODIO DE LA SUBFAMILIA 1 DE HKT	231
D2. <i>HKT1;1</i> Y <i>HKT1;2</i> DE TOMATE SE EXPRESAN ESPECIFICAMENTE EN LOS HACES VASCULARES	233
D3. <i>HKT1;1</i> Y/O <i>HKT1;2</i> PODRÍAN SER RESPONSABLES DE LA AGRUPACIÓN DE QTLs MAYORITARIOS IMPLICADOS EN LA HOMEOSTASIS DE NA⁺/K⁺ EN LA PARTE AÉREA, SEGÚN UN ANÁLISIS DE GENES CANDIDATOS EN DOS POBLACIONES DE RILs Y DE EXPRESIÓN GÉNICA EN DOS NILs DE TOMATE.....	234
D3.1. <i>HKT1;1</i> Y/O <i>HKT1;2</i> SON GENES CANDIDATOS POSICIONALES DE LA AGRUPACIÓN DE QTLs MAYORITARIOS QUE CONTROLAN LA HOMEOSTASIS DE NA ⁺ /K ⁺	234
D3.2. EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA TAMBIÉN SUGIERE A <i>HKT1;1</i> Y/O <i>HKT1;2</i> COMO GENES RESPONSABLES DE LA AGRUPACIÓN DE QTLs QUE CONTROLAN LA HOMEOSTASIS DE NA ⁺ /K ⁺	236
D4. PAPEL DE <i>HKT1;1</i> Y <i>HKT1;2</i> EN EL CONTROL DEL QTL MAYORITARIO IMPLICADO EN LA HOMEOSTASIS DE NA⁺/K⁺ EN LA PARTE AÉREA DE TOMATE	242
D4.1. LA EXPRESIÓN GÉNICA DE <i>HKT1;1</i> JUEGA UN PAPEL SECUNDARIO EN LA HOMEOSTASIS DE NA ⁺ /K ⁺ DE LA PARTE AÉREA DE TOMATE	242
D4.2. LA HOMEOSTASIS DE NA ⁺ /K ⁺ EN LA PARTE AÉREA DEL TOMATE SE REGULA PRINCIPALMENTE POR EL TRANSPORTADOR DE NA ⁺ CODIFICADO POR EL GEN <i>HKT1;2</i>	244
D5. PERSPECTIVAS Y OBSERVACIONES FINALES	248
VII. CONCLUSIONES	249
VII. CONCLUSIONS	253

VIII. BIBLIOGRAFÍA	257
VIII. BIBLIOGRAPHY	257
IX. APÉNDICES	285
IX. APPENDICES	285
APÉNDICE 1.....	287
APÉNDICE 2.....	295

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INDEX OF FIGURES AND TABLES

FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figure I1. Global salt-affected soils, by type and severity (based on data from <i>Harmonized World Soil Database -HWSD-</i>)	35
Figure I2. Map of saline and sodic soils in the European Union	36
Figure I3. Diversity in the salt tolerance of various species, shown as increases in shoot dry matter after growth in solution or sand culture containing NaCl for at least 3 weeks, relative to plant growth in the absence of NaCl	40
Figure I4. Growth response of different species to salinity after 1-6 months at high Cl ⁻	41
Figure I5. General overview of salt stress effects on plants	42
Figure I6. The growth response to salinity stress occurs in two phases: a rapid response to the increase in external osmotic pressure (osmotic phase), and a slower response due to the accumulation of Na ⁺ in leaves (ionic phase).	44
Figure I7. Main intracellular sites of ROS generation under salt stress	45
Figure I8. Schematic representation of membrane transport proteins: channels, transporters and pumps.	47
Figure I9. Schematic representation of Na ⁺ and K ⁺ homeostasis in higher plants under salt stress	48
Figure I10. Pathways for Na ⁺ uptake by the root.....	50
Figure I11. Schematic representation of Na ⁺ uptake (and K ⁺ efflux) in a classical glycophyte cell via Na ⁺ and/or K ⁺ transporters and channels under salt stress	53
Figure I12. Signaling diagram of root hydraulic conductivity (<i>L_p</i>) regulation under various stress conditions.....	54
Figure I13. Transport proteins that facilitate intracellular Na ⁺ homeostasis at high Na ⁺ levels.....	56
Figure I14. Structural model of the plant V-ATPase.....	58
Figure I15. Plant response to abiotic stress.....	68
Figure I16. Phylogenetic tree of fungal TRK and plant HKT transporters	71
Figure I17. Phylogenetic analysis of HKT transporters in higher plants.....	72
Figure I18. A sequence alignment of the four putative selectivity pore-forming regions (p-loops: P _A to P _D) of plant HKT and yeast TRK proteins that are available in public databases	73
Figure I19. HKT structure and location of specific amino acids that were shown to affect the transport properties when mutated.....	78
Figure I20. Model of cation trapping and selection of plant HKTs	80
Figure I21. Appearance of tomato plant showing its different parts	86
Figure I22. Tomato production around the World	88

Figure I23. Appearance of <i>S. cheesmaniae</i> plant showing its different parts.....	94
Figure I24. Plasma membrane and organellar <i>S. cerevisiae</i> transporters contributing to the potassium and pH homeostasis	102
Figure I25. Current model of RNA-mediated gene silencing in plants.	104
Figure I26. A typical T-DNA plasmid for the expression of intron hairpin RNAs (ihpRNAs)	105

MATERIAL Y MÉTODOS

Figure M1. Experiment of tomato plants growing in 0.75 liter pots with cocopeat as inert substrate	126
Figure M2. Experimental design of tomato plants grown in 0.75-liter pots with cocopeat.	127
Figure M3. Experiment of tomato plants growing in hydroponic system.....	128
Figure M4. Experimental design of tomato plants grown in 2.5 liters buckets with 1/4x Hoagland solution modified for hydroponic system.....	129
Figure M5. Experiment of tomato plants growing in Petri dishes (24x24 cm) with 1/4x Hoagland solution.....	131
Figure M6. Experimental design of tomato plants grown in large Petri dishes (24x24 cm) with 1/4x Hoagland solution	131
Figure M7. Primary transformants of tomato plants growing in <i>in vitro</i> culture vessels with RM medium (Table M25), in a growth chamber under the same conditions indicated for Petri dishes.....	132
Figure M8. Escheme for the propagation of tomato primary transformants.....	132
Figure M9. Sulfadiazine (5.25 g/l) resistant <i>Arabidopsis</i> plants moved to seedbeds containing vermiculite: peat-moss (1:1) at the rate of one plant per seedbed.....	135
Figure M10. <i>Arabidopsis</i> plants growing under non-transpiring conditions.....	136
Figure M11. Experimental design of <i>Arabidopsis</i> lines grown in Petri dishes (12x12 cm) with a basic ("minimal") medium.....	136
Figure M12. System used for the application of serial dilutions of liquid yeast cultures in Petri dishes to measure growth (drop-test assay).....	154
Figure M13. Constructs used to generate stable gene silencing of <i>Sl/ScHKT1;1</i> and <i>Sl/ScHKT1;2</i>	158
Figure M14. Sequence fragments used for generating RNAi constructs to silence by PTGS the respective allelic variants of <i>HKT1;1</i> and <i>HKT1;2</i> from <i>S. lycopersicum</i> and <i>S. cheesmaniae</i>	159
Figure M15. Transformation of tomato cotyledons.....	161
Figure M16. Regeneration of stems from transformed cotyledons of tomato in Petri dishes with SIM-K medium.....	161
Figure M17. Induction of <i>in vitro</i> rooting in culture vessels with RM-K medium...	162

Figure M18. Cultivation of tomato plants regenerated from transformed cotyledons in pots with cocopeat	162
Figure M19. Germination of non-transformed tomato seeds (NIL17 C)	165
Figure M20. Binary transformation vector pAC161 (accession number AJ537514) containing the T-DNA used in the generation of the GABI-Kat lines	167
Figure M21. T ₁ seedlings of <i>Arabidopsis</i> germinated in 9 cm diameter Petri dishes with MS medium supplemented with sulfadiazine (5.25 mg/l)	168
Figure M22. Germination of WT <i>Arabidopsis</i> seeds (Col.0) growing in 9 cm diameter Petri dishes with MS medium.	168
Figure M23. Genotyping of the T-DNA insertion mutant lines of <i>Arabidopsis thaliana</i>	169
Figure M24. Schematic representation of the in situ PCR pipeline	174

RESULTADOS

Figure R1. Alignment of SIHKT1;1 amino acid sequence with SIHKT1;2	179
Figure R2. Phylogenetic relationship between <i>S. lycopersicum</i> HKT1-like proteins and other plant HKT transporters.....	181
Figure R3. Detail of the multiple alignments of <i>S. lycopersicum</i> HKT-like proteins and other plant HKT transporters used to construct phylogenetic tree in Figure R2, showing the aminoacid sequence region between transmembrane domain M2 _A and M1 _B	182
Figure R4. Gene expression of <i>SIHKT1;1</i> and <i>SIHKT1;2</i> in different tissues from tomato.	183
Figure R5. Phenotype complementation (drop-test analysis) of tomato <i>HKT1</i> -like genes in the WΔ6 yeast strain, defective in K ⁺ transporters (<i>Δtrk1</i> , <i>Δtrk2</i>)..	183
Figure R6. Time course of Na ⁺ and K ⁺ depletion in WΔ6 yeast cells expressing <i>SIHKT1;1</i>	184
Figure R7. Linkage maps of chromosome 7 obtained from P and C populations of RILs.....	185
Figure R8. LOD function using Interval Mapping (IM) and Multiple QTL Mapping (MQM) for 10 characters showing significant QTLs (LOD> 2) on chromosome 7 in P population.....	187
Figure R9. LOD function using Interval Mapping (IM) and Multiple QTL Mapping (MQM) for 6 characters showing significant QTLs (LOD> 2) on chromosome 7 in C population	188
Figure R10. Sequence polymorphism in tomato HKT1;1 Intron 1 and 2 regions from genomic sequences of <i>S. lycopersicum</i> , cv Heinz (H), <i>S. lycopersicum</i> cv. Cerasiforme, NIL14 (CC) and NIL17(LL)	190
Figure R11. Sequence polymorphism in promoter region of HKT1;1 allelic variants from tomato NIL14 (CC) and NIL17(LL)	191

Figure R12. Sequence polymorphism in promoter region of <i>SIHKT1;2</i> from NIL14 (CC) and NIL17(LL)	192
Figure R13. Time course of Na ⁺ uptake in <i>WΔ6</i> yeast cells expressing different constructs bearing <i>SIHKT1</i> allelic variants cloned in the yeast shuttle vector pYPGE15 using the filtration method.	195
Figure R14. Na ⁺ uptake activity by <i>WΔ6</i> yeast cells expressing different constructs bearing <i>SIHKT1</i> allelic variants cloned in the yeast shuttle vector pDR196.	197
Figure R15. Stability of tomato EF1-α gene expression (expressed as cycle threshold - Cts-) in response to salt stress treatment in NIL14 (CC) and NIL17 (LL)	199
Figure R16. Relative gene expression of <i>SIHKT1;1</i> and <i>SIHKT1;2</i> in response to salt stress in NIL14 (CC) and NIL17(LL)	200
Figure R17. Comparison between the relative gene expression of tomato <i>HKT1;1</i> and <i>HKT1;2</i> in response to salt stress in NIL14 (CC) and NIL17(LL).....	201
Figure R18. Expression data of <i>SIHKT1;1</i> (Soly07g014690) and <i>SIHKT1;2</i> (Soly07g014680) in different tissues of <i>Slycopersicum</i> Cv Heinz obtained from the <i>eFP tomato Browser</i>	202
Figure R19. Diagnostic PCR to detect the presence of <i>RNAi</i> constructs bearing the <i>HKT1;1/HKT1;2</i> DNA fragments in primary transformants lines (T ₀ plants) in two tomato NILs.	203
Figure R20. Gene expression determined by RT-qPCR in three different biological samples of different silenced lines of <i>HKT1;1/HKT1;2</i> allelic variants from <i>lycopersicum</i> and <i>cheesmaniae</i> in two tomato NILs	204
Figure R21. Transcript levels of <i>HKT1;1</i> and <i>HKT1;2</i> in leaf (A), stem (B) and root (C) tissues of different silenced lines of <i>HKT1;1/HKT1;2</i> allelic variants from <i>S. lycopersicum</i> and <i>S. cheesmaniae</i> in two tomato near-isogenic lines (NILs)	209
Figure R22. Effect of NaCl treatment on growth, measured as fresh weight of shoot and root, in different silenced lines of <i>SIHKT</i> (blue bars) and <i>ScHKT</i> (red bars) grown in Petri dishes.	210
Figure R23. Effect of NaCl treatment on growth, measured as fresh weight of leaves and stem in different silenced lines of <i>SIHKT</i> (blue bars) and <i>ScHKT</i> (red bars) grown in pots	211
Figure R24. Effect of NaCl treatment on growth, measured as fresh weight of shoots and roots in different silenced lines of <i>SIHKT1</i> (blue bars) and <i>ScHKT1</i> (red bars) grown in hydroponics	212
Figure R25. Leaf contents of Na ⁺ and K ⁺ in control and salt-treated plants of different <i>ScHKT1;1/HKT1;2</i> - and <i>SIHKT1;1/HKT1;2</i> -silenced NIL lines grown under transpiring (pots -A- and hydroponics -B-) and non-transpiring conditions (Petri dishes -C-).....	213
Figure R26. Transcript levels of <i>ScSOS1</i> , <i>LeNHX2</i> and <i>ScNHX4</i> in leaf	215
Figure R27. Diagnostic PCR to identify homozygous T-DNA insertion plants from the <i>athkt1;1</i> mutant line GK-386D05	216

Figure R28. Diagnostic PCR to identify homozygous T-DNA insertion plants from the <i>athkt1;1</i> mutant line GK-795G10.	217
Figure R29. Gene expression determined by RT-qPCR in different <i>athkt1;1</i> mutant lines.....	218
Figure R30. Effect of NaCl treatment on growth, measured as fresh weight of complete aerial part, in different <i>athkt1;1</i> mutant lines grown under transpiring conditions.....	221
Figure R31. Effect of NaCl treatment on growth, measured as fresh weight of shoot and root, in different <i>athkt1;1</i> mutant lines grown under non transpiring conditions.	223
Figure R32. Aerial part contents of Na ⁺ and K ⁺ in control and salt-treated plants grown in seedbeds.....	224
Figure R33. Tissue localization of tomato <i>HKT1;1</i> , <i>HKT1;2</i> and <i>SOS1</i> genes by <i>in situ</i> PCR.	226
Figure R34. Gene expression analysis of <i>SlSOS1</i> , <i>SlHKT1;1</i> and <i>SlHKT1;2</i> in response to salt stress in wild type and an homozygous T3 <i>SOS1</i> -silenced line of tomato (<i>S. lycopersicum</i> var. Moneymaker)	228

TABLAS

INTRODUCCIÓN

Table I1. Characterization of different types of salt-affected land and their severity levels (average for 1 m soil depth). ECe, Electrical Conductivity of the saturated soil extract; ESP, Exchangeable Sodium Percentage.....	34
Table I2. Regional distribution of salt-affected soils in million hectares (Mha).....	36
Table I3. The effects of salinity stress on plants.....	43
Table I4. Key mechanisms averting excessive accumulation of Na ⁺ or preventing the loss of K ⁺ in the cytosol in order to keep a high K ⁺ /Na ⁺ ratio and transporters probably involved in this process	48
Table I5. Taxonomic classification of tomato	85
Table I6. Area and production of tomato in Spain.....	88
Table I7. Characteristics of interest of wild tomato relatives in tomato breeding.	92
Table I8. List of some commercialized genetically modified (GM) tomato cultivars.....	97

MATERIAL Y MÉTODOS

Table M1. Characteristics of <i>E. coli</i> strains used.	117
Table M2. Characteristics of the <i>A.tumefaciens</i> strain used.	117
Table M3. Culture media used for growing bacteria.....	118
Table M4. Culture media used for growing yeasts	121
Table M5. Yeast transformation mix.	122

Table M6. Silenced lines initially generated from the NILs.	124
Table M7. Silenced lines selected by genotyping and expression analysis.....	124
Table M8. Hoagland standard solution for potted tomato irrigation.	126
Table M9. Modified Hoagland nutrient solution for tomato plants cultivated in hydroponic system.....	129
Table M10. <i>Arabidopsis thaliana</i> mutant lines initially used.	133
Table M11. <i>Arabidopsis thaliana</i> mutant lines selected by genotyping and segregation analysis.	133
Table M12. Standard nutrient solution for irrigation of <i>Arabidopsis thaliana</i>	135
Table M13. Basic (“minimal”) medium for the cultivation of <i>Arabidopsis</i> in Petri dishes	136
Table M14. PCR master mix.	137
Table M15. General conditions for PCR amplification.....	137
Table M16. Primers used for cloning and sequencing	138
Table M17. Primers used for cloning <i>RNAi</i> fragments and diagnostic PCRs to detect the presence of <i>RNAi</i> constructions.....	139
Table M18. Primers used for genotyping <i>Arabidopsis thaliana</i> lines with a T-DNA insertion in the gene coding for <i>AtHKT1;1</i> , from the GABI-Kat collection.	139
Table M19. Primers used for <i>in vivo</i> cloning in yeast, diagnostic PCRs to detect the constructions and for sequencing.	140
Table M20. Primers used for RT-qPCR and <i>in situ</i> PCR.....	141
Table M21. Vector systems used in this work.	146
Table M22. Composition of CTAB extraction buffer (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide).	149
Table M23. PCR amplification conditions for <i>in vivo</i> cloning.	152
Table M24. Constructs used for <i>in vivo</i> cloning in yeast.	153
Table M25. Composition of the culture media used in the tomato transformation experiments. The quantities are referred to one liter of medium.....	163
Table M26. RT reaction solution.	172
Table M27. PCR reaction solution.	173

RESULTADOS

Table R1. Homology of tomato HKT1-like protein sequences with other plant HKT transporters.	180
Table R2. Genes encoding putative ion transporters in 10 Mbp-regions (SL2.40ch07:0..10003161) spanning <i>SIHKT1;1</i> and <i>SIHKT1;2</i> loci in chromosome 7 of <i>S. lycopersicum</i> cv. Heinz tomato as annotated by ITAG 2.40.....	189

Table R3. <i>Cis</i> -regulatory elements in 5' UTR of <i>HKT1;1</i> genomic sequences of <i>S. lycopersicum</i> cv. Cerasiforme, NIL157-14 (CC) and NIL157-17 (LL) affected by sequence polymorphism indicated in Figure R11	193
Table R4. <i>Cis</i> -regulatory elements in 5' UTR of <i>HKT1;2</i> genomic sequences of <i>S. lycopersicum</i> cv. Cerasiforme, NIL157-14 (CC) and NIL157-17 (LL) affected by sequence polymorphism indicated in Figure R12	194
Table R5. Kinetic parameter K_m (mM), V_{max} (nmolmin ⁻¹ mg ⁻¹ DW) for Na ⁺ influx in the yeast mutant <i>WΔ6</i> expressing different HKT1 constructs determined in different assays by filtration method.	198
Table R6. Critical values of the χ^2 distribution.....	206
Tables R7-R15. Segregation analysis of different <i>HKT1;1/HKT1;2</i> silenced lines of from <i>S. lycopersicum</i> and <i>S. cheesmaniae</i> in response to kanamycin.	207
Tables R16-R20. Segregation analysis of different <i>athkt1;1</i> mutant lines from <i>Arabidopsis</i> in response to sulfadiazine.....	219

DISCUSIÓN

Table D1. Significant LOD scores, percentage of explained variance (PEV) and additive values (<i>a</i>) by using MQM procedure for traits that presented maximum LOD at HKT1 genes in both the P and C population of RILs..	235
Table D2. LOD scores, percentage of explained variance (PEV) and additive values (<i>a</i>) for significant and adjacent SolCAP single-nucleotide polymorphisms (SNPs; http://solgenomics.net) in chromosome P7 by using MQM procedure for traits that presented maximum LOD at <i>HKT1</i> genes in the P population of RILs (Table D1)..	236
Table D3. Means, their standard errors (E.E.) and P-values of Na ⁺ and K ⁺ related traits of NILs 157-14 and 157-17 under control (14_C and 17_C) and high salinity conditions (14_S and 17_S).....	239

I. RESUMEN

La salinidad de los suelos y de las aguas de riego es uno de los principales factores ambientales causantes de la reducción del crecimiento y de la producción vegetal a escala mundial, afectando a un gran número de cultivos de interés agrícola. Este factor afecta especialmente a las comunidades andaluza (principalmente en la franja costera de las provincias de Almería, Granada y Málaga) y murciana, donde se encuentran las zonas de mayor producción hortofrutícola, no sólo de España, sino también de Europa. La salinidad limita la productividad y calidad de las cosechas, disminuyendo su rendimiento y calidad, por lo que los principales motores de la economía en estas zonas se ven seriamente amenazados (Tóth *et al.*, 2008). Una de las principales causas de salinización de los suelos cultivables se debe a un mal uso de las aguas de riego, problema que se agudiza especialmente en las franjas costeras, donde la sobreexplotación de los acuíferos produce la salinización de los suelos por intrusión de agua de mar (Tuteja, 2007). Se estima que el coste por pérdidas en producción agraria debidas a la salinidad a nivel mundial es de unos 27 mil millones de dólares anuales y va en aumento (Munns y Gilliam, 2015). Por tanto, el incremento del uso eficiente del agua en Agricultura es un objetivo de primer orden para garantizar la sostenibilidad, producción de riqueza y empleo de los distintos sectores económicos de las zonas mencionadas (FAO, 2011).

El cultivo del tomate es uno de los más extendidos en la actualidad y de mayor valor económico (FAO, 2014). Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. Actualmente, España es el octavo país más productivo de tomate a nivel mundial, siendo su producción principalmente destinada al consumo en fresco. Por tanto, este cultivo es promotor de riqueza y empleo en este país, especialmente en las zonas previamente mencionadas. Sin embargo, en dichas zonas encontramos frecuentemente valores de conductividad superiores a 3 dS/m (equivalentes a unos 2 g/L de NaCl), tanto en suelos como en el agua de riego, que ocasionan disminuciones muy importantes en la producción de dicho cultivo. Concretamente, a partir de valores de 1.7 dS/m, la producción de tomate disminuye un 15% por cada dS/m adicional (Maas y Grieve, 1990). Esta situación hace necesaria la búsqueda de soluciones que permitan mejorar la tolerancia a la salinidad de este cultivo (Cuartero *et al.*, 2006; Bergougnoux, 2014).

Para la mayoría de plantas de cosecha y, particularmente para el tomate, la excesiva acumulación de Na⁺ puede producir efectos muy negativos en su crecimiento y desarrollo, debido esencialmente a la competición de este catión con el K⁺ por los sistemas de absorción del segundo. Si bien, dicha acumulación podría considerarse una ventaja adaptativa, por ser el Na⁺ un osmolito biológicamente barato que restaura el estado hídrico de la planta, una regulación inadecuada de los flujos de Na⁺ causaría a largo plazo una deficiencia nutricional de K⁺ y una perturbación del potencial osmótico de la célula, tanto por la elevada concentración de Na⁺ externa, como por la disminución de la concentración del K⁺ en el interior de

la misma (Munns *et al.*, 2016; Kronzucker *et al.*, 2013). En este sentido, la mejora de la homeostasis de Na^+/K^+ es un aspecto clave en la tolerancia a la salinidad del tomate (Cuartero *et al.*, 2006).

Para reducir el impacto de la salinidad en el tomate se han implementado estrategias tecnológicas y biológicas (Romero-Aranda *et al.*, 2002, 2006; Cuartero *et al.*, 2006). Las estrategias biológicas, que son de gran importancia en la agricultura sostenible, han consistido en utilizar el potencial genético de las variedades de cultivos y especies relacionadas para la identificación de características de tolerancia y su introgresión en los cultivos mediante mejora clásica o bien mediante su manipulación por ingeniería genética (Mickelbart *et al.*, 2015). En el tomate se han identificado fuentes genéticas de variación para la tolerancia a la sal en algunas especies silvestres, como *Solanum pimpinellifolium* y *S. cheesmaniae*, que podrían actuar como donantes de esta característica a cultivares de tomate de interés comercial (Cuartero *et al.*, 2006). Las especies de tomate tienen una amplia diversidad genotípica para controlar el transporte de Na^+ a larga distancia cuando se cultivan bajo condiciones de estrés salino, siendo generalmente las accesiones más tolerantes aquellas que acumulan más sal en tallos y hojas y menos en las raíces en comparación con las variedades más sensibles (Cuartero *et al.*, 2006). De hecho, las raíces de tomate pueden, en gran medida, determinar las concentraciones de Na^+ que alcanzan la parte aérea de la planta, dependiendo de la intensidad del estrés (Estañ *et al.*, 2005; Asins *et al.*, 2010, 2015).

Por ello, un objetivo importante del **Grupo de Homeostasis Iónica y Transportadores de Membrana de la EEZ**, en el cual se ha llevado a cabo la presente Tesis Doctoral, es la investigación de aquellos genes que codifican a los diferentes transportadores de Na^+ que pueden estar implicados en la homeostasis de Na^+ y K^+ , específicamente en el control de la carga xilemática y su distribución en la planta de tomate, aplicando para ello un abordaje funcional *in planta*. La evidencia acumulada al respecto en plantas modelo, como *Arabidopsis* y arroz indica que los transportadores de cationes de tipo HKT, SOS1 y NHX regulan las concentraciones internas de Na^+ en diversos tejidos y también, indirectamente, la homeostasis de K^+ , por lo que estos genes son candidatos a participar en el mecanismo de tolerancia a la salinidad (Apse y Blumwald, 2007; Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009; Pardo y Rubio, 2011). De igual forma, este grupo ha demostrado que la homeostasis de Na^+ y K^+ bajo condiciones salinas en tomate, se lleva a cabo, en una gran medida, mediante la participación de transportadores de tipo SOS1 y de sus proteínas reguladoras (Olías *et al.*, 2009a, 2009b; Huertas *et al.*, 2012), que están implicados en la extrusión de Na^+ , así como en la carga xilemática de Na^+ , además de haber estudiado algunas isoformas de tipo NHX, implicadas en la compartimentación intracelular de Na^+ y K^+ (Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009; Huertas *et al.*, 2013). De ahí que en la presente Tesis doctoral, el objetivo general se haya enfocado a la investigación del papel de los transportadores de tipo HKT en la

homeostasis de Na⁺ y K⁺ en tomate, ya que se ha visto que pueden ser claves en el mecanismo de tolerancia a la salinidad en otras plantas, al participar en la retirada de Na⁺ del xilema, previniendo de esta manera su acumulación en la parte aérea y mejorando indirectamente la acumulación de K⁺ (Suzuki *et al.*, 2016).

Para llevar a cabo dicho objetivo, ha sido fundamental la colaboración científica con el **Grupo de Genética de la Dra. MJ Asíns (IVIA, Valencia)**, que ha aportado tanto los datos genéticos previos, así como el material vegetal, necesarios para llevar a cabo los objetivos específicos planteados en esta Tesis Doctoral. Esta colaboración ha sido esencial para la validación de los genes de *HKT1;1* y *HKT1;2* de tomate, aislados en nuestro laboratorio, presumiblemente implicados en el control de la homeostasis de K⁺ y Na⁺, como genes candidatos en el análisis de QTLs (*Quantitative Trait Locus*) de tolerancia a la salinidad en poblaciones de líneas recombinantes (RILs -*Recombinant Inbred Lines*), derivadas de *S. pimpinellifolium*, y de *S. cheesmaniae*, dos especies halotolerantes. Así, el grupo de Genética del IVIA había encontrado previamente una agrupación de QTLs localizados en el cromosoma 7 (Villalta *et al.*, 2008), que incluía los QTLs *lkc7.1*, responsable del contenido de potasio en hoja (KH); *tn7*, responsable del Na⁺ transportado a la parte aérea; y *lkn7.1*, responsable de la relación K⁺/Na⁺ en hoja en condiciones salinas. Todos estos QTLs y, en concreto *lkc7.1*, parecen determinar caracteres de tipo halofítico, que pueden estar relacionados con la supervivencia de la planta en condiciones salinas. En dichos QTLs, los alelos de *S. cheesmaniae* aumentan significativamente la concentración de Na⁺ y disminuyen la de K⁺ en hoja, mientras que los alelos de *S. lycopersicum* realizan el efecto contrario (Villalta *et al.*, 2008). Por ello, nuestra hipótesis de partida fue que dichas isoformas *HKT1* de tomate (*SlHKT1;1* y *SlHKT1;2*) constituyen los candidatos funcionales más probables a soportar la función del mencionado QTL, al igual que ocurría en investigaciones previas realizadas sobre otros genes *HKT*, que también subyacen en similares QTLs de otras especies, como *Arabidopsis*, arroz y trigo (Ren *et al.*, 2005; Rus *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006b; Byrt *et al.*, 2007; Moller *et al.*, 2009; Plett *et al.*, 2010; Munns *et al.*, 2012; Byrt *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2016).

La comprobación de esta hipótesis fue posible gracias a la aplicación de una estrategia de análisis de genes candidatos, que en parte, fue facilitada por la disponibilidad de la secuencia del genoma de tomate y su anotación, lo cual permitió la identificación rápida de los genes candidatos en intervalos físicos de 2 Mbp alrededor de SNPs con máximo valor LOD del QTL previamente mencionado, *lkc7.1*, ya que este máximo valor o “pico” del QTL suele indicar con bastante precisión el gen o grupo de genes responsables (Price, 2006). Para llevar a cabo nuestro trabajo se dispuso de dos líneas casi-isogénicas (NILs, *Near-Isogenic Lines*) de *S. lycopersicum* cv. Cerasiforme, cuyos genotipos se diferenciaban únicamente en que una de ellas portaba las variantes alélicas de *HKT1;1* y/o *HKT1;2* procedentes de la especie silvestre halotolerante *S. cheesmaniae* (NIL157-14), mientras que la otra

portaba las propias variantes alélicas de la especie cultivada *S. lycopersicum* (NIL157-17), encontrándose en ambas líneas las mencionadas variantes alélicas en homocigosis (Asins *et al.*, 2013). Los datos genéticos previos, junto con los datos moleculares y fisiológicos generados en esta Tesis Doctoral, han permitido identificar a los genes *HKT1;1* y/o *HKT1;2* como los candidatos más probables a ser responsables de las diferencias en la homeostasis de Na^+/K^+ entre los genotipos parentales tolerantes y sensibles a la salinidad (**datos publicados en Asins *et al.*, -2013-**), de forma muy similar a como se había demostrado en otros transportadores de este tipo en *Arabidopsis*, arroz y trigo (Ren *et al.*, 2005; Rus *et al.*, 2006; Munns *et al.*, 2012; Byrt *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2016).

Dado el estrecho ligamiento existente entre *HKT1;1* y *HKT1;2* en tomate (Asins *et al.*, 2013), también se ha llevado a cabo una estrategia de genética reversa, basada en el silenciamiento génico por *RNAi*, para determinar de esta manera qué locus *HKT1* juega el papel principal en la regulación de Na^+/K^+ de la parte aérea, tanto en la especie cultivada como en la silvestre (*S. cheesmaniae*) en condiciones de salinidad. Para ello, se obtuvieron líneas de plantas transgénicas con las construcciones *RNAi* para *HKT1;1* y *HKT1;2*, con una expresión reducida para cada una de las variantes alélicas de *HKT1;1* y *HKT1;2* de *lycopersicum* o *cheesmaniae*, a partir de las dos líneas casi isogénicas anteriormente mencionadas (NIL157-17 y NIL157-14). **El Grupo de Cultivo *in vitro* y Mejora Vegetal del Prof. Vicente Moreno, IBMCP-Universidad Politécnica de Valencia (UPV)**, llevó a cabo la transformación génica estable (mediada por *Agrobacterium tumefaciens*) con las construcciones *RNAi* para *HKT1;1* y *HKT1;2*, generadas previamente en nuestro laboratorio, utilizando el sistema de vectores pKANNIBAL/pART27 (Wesley *et al.*, 2001), tal y como se había llevado a cabo previamente para el silenciamiento de *SISOS1* (Olías *et al.* 2009a). Con todas estas líneas generadas (seis en total) se llevaron a cabo experimentos de evaluación del fenotipo en respuesta a estrés salino, tanto en condiciones de transpiración (cultivo en maceta y en sistema hidropónico en invernadero) como en condiciones de escasa o nula transpiración (placas de Petri). Los resultados obtenidos indicaron que en los dos sistemas de cultivo que incluían condiciones de transpiración, el silenciamiento de *ScHKT1;2/SiHKT1;2* alteraba la proporción Na^+/K^+ en hojas con respecto a sus respectivos controles no silenciados, lo cual se asociaba a un fenotipo de hipersensibilidad a la salinidad, medido como peso fresco de la parte aérea, mientras que el silenciamiento de *SiHKT1;1/ScHKT1;1* tuvo un mínimo efecto. Estos resultados demuestran que *HKT1;2* (tanto de *S. lycopersicum* como de *S. chesmaniae*) tiene el papel más relevante en la homeostasis del Na^+ y por tanto, en la tolerancia a la salinidad del tomate (**datos publicados en Jaime-Pérez *et al.*, -2017-**).

Estos resultados proporcionan información clave en la investigación de la mejora de la tolerancia del tomate y otros cultivos a la salinidad, ya que permiten la explotación de *HKT1;2* como gen que controla el QTL de tolerancia a la salinidad, el

cual podría ser incorporado a variedades de cultivo de élite mediante genética convencional o bien mediante ingeniería genética, lo que podría tener una importante repercusión en la producción y en la calidad del tomate en las zonas de cultivo afectadas por la salinidad. Asimismo, mediante ensayos de combinaciones recíprocas de patrón-injerto en relación al efecto del silenciamiento de los loci *HKT1;1* y *HKT1;2*, se podría generar nueva información de relevancia desde el punto de vista aplicado. Es decir, gracias a estas líneas silenciadas se podrían obtener prototipos de portainjertos, hasta ahora nunca probados, que podrían exhibir fenotipos beneficiosos, tanto en condiciones normales de cultivo como en condiciones salinas, los cuales serían de gran utilidad para aumentar la producción comercial de tomate.

I. ABSTRACT

Soil and irrigation water salinity is one of the main environmental factors limiting growth and yield of most plant species. This factor especially affects the coastal areas of Almería, Granada and Malaga in Andalusia, as well as Murcia, where the areas with the largest fruit and vegetable production in Spain and Europe are located. Salinity reduces crop yield and threatens the main economic growth activities in these areas (Tóth *et al.*, 2008). The misuse of irrigation water is one of the principal causes of salinization of arable land, especially on the coast, where overexploitation of aquifers produces soil salinization by seawater (Tuteja, 2007). It is estimated that the cost of lost agricultural production due to salinity worldwide is \$27 billions per year and is increasing (Munns y Gilliam, 2015). Therefore, the increase in the efficient use of water in agriculture is a prime objective in order to guarantee sustainability, production and employment of economic sectors in the above mentioned areas (FAO, 2011).

Tomato is one of the world's most widely produced crops, and of greater economic importance (FAO, 2014). Demand is constantly increasing and therefore, also its cultivation, production and trade. Currently, Spain is the eighth largest producer of tomato worldwide, the majority of which is intended for fresh consumption. Therefore, tomato crop is a promoter of economic growth and employment in Spain, especially in the areas mentioned above, where electrical conductivity (EC) values exceed 3 dS/m (equivalent to 2 g/L NaCl) in soils and in irrigation water, which cause a major decrease in tomato production. Specifically, from 1.7 dS/m, tomato production decreases by 15% for each additional dS/m (Maas y Grieve, 1990). This situation makes it necessary to look for solutions to improve the salt tolerance of this crop (Cuartero *et al.*, 2006; Bergougnoux, 2014).

For most crop plants, and particularly tomatoes, excess Na⁺ accumulation in the aerial parts of plants can produce highly negative effects on growth and development, since high Na⁺ concentrations often competitively inhibit K⁺ uptake systems, and K⁺ is involved in many physiological functions in plants. Although this accumulation could be considered to be an adaptive advantage, given that Na⁺ is a biologically “cheap” osmolyte that restores the hydric state of the plant, an unbalanced regulation of Na⁺ uptake would cause long-term nutritional K⁺ deficiency and a disturbance in cellular osmotic potential by the high concentration in external Na⁺ and the decrease in K⁺ concentrations inside the cell (Kronzucker *et al.*, 2013; Munns *et al.*, 2016). Thus, maintaining a balanced cytosolic Na⁺/K⁺ ratio has become a key salinity tolerance mechanism in tomato plants (Cuartero *et al.*, 2006).

To reduce the impact of salinity on tomatoes, biological and technological strategies have been implemented (Romero-Aranda *et al.*, 2002, 2006; Cuartero *et al.*, 2006). Biological strategies, which are of great importance in sustainable agriculture, used the genetic potential of crop varieties and related species to identify tolerance traits, which improve the salt tolerance of elite genotypes through conventional breeding programs or genetic engineering techniques (Mickelbart *et al.*, 2015). In tomato, sources of genetic variations for salt tolerance have been identified in some wild species, such as *Solanum*

pimpinellifolium and *S. cheesmaniae*, which can act as donors of these traits in tomato cultivars of commercial interest (Cuartero *et al.*, 2006). Tomato species have a broad genotypic diversity to control long-distance Na⁺ transport under salt stress. The most tolerant accessions are generally those which accumulate more salt in stems and leaves and less in roots as compared to the more sensitive varieties (Estañ *et al.*, 2005; Cuartero *et al.*, 2006; Asins *et al.*, 2010, 2015).

Therefore, an important objective of the **Ion Homeostasis and Membrane Transporter Research Group in the EEZ**, where this doctoral thesis has been carried out, is to investigate, using a functional approach, the genes coding for different Na⁺ transporters, which may be involved in Na⁺ and K⁺ homeostasis, specifically those controlling the xylem loading process and their redistribution throughout the tomato plant. Accumulated evidence in model plants, such as *Arabidopsis* and rice, indicates that cation transporters like HKT, SOS1 and NHX regulate internal Na⁺ concentrations in various tissues and also, K⁺ homeostasis, indirectly; these transporter-codifying genes are possibly involved in the salinity tolerance mechanism (Apse y Blumwald, 2007; Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009; Pardo y Rubio, 2011). Our group has shown that Na⁺ and K⁺ homeostasis under salt conditions in tomato is carried out by the plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger SOS1 and its regulatory proteins (Olías *et al.*, 2009a, 2009b; Huertas *et al.*, 2012), which are involved in Na⁺ extrusion and Na⁺ xylem loading. It has also been shown that certain NHX cation/proton antiporter isoforms are involved in Na⁺ and K⁺ accumulation inside the vacuole and endosomal compartments (Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009; Huertas *et al.*, 2013). The overall objective of this doctoral thesis has therefore been to investigate the role of HKT1 transporters in Na⁺ and K⁺ homeostasis in tomato, which play a key role in the salinity tolerance mechanism in other plant species by retrieving Na⁺ from the xylem and preventing its accumulation in the aerial parts, thus indirectly improving K⁺ uptake (Suzuki *et al.*, 2016).

To achieve this objective it was crucial to establish a scientific collaboration with **Dr. María José Asins's Genetic research group (IVIA, Valencia)**, which has provided both, the genetic data and the plant material needed to accomplish the specific objectives of this doctoral thesis. This partnership was required to validate *HKT1;1* and *HKT1;2* genes, previously isolated at the beginning of this study in the EEZ laboratory, as positional candidate genes for quantitative trait locus (QTL) analysis of salinity tolerance in two connected populations of tomato recombinant inbred lines (RILs), derived from the cultivated species *S. lycopersicum* cv. Cerasiform and two salt-tolerant lines from the wild species *S. cheesmaniae* and *S. pimpinellifolium*. The IVIA Genetics group had previously found a QTL cluster located on chromosome 7 (Villalta *et al.*, 2007, 2008), which included the QTLs, *lkc7.1*, responsible for leaf potassium content; *tn7*, for Na⁺ transport to the aerial part and *lkn7.1*, for the K⁺/Na⁺ ratio in leaf under saline conditions. All these QTLs and specifically *lkc7.1* appear to determine halophytic traits, which may be associated with plant survival under saline conditions. In these QTLs, *S. cheesmaniae* alleles significantly increase the Na⁺ concentration and decrease K⁺ concentration in leaves, while *S.*

lycopersicum alleles have the opposite effect (Villalta *et al.*, 2008). Therefore, our working hypothesis assumed that tomato *HKT1* isoforms, *HKT1;1* and/or *HKT1;2*, are the most likely functional candidates to support the function of the *lkc7.1* QTL, as in previous research on other *HKT1* genes, which also underlie similar QTLs from other species, such as *Arabidopsis*, rice and wheat (Ren *et al.*, 2005; Rus *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006a; Byrt *et al.*, 2007; Moller *et al.*, 2009; Plett *et al.*, 2010; Munns *et al.*, 2012; Byrt *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2016).

This hypothesis was verified thanks to an analysis of candidate genes, partly facilitated by the availability of the tomato genome sequence, which enabled us to rapidly identify candidate genes in 2 Mbp physical intervals around single nucleotide polymorphisms (SNPs) with QTL, *lkc7.1* having the highest LOD value which accurately indicates the gene or group of genes responsible for QTLs (Price, 2006). To carry out these experiments, we used two *S. lycopersicum* cv. Cerasiform near-isogenic lines (NILs), differing in terms of allele variants at both *HKT1;1* and *HKT1;2* loci: NIL 157-17 (NIL17), double homozygote for the *lycopersicum* alleles, and NIL 157-14 (NIL14), double homozygote for the *cheesmaniae* alleles (Asins *et al.*, 2013). The previous genetic data, together with the molecular and physiological data generated in this doctoral thesis enabled us to identify *HKT1;1* and/or *HKT1;2* genes as the most likely candidates responsible for differences in Na⁺/K⁺ homeostasis between tolerant and salinity sensitive parental genotypes (data published in Asins *et al.*, -2013-), as happens in other *HKT1*-like transporters from *Arabidopsis*, rice and wheat (Ren *et al.*, 2005; Rus *et al.*, 2006; Munns *et al.*, 2012; Byrt *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2016).

Given the close link between *HKT1; 1* and *HKT1; 2* in tomato (Asins *et al.*, 2013), a reverse genetic strategy based on *RNAi* gene silencing was used to determine which of the two genes plays the main role in the regulation of Na⁺/K⁺ concentrations in the aerial part in both cultivated and wild species (*S. cheesmaniae*) under salinity conditions. Thus, several transgenic lines with *HKT1;1* and *HKT1;2* *RNAi* constructions, with reduced expression for these genes in each allelic variant (*lycopersicum* and *cheesmaniae*) being generated using NIL17 and NIL14. **Prof. Vicente Moreno's *In vitro* Culture and Plant Breeding Group at the IBMCP-CSIC-Universidad Politécnica de Valencia (UPV)** performed the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for gene silencing, with the *HKT1;1* and *HKT1;2* *RNAi* constructions, being previously generated in our laboratory, using a pKANNIBAL/pART27 vector system (Wesley *et al.*, 2001), as previously described for *SISOS1* silencing (Olías *et al.*, 2009a). We used all these generated lines (a total of six) to perform experiments to evaluate phenotypic responses to saline stress under transpiring (pots and hydroponic system in a greenhouse) and non-transpiring conditions (Petri dishes). The results obtained indicate that in the two culture systems under transpiring conditions, *SchKT1;2/SiHKT1;2* silencing alters the Na⁺/K⁺ ratio in leaves in relation to the respective non-silenced control lines. This was associated with a phenotype of salt hypersensitivity, measured as fresh weight of the aerial part, while *SiHKT1;1/SchKT1;1* silencing had a minimal effect. These results demonstrate that

HKT1; 2 (from *S. lycopersicum* and *S. chesmaniae*) plays the most important role in Na⁺ homeostasis and salinity tolerance in tomato (data published in Jaime-Pérez *et al.*, -2017-).

These results provide key information, which can be useful to improve salinity tolerance of tomato and other crops, and facilitate the exploitation of *HKT1;2* as a gene controlling a salinity tolerance QTL, which could be incorporated into cultivated tomato varieties through conventional breeding programs or genetic engineering techniques, which could have a major impact on the production and quality of tomato in areas affected by salinity. Also, by testing reciprocal pattern-graft combinations in relation to the silencing effect of *HKT1; 1* and *HKT1; 2* loci, new important information could be generated for practical applications. In other words, thanks to these silenced lines, we could obtain rootstock prototypes, hitherto untested, which may exhibit beneficial phenotypes under normal cultivation and saline conditions and be very useful to increase tomato production.

II. INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCTION

II. LA SALINIDAD DE LOS SUELOS: CONCEPTO, IMPACTO GLOBAL Y CAUSAS

En esta Tesis Doctoral se estudiará la homeostasis de Na⁺ y K⁺ en tomate cultivado bajo condiciones salinas (*Solanum lycopersicum*) mediante transportadores de Na⁺ de tipo HKT1, los cuales se han propuesto como transportadores implicados en la tolerancia de las plantas a la salinidad. La relevancia de estos transportadores en dicho mecanismo se puso de manifiesto por su asociación con QTLs (*Quantitative Trait Loci*) relacionados con la homeostasis de Na⁺ y K⁺ en la parte aérea bajo condiciones de salinidad. Así, se sabe, por ejemplo, que las isoformas de una especie ancestral de trigo (*Triticum monococcum*), *TmHKT1;4* y *TmHKT1;5*, introgresadas en trigo duro y una variante hiperalélica de *OsHKT1;5* en arroz, son responsables de QTLs que proveen de una mayor concentración de K⁺ respecto a la de Na⁺ en la parte aérea, confiriéndoles a las plantas una mayor tolerancia a la salinidad. Para entender estos complejos mecanismos es importante comenzar con los conceptos más básicos. Por ello, en este primer apartado se estudiará el concepto de salinidad, clave para la comprensión de esta memoria, así como su impacto global, sus causas y algunas posibles soluciones a los problemas causados por la salinidad.

II.1. CONCEPTO DE SALINIDAD

El concepto de salinidad hace referencia a la presencia en el suelo de altas concentraciones de sales solubles, como pueden ser cloruros de sodio (la sal más soluble), calcio y magnesio y, en menor medida, sulfatos y carbonatos de sodio, calcio y magnesio (Szabolcs, 1989; Sheng *et al.*, 2010). Un suelo normal suele tener una conductividad eléctrica del extracto de saturación (*ECe*) inferior a 2 ds/m a 25 °C, un porcentaje de sodio intercambiable (*ESP*, *Exchangeable Sodium Percentage*) inferior al 15% y un pH de 6-7. Los suelos afectados por la salinidad pueden contener exceso de sales solubles, exceso de sodio intercambiable, o exceso tanto de sales solubles como de sodio intercambiable, clasificándose de esta manera en tres tipos: suelos salinos, sódicos o salino-sódicos respectivamente (Tabla I1).

II.1.1. Suelos salinos o *white alkali*

Los suelos salinos son aquellos cuya *ECe* es superior a 4 ds/m a 25 °C, cuyo *ESP* es inferior al 15% y cuyo pH habitualmente se encuentra por debajo de 8.5 (Tabla I1). En la superficie de estos suelos se suele formar una costra blanca cuando se secan, motivo por el cual también reciben el nombre de *white alkali*. Debido a la presencia de un exceso de sales solubles y a la ausencia de cantidades apreciables de sodio intercambiable, los suelos salinos están floculados y en consecuencia, su permeabilidad es igual o aún mayor que la de los suelos no salinos similares (Tóth *et al.*, 2008).

II.1.2. Suelos sódicos o *black alkali*

Esta categoría se aplica a suelos en los cuales la *ECe* es inferior a 4 ds/m a 25 °C y cuyo *ESP* es superior al 15%. En estos suelos, el pH generalmente es superior a 8.5 (Tabla I1). En la bibliografía también se refieren a estos suelos como *black alkali*, siendo reconocibles por la ausencia de capa blanca en su superficie cuando el suelo se seca. Los elevados niveles de sodio contenidos en este tipo de suelos, junto con sus relativamente

bajos niveles de calcio y magnesio hacen que se produzca una dispersión de las partículas de arcilla presentes en el suelo. El resultado es un suelo poco estructurado y con escasa permeabilidad (Caro, 1966; Tóth *et al.*, 2008).

II.1.3. Suelos salino-sódicos

Por último, los suelos salino-sódicos contienen tanto una excesiva cantidad de sales solubles (EC_e superior a 4 ds/m a 25 °C) como un ESP elevado (superior al 15%), presentando generalmente un pH inferior a 8.5 (Tabla I1). En este caso, si las sales solubles existentes en el suelo son lixiviadas y el sodio intercambiable permanece constante, las propiedades del suelo se asemejarán más a las de un suelo sódico. Sin embargo, cuando las sales solubles permanecen en el suelo, tanto la apariencia como las propiedades físicas son más similares a las de los suelos salinos (Wicke *et al.*, 2011; Tóth *et al.*, 2008).

Table I1. Characterization of different types of salt-affected land and their severity levels (average for 1 m soil depth). EC_e , Electrical Conductivity of the saturated soil extract; ESP , Exchangeable Sodium Percentage. Extracted from Wicke *et al.* (2011).

TYPE OF LAND	INDICATOR	SEVERITY LEVEL			
		SLIGHT	MODERATE	HIGH	EXTREME
SALINE	EC_e (ds/m)	2 - 4	4 - 8	8 - 16	> 16
	ESP (%)	< 15	< 15	< 15	< 15
	pH	< 8.5	< 8.5	< 8.5	< 8.5
SODIC	EC_e (ds/m)	< 4	< 4	< 4	< 4
	ESP (%)	15 - 20	20 - 30	30 - 40	> 40
	pH	> 8.5	> 8.5	> 8.5	> 8.5
SALINE-SODIC	EC_e (ds/m)	4 - 8	4 - 25	4 - > 25	4 - > 25
	ESP (%)	15 - 20	15 - 40	15 - 50	20 - > 50
	pH	> 8.5	> 8.5	> 8.5	> 8.5

II.2. IMPACTO GLOBAL DE LA SALINIDAD

Alrededor del 71% de la superficie del planeta Tierra se encuentra cubierta por mares y océanos, es decir, agua salada con una concentración de NaCl aproximada de 30 g/l (Flowers, 2004; Dajic, 2006). De la superficie restante, casi un 15% corresponde a suelos salinos, sódicos o salino-sódicos, estimándose que más de 1000 Mha en todo el mundo se ven afectadas por la salinidad (Pessarakli y Szabolcs, 1994; Shabala y Cuin, 2007; Tóth *et al.*, 2008). La salinidad del suelo está presente prácticamente en todas las regiones climáticas y en una amplia gama de altitudes, siendo muy frecuente en regiones áridas y semiáridas de Asia, Australia, África y América del Sur (Fig. I1). Además, afecta a alrededor de 80 Mha en la Unión Europea, principalmente en los países del Mediterráneo (Fig. I2) (Dajic, 2006; Lakhdar *et al.*, 2009).

11.2.1. Problemática de la salinidad en la agricultura

Si consideramos únicamente la superficie cultivable del planeta (aproximadamente 1500 Mha), la problemática se acentúa, ya que un 23% de dicha superficie corresponde a suelos salinos (Rhoades y Loveday, 1990; Dajic, 2006). Es decir, al menos 345 Mha de la superficie cultivable del planeta se encuentran actualmente afectadas por la salinidad (Ashraf *et al.*, 2009; FAO, 2011). Esto limita la producción de los cultivos, tanto de secano como de regadío, afectando principalmente a este último tipo de cultivo. Se estima que al menos un tercio del área mundial dedicada al regadío está gravemente afectada por la salinidad o se espera que se salinice en un futuro próximo (Flowers y Yeo, 1995; Abbas *et al.*, 2013). Aunque la superficie irrigada constituye sólo un 15% del total la superficie cultivada, su productividad es dos veces superior a la del suelo cultivable que sólo recibe agua de lluvia, lo que explica que las explotaciones agrícolas sometidas a irrigación produzcan un tercio del alimento mundial (Munns y Tester, 2008). Aproximadamente unas 10 Mha de cultivos dedicados al regadío se abandonan cada año debido a los efectos perjudiciales de la salinización en las cosechas, siendo especialmente afectadas las zonas más productivas, como California, el sur de Asia o toda la franja atlántica de la costa marroquí (Dajic, 2006; FAO, 2011; Wicke *et al.*, 2011) (Fig. I1 y Tabla I2). Todos estos suelos de escasa fertilidad quedan generalmente inhabilitados para su uso en la agricultura, ya que producen una reducción inaceptable de las cosechas, quedando en muchos casos completamente inutilizados (Dajic, 2006).

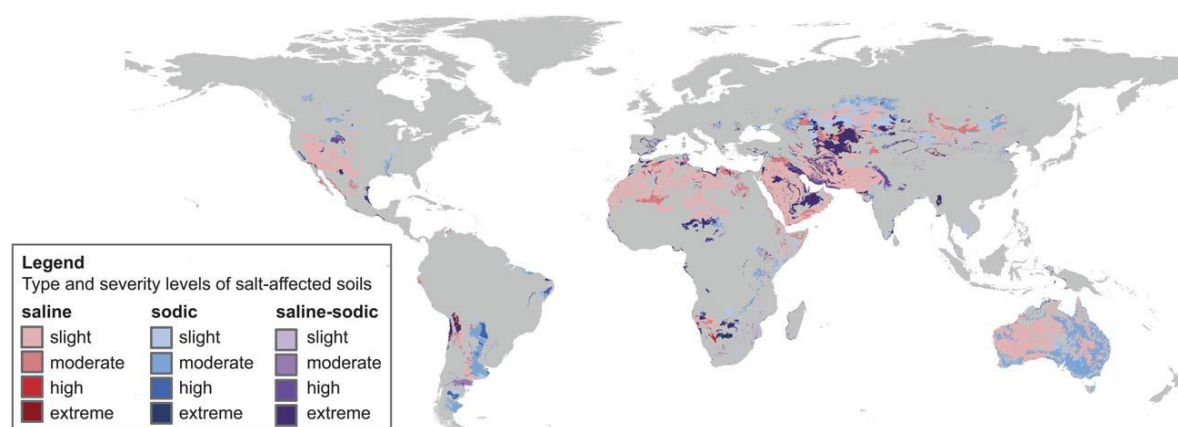


Figure I1. Global salt-affected soils, by type and severity (based on data from *Harmonized World Soil Database -HWSD-*). Extracted from Wicke *et al.* (2011).

En lo que respecta a Europa, la salinidad afecta a gran parte de los países del Mediterráneo, apareciendo en forma de manchas dispersas que se localizan en Portugal, Grecia, Bulgaria, Rumanía, Austria, Chipre, Francia y España (Fig. I2). Afecta especialmente a la franja del sur y este de España, siendo actualmente un serio problema en Andalucía, en zonas como Almería, Granada y Valle del Guadalquivir, así como en las comunidades de Murcia y Valencia, las cuales son, precisamente, las zonas agrícolas más productivas, no sólo de España, sino también de Europa (Tóth *et al.*, 2008; Panagos *et al.*, 2011, 2012).

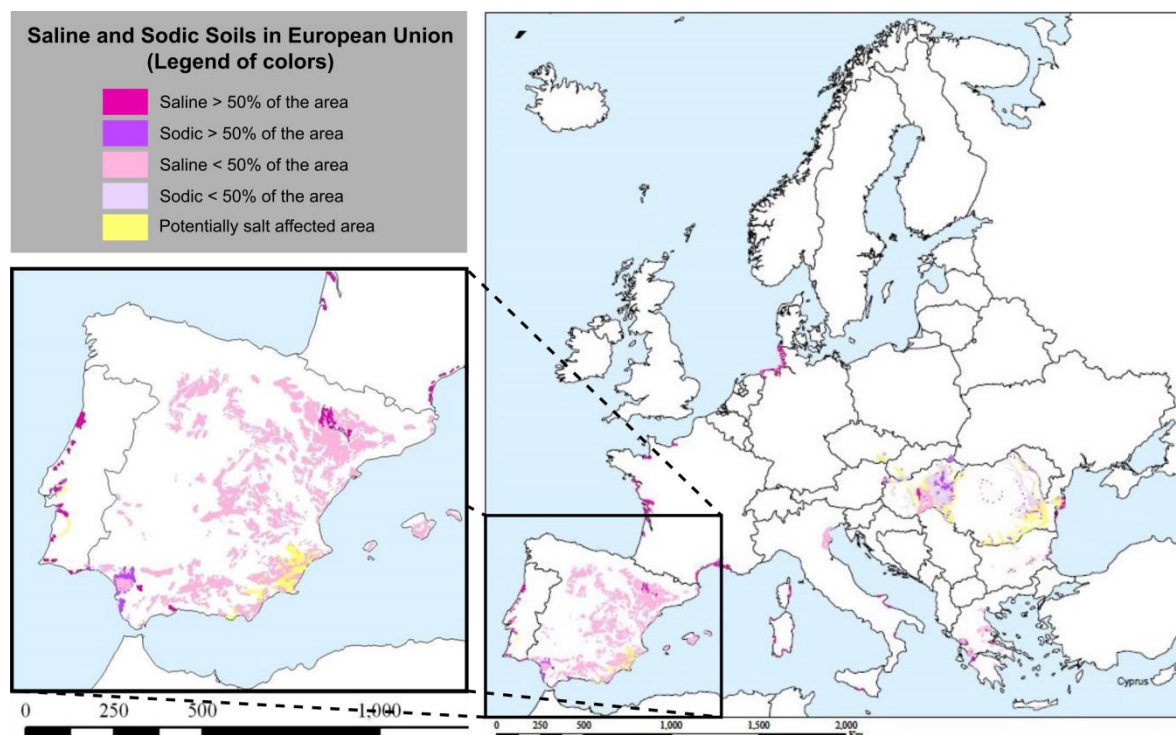


Figure I2. Map of saline and sodic soils in the European Union. Modified from Tóth *et al.* (2008) and Panagos *et al.* (2011).

Table I2. Regional distribution of salt-affected soils in million hectares (Mha). Extracted from Dajic (2006).

REGIONS	TOTAL AREA (Mha)	SALT-AFFECTED SOILS	
		AREA (Mha)	% OF TOTAL AREA
AFRICA	1899	73	3.8
ASIA AND AUSTRALIA	3107	444	14.3
EUROPE	2011	80	3.9
LATIN AMERICA	2039	112	5.5
NEAR EAST	1802	106	5.9
NORTH AMERICA	1924	20	1.0
TOTAL	12782	835	6.5
SECONDARY SALINIZATION IN THE WORLD'S IRRIGATED LANDS		45.4	20

II.3. CAUSAS DE LA SALINIDAD

Las causas que originan la salinidad de los suelos se pueden dividir en dos grupos: causas naturales, que dan lugar a la denominada salinidad natural o primaria, y causas provocadas por la actividad humana, que dan lugar a la salinidad secundaria (Tóth *et al.*, 2008).

II.3.1. Causas naturales: salinidad primaria

La mayoría de las áreas afectadas por la salinidad han surgido por causas naturales. La llamada salinidad natural o primaria es el resultado de la acumulación de sales solubles en suelos o en aguas subterráneas durante largos periodos geológicos, principalmente debido al desgaste de las rocas que liberan sales de varios tipos, tales como cloruros, sulfatos, carbonatos y bicarbonatos de sodio, magnesio y calcio (Dajic, 2006). Este tipo de salinidad va a depender por tanto de las características de la zona, como pueden ser el clima (temperatura, precipitaciones...), la geología (material parental del suelo, transmisión horizontal y vertical de las capas del suelo...) o la hidrología (calidad y cantidad de las aguas superficiales, subterráneas o profundas y sus fluctuaciones), así como de las características naturales del suelo, tales como la textura, estructura, composición mineral de las arcillas, porosidad, propiedades hidrofísicas (tasa de infiltración, retención de agua...) y el contenido en sales. Además, la salinidad natural también puede ser provocada por la deposición de sales oceánicas transportadas por el viento y la lluvia (Dajic, 2006; Tóth *et al.*, 2008; Munns y Tester, 2008).

II.3.2. Causas humanas: salinidad secundaria

La denominada salinidad secundaria está provocada por la actividad humana. Se sabe que este fenómeno afecta a la Humanidad desde el inicio de la agricultura, ya que existen registros históricos de migraciones provocadas por la salinización del suelo cultivable (Gelburd, 1985). La actividad humana ha incrementado la extensión de áreas salinizadas al ampliarse las zonas de regadío, lo cual ha provocado cambios en los balances de agua y sales de los sistemas hidrogeológicos. De esta forma, los problemas de salinización secundaria se deben principalmente a un mal uso de las aguas de riego (uso de agua en exceso, sistemas de riego poco eficientes, sistemas de distribución defectuosos, drenaje restringido, uso de aguas salinas o malas prácticas de riego), que conducen a un incremento paulatino de la salinidad del suelo. Este problema se agudiza especialmente en las franjas costeras, donde la sobreexplotación de los acuíferos produce la salinización de los suelos por intrusión de agua de mar (Bresler y Hoffman, 1986; Tuteja, 2007; Feng *et al.*, 2017). Además de la irrigación existen otras actividades humanas que conducen a la salinización secundaria, como el exceso de pastoreo, la deforestación de áreas semihúmedas o semiáridas, la contaminación con sustancias químicas o el mal uso de los fertilizantes (Pessarakli y Szabolcs, 1994; Dajic, 2006). La suma de todas estas actividades hace que el proceso de salinización secundaria produzca cada año el deterioro de aproximadamente 2 Mha, lo cual equivale a casi el 1% del suelo dedicado a la agricultura a nivel mundial (Tuteja, 2007; Ashraf *et al.*, 2009; Mateo-Sagasta y Burke, 2010).

II.4. POSIBLES SOLUCIONES A LA PROBLEMÁTICA DE LA SALINIDAD

Se prevé que la población mundial aumentará en más de 2300 millones de personas hasta el año 2050, mientras que, la producción de los cultivos está decreciendo rápidamente debido, entre otros problemas, al impacto negativo producido por la salinidad (Abbas *et al.*, 2013; Dajic, 2006). Esto se traduce en un aumento de la demanda

de alimentos, haciendo necesaria una mayor producción agrícola y una mejora de la sostenibilidad al mismo tiempo (Dajic, 2006). La investigación en agricultura es clave para el desarrollo de cultivos más productivos y de mayor calidad nutricional, así como cultivos tolerantes a los distintos estreses que, como la salinidad, puedan afectar a las cosechas (Epstein *et al.*, 1980; Flowers, 2004). Para mejorar o al menos mantener la productividad de los cultivos afectados por la salinidad, se han propuesto dos aproximaciones: 1) una aproximación tecnológica, en la cual se intentaría eliminar la sal de los suelos mediante la lixiviación (lavado), la mejora del drenaje y el uso de aguas de riego de alta calidad (en resumen, una mejora de las prácticas de cultivo), y 2) una aproximación biológica, centrada en la explotación y el desarrollo de plantas capaces de tolerar la salinidad (es decir, la mejora de la tolerancia a la salinidad de las plantas de cultivo) (Epstein *et al.*, 1980; Flowers, 2004; Foolad, 2004).

II.4.1. Mejora de las prácticas de cultivo

Una posible estrategia para minimizar al máximo los daños causados por la salinidad, consiste en mejorar las prácticas de cultivo para prevenir la salinización del suelo, o bien, la implementación de planes para intentar reducir la cantidad de sales del suelo (uso de aguas de riego de alta calidad, instalación de sistemas de lavado y drenaje de suelos, eliminación del exceso de sodio del suelo mediante la adición de sulfato de calcio, sílice...) (Romero-Aranda *et al.*, 2002, 2006; Mateo-Sagasta y Burke, 2010; FAO, 2011).

El lavado de las sales con el objetivo de que éstas sean arrastradas en profundidad, donde la mayor parte de los sistemas radicales de las plantas no puedan alcanzar, es una medida esencial para la recuperación de los suelos salinos (Devkota *et al.*, 2015; Callaghan *et al.*, 2017). La forma más simple de conseguir este lavado de sales consiste en un riego abundante, que disuelve las sales y las arrastra hacia los horizontes más profundos del perfil del suelo (Letey *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). Sin embargo, es importante tener en cuenta la naturaleza o composición de las sales del suelo, ya que las solubilidades de cada sal son diferentes (Szabolcs, 1989). Suele ser habitual que, tras realizar esta práctica, se requiera un drenaje artificial del agua añadida, con objeto de evitar un ascenso del nivel freático hacia la superficie, que podría retornar los compuestos lavados (Gunn *et al.*, 2015). El agua de lavado puede ser reconducida mediante sistemas de drenaje a otras zonas, arroyos, ríos, lagos o al mar, teniendo siempre en cuenta que esto podría acarrear problemas ambientales (Jia *et al.*, 2011). En este sentido, habría que considerar los riesgos de contaminación, disminuyendo al máximo los drenajes y limitándolos exclusivamente a la época de lluvias, en la cual los vertidos de sales no serían tan dañinos (Jia *et al.*, 2011). Por tanto, la correcta administración del agua de drenaje también es de gran importancia (Buller *et al.*, 1991; Ross *et al.*, 2016; Tao *et al.*, 2017). Un buen sistema de drenaje debe permitir que una pequeña cantidad del agua de riego (alrededor del 10-20% del agua de drenaje o de lixiviación) salga fuera de la zona de irrigación (Gunn *et al.*, 2015). Esto se puede conseguir mediante la apertura de zanjás o la construcción de desagües. El agua salina drenada puede ser reutilizada siempre y cuando se diluya con agua dulce. En los

casos en que la concentración de Na⁺ es alta, también se puede agregar Ca²⁺ al suelo, habitualmente en forma de óxido o sulfato, para reemplazar el Na⁺ intercambiable. Por último, en esta aproximación también es importante una adecuada selección de los cultivos, ya que, como se ha mencionado previamente, algunas especies son más tolerantes a la salinidad que otras. Por ejemplo, el trigo duro y la cebada toleran un mayor contenido de sales que el arroz o el maíz (Aguilar *et al.*, 2017; Feng *et al.*, 2017).

A pesar de que una mejora de las prácticas de cultivo que incluya el uso de aguas de riego de alta calidad, instalación de sistemas de lavado y drenaje de suelos y la aplicación de Ca²⁺ puede disminuir en cierta medida los daños causados por la salinidad del suelo, los costes asociados a esta aproximación son muy altos y habitualmente sólo proporcionan una solución temporal al problema de la salinidad (Foolad, 2004). Por ello, una posible alternativa para afrontar este problema es aumentar la tolerancia de las plantas a la salinidad, ya sea por técnicas tradicionales de mejora (Flowers, 2004), o mediante uso de tecnologías de ingeniería genética (Tester y Davenport, 2003).

I1.4.2. Mejora de la tolerancia de las plantas a la salinidad

La mejora de la tolerancia de las plantas a la salinidad es otra aproximación, que debería ser implementada simultáneamente con la mejora de las prácticas de cultivo para lograr una Agricultura Sostenible en presencia de un exceso de salinidad (Munns y Gilliham, 2015; Gilliham *et al.*, 2017). Esta aproximación implica la explotación y/o el desarrollo de plantas capaces de tolerar altos niveles de salinidad (Foolad, 2004), bien mediante técnicas tradicionales de mejora de plantas (mejora clásica), de éxito limitado debido a la complejidad fisiológica y genética de este rasgo (Flowers, 2004; Shabala y Cuin, 2007), o bien, mediante el uso de tecnologías de ingeniería genética (generación de organismos modificados genéticamente -GMOs-, concretamente, plantas transgénicas) (Tester y Davenport, 2003; Mickelbart *et al.*, 2015). Estos aspectos serán ampliados en los apartados I5 e I6.

12. RESPUESTAS DE LAS PLANTAS FRENTE AL ESTRÉS SALINO

Se prevé que la población mundial aumentará en más de 2300 millones de personas entre los años 2009 y 2050, mientras que la producción de los cultivos está decreciendo rápidamente debido al impacto negativo producido por estreses abióticos como la salinidad. Esto se traduce en un aumento de la demanda de alimentos, motivo por el cual en un futuro próximo la producción agrícola necesitará aumentar y ser más sostenible al mismo tiempo. La investigación en agricultura es clave para el desarrollo de cultivos más productivos y de mayor calidad nutricional, así como cultivos tolerantes a los distintos estreses que, como la salinidad, puedan afectar a las cosechas. Por ello, en el siguiente apartado se estudiarán los efectos de la salinidad en las plantas, así como las estrategias de crecimiento de éstas frente al estrés salino y sus respuestas fisiológicas frente a dicho estrés.

12.1. SUSCEPTIBILIDAD DE LAS PLANTAS AL ESTRÉS SALINO

Las plantas presentan diferentes respuestas de crecimiento frente al estrés salino (Munns y Tester, 2008). Si aplicamos una misma concentración de sales a diferentes

plantas, su grado de tolerancia podrá variar en función del estadio de desarrollo, de las interacciones ambientales, del tipo de ión aplicado y de la especie vegetal, incluso de sus variedades y accesiones (Xiong y Zhu, 2002; Dajic, 2006; Munns y Tester, 2008). Por ejemplo, de los cereales, el arroz (*Oryza sativa*) es el más sensible al estrés salino, mientras que la cebada (*Hordeum vulgare*) es el más tolerante (Fig. I3). El trigo de pan (*Triticum aestivum*) es moderadamente tolerante, mientras que el trigo duro (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) lo es menos. El agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum*) es una especie cercana al trigo tolerante a la salinidad y es una de las especies de monocotiledóneas más tolerantes, pudiendo crecer a concentraciones de sales tan altas como las del agua de mar (Fig. I3). La variación en la tolerancia a la salinidad en dicotiledóneas es incluso mayor que en las especies monocotiledóneas. Algunas legumbres son muy sensibles, incluso más que el arroz, mientras que la alfalfa (*Medicago sativa*) es muy tolerante y plantas como *Atriplex* (*Atriplex amnicola*) pueden crecer a concentraciones superiores a la del agua de mar. Por el contrario, si comparamos a *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) con otras especies, se puede considerar sensible a la salinidad (Fig. I3) (Tester y Davenport, 2003; Munns y Tester, 2008).

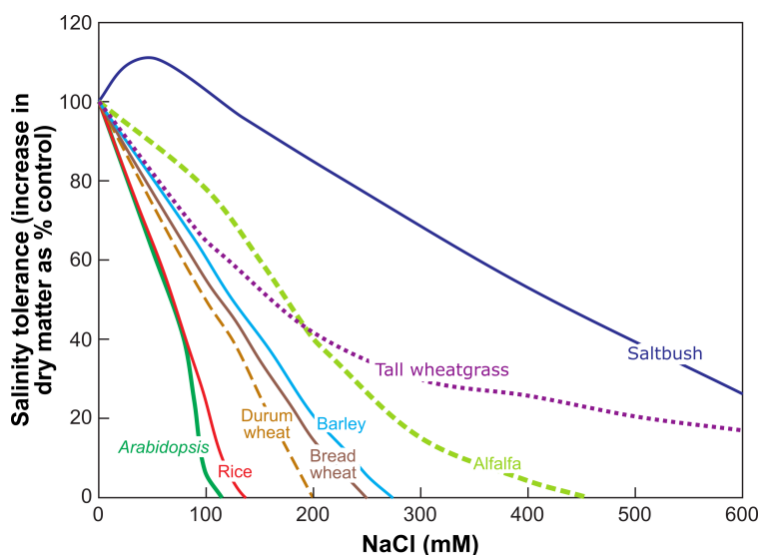


Figure I3. Diversity in the salt tolerance of various species, shown as increases in shoot dry matter after growth in solution or sand culture containing NaCl for at least 3 weeks, relative to plant growth in the absence of NaCl. Data are for rice (*Oryza sativa*), durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum*), bread wheat (*Triticum aestivum*), barley (*Hordeum vulgare*), tall wheatgrass (*Thinopyrum ponticum*, syn. *Agropyron elongatum*), *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), alfalfa (*Medicago sativa*), and saltbush (*Atriplex amnicola*). Extracted from Munns & Tester (2008).

De acuerdo a una clasificación basada en las concentraciones umbrales que son capaces de soportar las plantas sin sufrir daños aparentes, el tomate cultivado, *Solanum lycopersicum*, pertenece a un grupo de sensibilidad intermedia: grupo II, Halófitas y glicófitas tolerantes (Fig. I4) (Greenway y Munns, 1980). Sin embargo, pueden existir variaciones interespecíficas e intraespecíficas según la especie y/o variedades cultivadas, ya que muchas de ellas presentan una tolerancia diferencial a la salinidad. Por ello, se considera que el tomate abarca un amplio rango de sensibilidad al estrés salino, siendo la altura del tallo y el crecimiento de la hoja los parámetros de crecimiento más afectados

por dicho estrés (Cuartero *et al.*, 1992; Pérez-Alfocea *et al.*, 1993; Cuartero y Fernandez-Muñoz, 1999; Romero-Aranda *et al.*, 2001, 2006; Cuartero *et al.*, 2006).

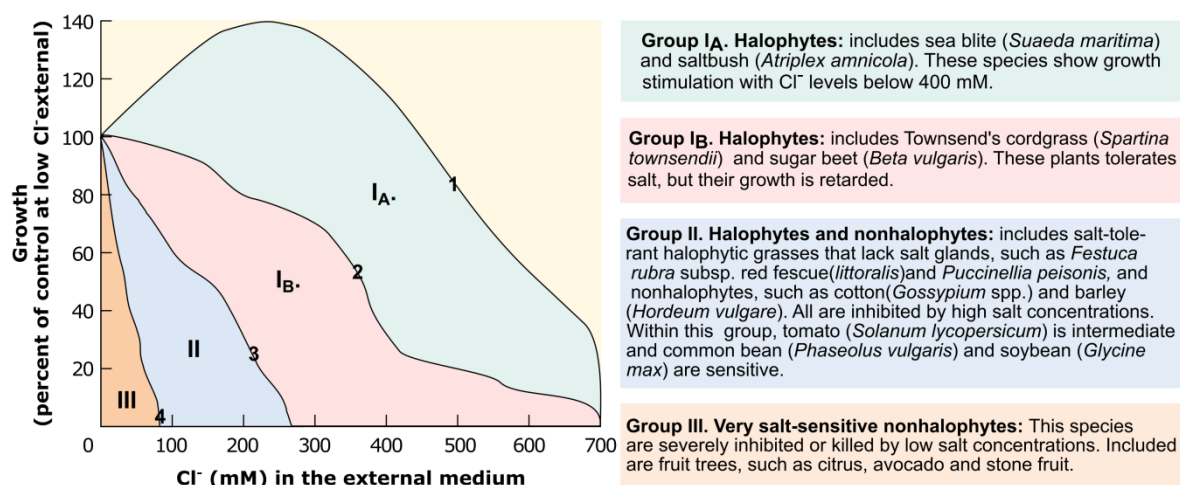


Figure I4. Growth response of different species to salinity after 1-6 months at high Cl^- . Curve 1: *Suaeda maritima* (compared with growth at about 10 mM NaCl to exclude possible Cl^- deficiencies); curve 2: sugar beet (0 - 150 mM Cl^-_{ext}), and *Spartina townsendii* (150 - 700 mM NaCl $_{\text{ext}}$); curve 3: cotton; curve 4: beans. Modified from Greenway & Munns (1980).

I2.2. EFECTOS DE LA SALINIDAD EN LAS PLANTAS

Desde el punto de vista de las plantas, la salinidad es uno de los mayores estreses abióticos que afecta tanto a su crecimiento como a la producción de los cultivos, causando pérdidas valoradas en unos 27 mil millones de dólares anuales (Munns y Gilliam 2015). El primer síntoma que observamos cuando las plantas se ven sometidas a estrés por salinidad es una fuerte reducción del crecimiento (Greenway y Munns, 1980). Esta acción negativa de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas se debe a la combinación de varios efectos (Greenway y Munns, 1980; Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2002): 1) la salinidad produce en la planta un estado fisiológico similar al causado por el estrés hídrico, ya que una alta concentración de sal en el suelo genera un estrés osmótico al formarse una zona de bajo potencial hídrico que dificulta la absorción de agua por las raíces de las plantas; 2) la salinidad puede generar una toxicidad iónica específica asociada a la excesiva absorción de iones Na^+ y Cl^- ; 3) el exceso de Na^+ o Cl^- conduce a una menor absorción de nutrientes minerales o a una alteración de la distribución de iones esenciales como K^+ , Ca^{2+} , nitrato o fosfato, causando una alteración nutricional; y 4) la salinidad conlleva procesos de estrés oxidativo secundario debidos a la generación de especies de oxígeno y nitrógeno reactivas (ROS y RNS).

I2.2.1. Estrés hídrico

Una alta concentración de sal en el suelo genera un estrés osmótico, ya que se forma una zona de bajo potencial hídrico que dificulta la absorción de agua a través de las raíces de las plantas (Pardo, 2010; Roy *et al.*, 2014). Al disminuir la absorción de agua por parte de la planta se produce un estrés hídrico que afecta a la mayor parte de las funciones vitales de la planta (Fig. I5). De esta forma, se producen cambios fisiológicos

significativos, como la reducción del crecimiento (Tester y Davenport, 2003; Pardo, 2010). Esta disminución del crecimiento se debe a una pérdida de turgencia, que afecta a la parte aérea y, en menor grado, a las raíces (Munns *et al.*, 2000; Munns, 2002; Zhu, 2002; Tester y Davenport, 2003; Tuteja, 2007). La concentración umbral de NaCl en el medio de crecimiento de las raíces a partir de la cual comienzan a ser visibles los efectos osmóticos depende de la especie en cuestión, pero para una especie sensible a la salinidad se puede considerar que es de aproximadamente 40 mM. Por encima de esta concentración, la mayor parte de las células pierden agua, por lo que se produce una pérdida del volumen y del turgor celular. Como consecuencia se reduce la tasa de elongación celular, viéndose finalmente afectado el crecimiento (Yeo *et al.*, 1991; Passioura y Munns, 2000; Shabala y Cuin, 2007; Munns y Tester, 2008; Zhu *et al.*, 2010; Osakabe *et al.*, 2013). También se reduce la velocidad de división celular, lo que conduce a una ralentización en la aparición y crecimiento de las hojas (Munns y Tester, 2008; Navarro *et al.*, 2010). El crecimiento de los brotes laterales también se ralentiza o incluso se detiene, resultando en la formación de menos ramas (Navarro *et al.*, 2010). Por último, se afecta el desarrollo reproductivo, produciéndose una floración temprana, que habitualmente viene acompañada por una reducción en el número de botones florales y por consiguiente, del número y la calidad de los frutos (Mizrahi, 1982; Munns y Tester, 2008; Navarro *et al.*, 2010).



Figure I5. General overview of salt stress effects on plant. Salinity induces osmotic and ionic stress, affecting each and every aspect of plant's normal growth and development. Taken From Muchate *et al.* (2016).

I2.2.2. Toxicidad iónica

La toxicidad iónica ocurre cuando la planta toma del suelo agua con un elevado contenido en iones (principalmente Na⁺ y Cl⁻) y los acumula en el citosol de las células de las hojas durante la transpiración, donde son perjudiciales para la supervivencia de la planta (Zhu, 2003; Dajic, 2006; Munns y Tester, 2008). Las altas concentraciones de Cl⁻ producen quemaduras o secado de las hojas, inicialmente en las puntas, propagándose a continuación a los bordes de la hoja. Estos síntomas suelen venir acompañados de la muerte y caída temprana de la hoja o defoliación. La toxicidad producida por el sodio no es tan fácilmente detectable como la toxicidad por Cl⁻; sin embargo, para la mayoría de las plantas, el Na⁺ es la causa principal de toxicidad iónica (Tester y Davenport, 2003). La acumulación de Na⁺ causa necrosis de las hojas más viejas, primero en los bordes y posteriormente se propaga por los nervios foliares hasta el centro de la hoja. Al igual que en el caso del Cl⁻, la hoja acaba muriendo. Si la tasa de muerte de las hojas viejas es mayor que la de producción de hojas nuevas, se verá afectada la capacidad fotosintética de la planta, que no será capaz de suministrar los hidratos de carbono que requieren las hojas jóvenes, reduciéndose aun más los niveles de crecimiento y de producción de la planta (Munns, 2002; Munns y Tester, 2008).

El estrés hídrico y la toxicidad iónica no ocurren de forma independiente, sino que pueden considerarse dos fases distintas de la reducción del crecimiento de una planta en respuesta al estrés salino: una primera fase, más rápida, debida al aumento de la presión osmótica externa (fase osmótica, Tabla I3) y una segunda, más lenta, debida a la acumulación del Na⁺ en las hojas (fase iónica, Tabla I3). La fase osmótica comienza al alcanzarse en el suelo el nivel umbral de NaCl a partir del cual la tasa de crecimiento disminuye drásticamente y que, como ya hemos dicho anteriormente, es de 40 mM para la mayoría de las plantas. La fase iónica comienza cuando el Cl⁻ o el Na⁺ se acumulan en la planta, alcanzando concentraciones tóxicas en las hojas viejas. Esta fase puede tardar días o incluso semanas en aparecer dependiendo de la especie. A bajas concentraciones de NaCl, el componente osmótico del estrés salino ejerce un efecto inmediato y de mayor impacto sobre el crecimiento que el provocado por el componente iónico (Fig. I6A). Sin embargo, cuando los niveles de salinidad son elevados o la especie en cuestión no tiene la capacidad de regular el transporte de Na⁺, el efecto iónico domina sobre el osmótico (Fig. I6B). Por último, en muchas especies existen variaciones genéticas para la acumulación de Na⁺ y Cl⁻ en la parte aérea, así como para los niveles de tolerancia de estos iones. Un aumento en la tolerancia a ambos componentes del estrés por salinidad podría permitir el crecimiento de una planta a una velocidad relativamente rápida a lo largo de todo su ciclo de vida (Fig. I6C) (Munns y Tester, 2008).

Table I3. The effects of salinity stress on plants. Taken from Munns & Tester (2008).

EFFECT OF STRESS	OSMOTIC STRESS	IONIC STRESS
Speed of onset	Rapid	Slow
Primary site of visible effect	Decreased new shoot growth	Increased senescence of older leaves

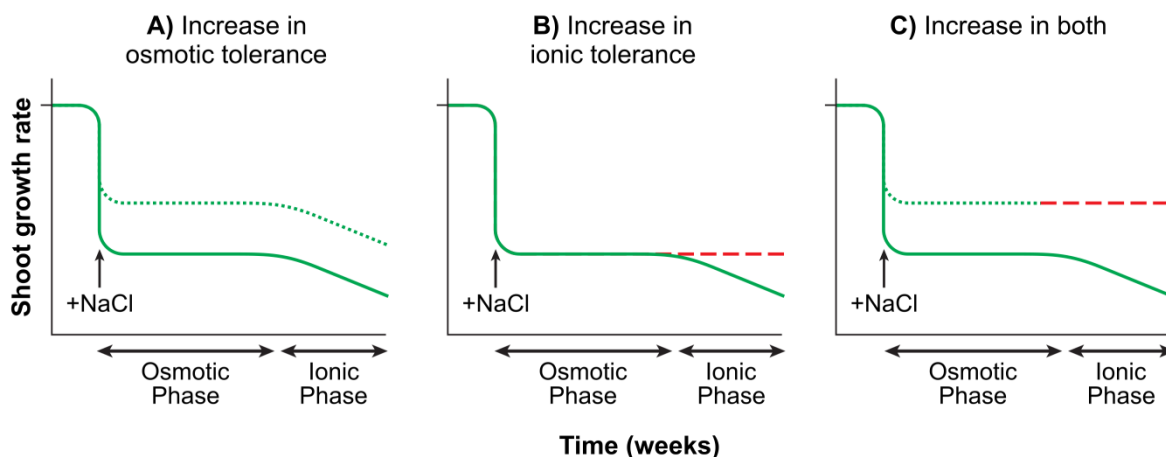


Figure I6. The growth response to salinity stress occurs in two phases: a rapid response to the increase in external osmotic pressure (osmotic phase), and a slower response due to the accumulation of Na^+ in leaves (ionic phase). The solid green line represents the change in the growth rate after the addition of NaCl . **A)** The broken green line represents the hypothetical response of a plant with an increased tolerance to the osmotic component of salinity stress; **B)** The broken red line represents the response of a plant with an increased tolerance to the ionic component of salinity stress; **C)** The green-and-red line represents the response of a plant with increased tolerance to both the osmotic and ionic components of salinity stress. Extracted from Munns & Tester (2008).

I2.2.3. Perturbación de la nutrición mineral

La salinidad no solo dificulta la absorción de agua por las plantas, sino también de otros nutrientes minerales, produciendo una situación de desequilibrio nutricional (Maathuis y Amtmann, 1999). El efecto directo del Na^+ sobre la captación de otros nutrientes se debe a la interferencia de este ión con la actividad de transporte iónico a nivel de la membrana celular de las células de la raíz, afectando principalmente a la captación del K^+ debido a las similitudes fisicoquímicas entre el Na^+ y el K^+ (Benito *et al.*, 2014). Debido a estas similitudes fisicoquímicas, el Na^+ tiene la capacidad de competir con el K^+ por los sitios de entrada de K^+ a las células de la raíz, lo cual impide la captación de este macronutriente, resultando en una deficiencia de K^+ . Una vez en el citoplasma, el Na^+ compite por los sitios de unión del K^+ . Sin embargo, el Na^+ no puede sustituir al K^+ en sus funciones, excepto en aquellas de carácter osmótico (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006), y por ello, un exceso de Na^+ puede resultar en la inhibición de muchos procesos metabólicos o enzimáticos esenciales de las células, como la fotosíntesis, la generación de estrés oxidativo a través de la producción de especies de oxígeno reactivo, la absorción de CO_2 a través de los estomas y el crecimiento en general (Bhandal y Malik, 1988; Tester y Davenport, 2003; Dajic, 2006; Tuteja, 2007; Munns y Tester, 2008; Benito *et al.*, 2014).

I2.2.4. Estrés oxidativo

Muchos estudios comparativos entre especies tolerantes y especies no tolerantes a la salinidad han correlacionado la tolerancia a la salinidad con un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes (Shalata y Tal, 1998; Shalata *et al.*, 2001). Además, se ha

documentado que la sobreexpresión de algunas enzimas antioxidantes mejora la tolerancia a la salinidad (Eltayeb *et al.*, 2007; Prashanth *et al.*, 2008). La hiperosmolaridad causada por la exposición de una planta a condiciones de estrés por salinidad resulta en la aparición de especies de oxígeno reactivo (ROS), tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$) y aniones superóxido ($\text{O}_2^\cdot$), que son dañinas para las células, ya que causan daño oxidativo a lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos (Chinnusamy *et al.*, 2005). Las plantas poseen una amplia gama de antioxidantes enzimáticos, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la ascorbato peroxidasa (APX) o la peroxidasa (POD) y no enzimáticos, como el glutatión y los carotenoides, para combatir el estrés oxidativo (Vinocur y Altman, 2005; Chinnusamy *et al.*, 2005). Los objetivos más comunes de estos antioxidantes (tanto enzimáticos como no enzimáticos) en condiciones de estrés por salinidad son los $\text{O}_2^\cdot$ y los H_2O_2 . El $\text{O}_2^\cdot$ se transforma en H_2O_2 por la SOD en el cloroplasto, las mitocondrias, el citoplasma, el apoplasto y los peroxisomas (Fig. I7). La concentración de H_2O_2 se controla mediante la actividad de las CATs y las PODs. En condiciones salinas, en las plantas sensibles se produce una pérdida de la actividad de estas enzimas, resultando en una acumulación de ROS. Esto produce un aumento en los niveles de actividad y expresión de los genes que codifican para dichas enzimas antioxidantes, haciendo posible así la eliminación del exceso de ROS, dañinas para las células (Xiong y Zhu, 2002; Dajic, 2006; Ashraf, 2009; Abogadallah, 2010).

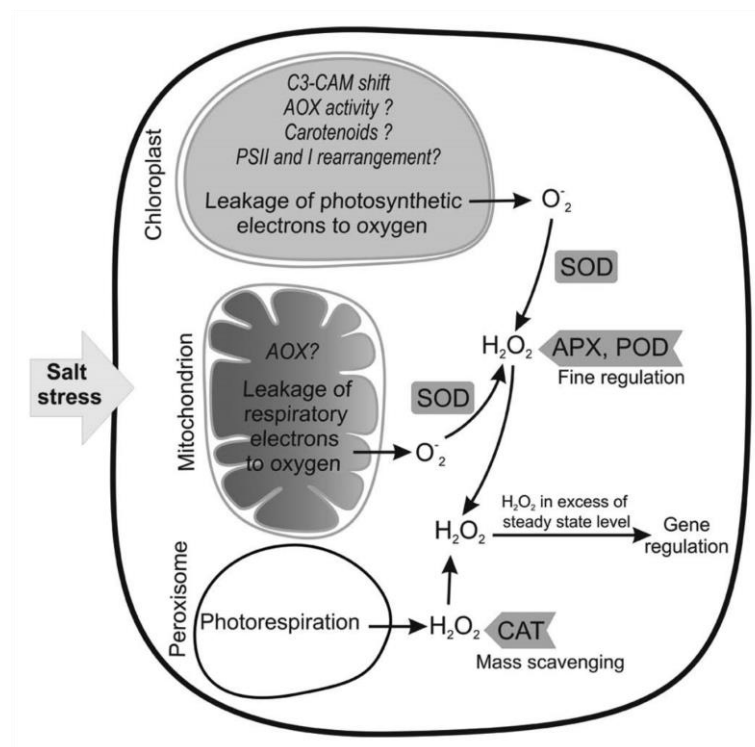


Figure I7. Main intracellular sites of ROS generation under salt stress. The possible preventive antioxidative mechanisms are shown in italic in each cell organelle. Question marks mean the mechanism needs more evidence. The generated ROS are regulated by the action of different enzymes as indicated. The ROS concentrations in excess of normal steady state level work as signal to induce the defense mechanisms. Other sites of ROS generation (cell wall, etc.) are not shown for the sake of simplicity. Extracted from Abogadallah (2010).

13. MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS IÓNICA

La principal causa de toxicidad por Na^+ se debe a su competición por los sitios de unión del K^+ . Sin embargo, el Na^+ no puede sustituir al K^+ en todas sus funciones (sólo en aquellas de carácter osmótico) y por tanto, un exceso de Na^+ afecta de forma negativa a todos los procesos fisiológicos de la planta en los que interviene el K^+ . Por esta razón, para asegurar un correcto funcionamiento de dichos procesos fisiológicos es necesario el mantenimiento de una elevada proporción K^+/Na^+ en el citoplasma de las células, siendo éste un mecanismo clave en la tolerancia de las plantas a la salinidad. Este mecanismo constituye uno de los aspectos más relevantes a tratar en la presente Tesis Doctoral, siendo por ello el siguiente apartado dedicado al estudio de la homeostasis del K^+ y del Na^+ , así como a su regulación y mantenimiento por una serie de transportadores y canales iónicos.

13.1. TRANSPORTADORES IMPLICADOS EN LA HOMEOSTASIS DE SODIO Y POTASIO

Como ya se ha mencionado anteriormente, uno de los principales problemas del estrés salino se debe a su componente iónico, el cual es causado por la excesiva acumulación de Na^+ , especialmente en la parte aérea de las plantas (Zhu, 2003; Munns y Tester, 2008). Uno de los aspectos más relevantes de la toxicidad por Na^+ se debe a que compite con el K^+ por los sistemas de transporte de este último, disminuyendo de esta forma a la entrada de K^+ a las células (Shabala y Cuin, 2007; Kronzucker y Britto, 2011). Esto resulta en una deficiencia nutricional de K^+ , así como en una perturbación del potencial osmótico, producida tanto por la elevada concentración de Na^+ externa, como por la disminución de la concentración del K^+ en el interior de las células (Kronzucker *et al.*, 2013; Benito *et al.*, 2014). Es importante destacar que el K^+ está implicado en multitud de procesos metabólicos clave que tienen lugar en el citoplasma celular, tales como numerosas reacciones enzimáticas (cerca de 50 enzimas citosólicas son activadas por K^+), síntesis de proteínas y funciones ribosómicas. De ahí que el exceso de Na^+ en el ambiente externo de la raíz pueda afectar negativamente al crecimiento, llegando en ocasiones a provocar la muerte de las plantas (Shabala y Cuin, 2007; Almeida *et al.*, 2017). Por ello, el mantenimiento de una alta concentración de K^+ en el citoplasma de las células es fundamental para evitar los efectos negativos del Na^+ , siendo por tanto la homeostasis de Na^+ y K^+ un mecanismo clave en la tolerancia de las plantas a la salinidad (Kronzucker y Britto, 2011; Kronzucker *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2017). Dicho mecanismo constituye un proceso global complejo que conlleva el mantenimiento en el citoplasma de una alta razón K^+/Na^+ . Para mantener esta alta razón K^+/Na^+ , las plantas han desarrollado cuatro mecanismos clave (Tabla I4): 1) la entrada selectiva de iones a través de las células de la raíz, 2) la extrusión de Na^+ al medio externo o al apoplasto, 3) compartimentación vacuolar y endosomal de iones y 4) el control del transporte de Na^+ a larga distancia a través del xilema y posiblemente, también a través del floema (Apse y Blumwald, 2007; Pardo y Rubio, 2011; Su *et al.*, 2015). Es importante no confundir la razón K^+/Na^+ del citoplasma con la razón K^+/Na^+ del tejido de la planta (parte aérea u hojas), ya que es la homeostasis citosólica del Na^+ y del K^+ la que resulta esencial y no la del contenido vacuolar, aunque esta última puede tener algún impacto en el ajuste osmótico (Shabala y Cuin, 2007).

Es bien conocido que para mantener esta elevada razón K⁺/Na⁺ y distribuir los iones a través de los distintos órganos de la planta es necesaria la presencia de una serie de proteínas transportadoras en las membranas de las células (Su *et al.*, 2015). El transporte de iones como K⁺ y Na⁺ a través de los distintos compartimentos celulares puede ser mediado por canales, que utilizan el potencial de membrana para facilitar el flujo de iones a favor del gradiente electroquímico, o por transportadores secundarios, que operan acoplados a bombas de H⁺, también localizadas en las membranas (Tabla I4 y Figs. I8 e I9). Muchos de estos transportadores han sido identificados y estudiados a nivel molecular, demostrando la compleja naturaleza del transporte de K⁺ y Na⁺ (Hasegawa, 2013; Almeida *et al.*, 2017; Assaha *et al.*, 2017). En los siguientes apartados se describirán los principales transportadores implicados en la entrada, eflujo, compartimentación subcelular y transporte a larga distancia de Na⁺, así como algunos de los transportadores implicados en el transporte selectivo de K⁺.

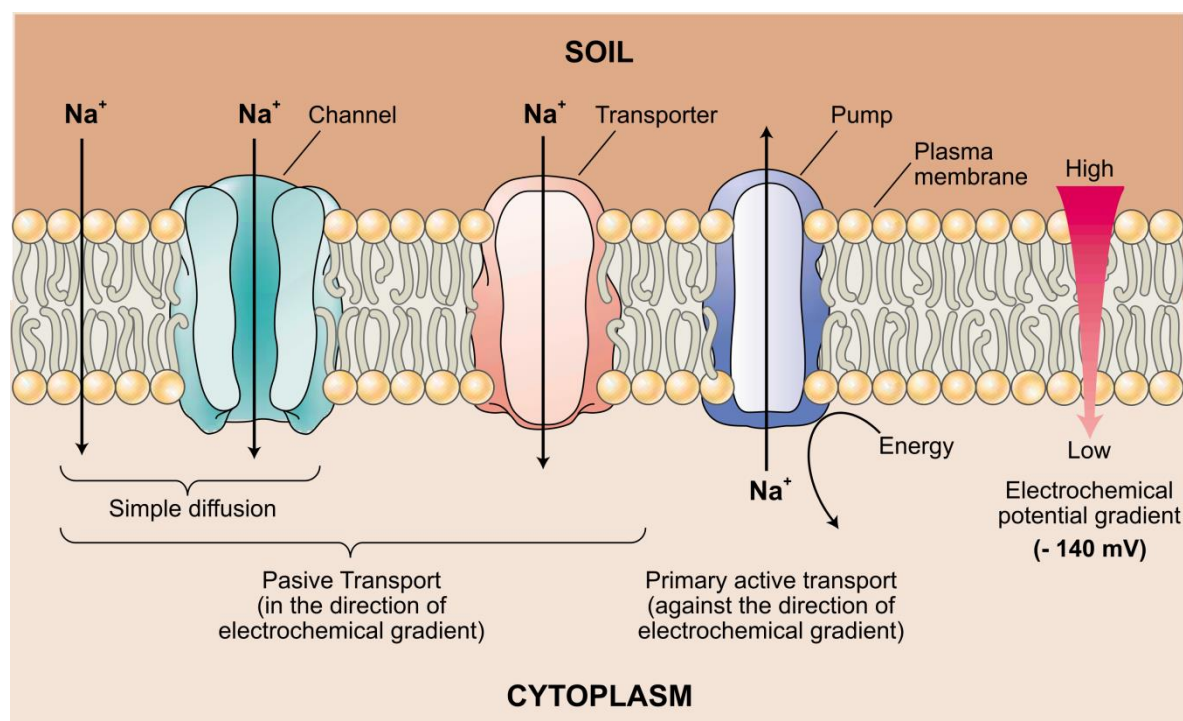


Figure I8. Schematic representation of membrane transport proteins: channels, transporters and pumps. Channels and transporters can mediate the passive transport of Na⁺ and other solutes across membranes (by simple or facilitated diffusion), down the solute's gradient of electrochemical potential. Channel proteins act as membrane pores, and their specificity is determined primarily by the biophysical properties of the channel. Transporters bind the transported molecule on one side of the membrane and release it on the other side. Primary active transport is carried out by pumps and uses energy directly, usually from ATP hydrolysis, to pump solutes against their gradient of electrochemical potential. Adapted from Taiz & Zeiger (2010).

Table I4. Key mechanisms averting excessive accumulation of Na⁺ or preventing the loss of K⁺ in the cytosol in order to keep a high K⁺/Na⁺ ratio and transporters probably involved in this process. NSCC, Non-Selective Cation Channels; AKT1, hyperpolarization-activated inward-rectifying K⁺ channel; HAK5, carrier-type HUP/HAK/KT transport; SKOR, Stele K⁺ Outward-Rectifying Channel; GORK, Guard Cell Outward-Rectifying K⁺ Channel; SOS1, Salt Overly Sensitive 1; NHX, Na⁺/H⁺ Exchanger; HKT1, High-Affinity K⁺ Transporter 1; Em, Membrane Potential.

KEY MECHANISMS	CHANNELS / TRANSPORTERS
1) Ion selective uptake through the root	(K ⁺ >>>Na ⁺) NSCC, AKT1, HAK5 and SKOR/GORK, (Em, P-ATPases)
2) Na ⁺ exclusion to the external medium or to the apoplast flow	Na ⁺ /H ⁺ antiporter, SOS1. (Em, V-ATPases)
3) Vacuolar and endosomal compartmentalization	Na ⁺ /H ⁺ antiporter, NHX1. (Em, V-ATPase, H ⁺ -PPase)
4) Control of xylem (and phloem?) loading (long-distance transport)	HKT1 and SOS1 transporters

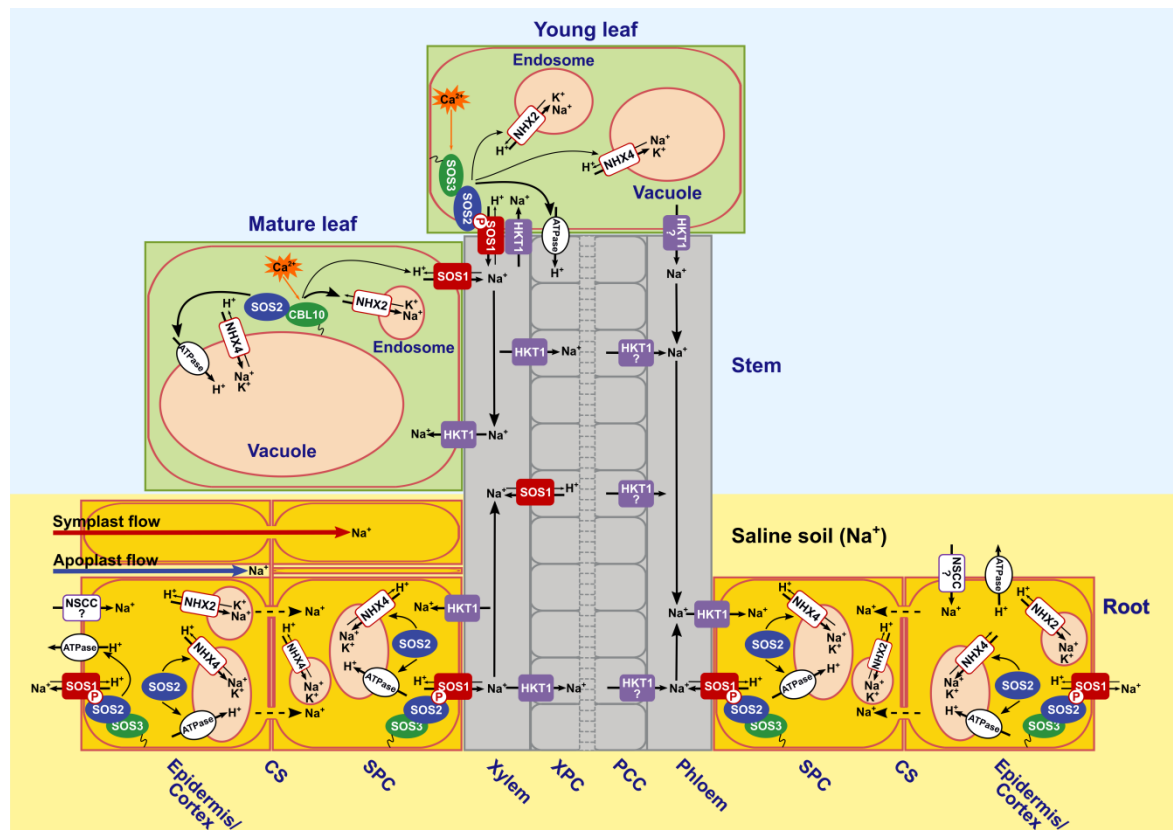


Figure I9. Schematic representation of Na⁺ and K⁺ homeostasis in higher plants under salt stress. Na⁺ ions enter the cells via Non Selective Cation Channels (NSCCs), via other cation transporters not shown (symplast flow - Red arrow) and through the cell wall and intercellular spaces (apoplast flow - blue arrow). The Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 extrudes Na⁺ at the root soil interface, thus reducing the Na⁺ net influx of Na⁺. Activation of SOS1 by SOS2-SOS3 complex promote Na⁺ extrusion out of the root, Na⁺ loading into the xylem and Na⁺ efflux from leaves. Activation of NHX2 and NHX4 by SOS2 cause Na⁺ (and K⁺) accumulation in the vacuolar and endosomal compartments of roots and leaves. SOS2 also activates the plasma membrane and tonoplast H⁺-ATPase responsible for energizing the antiport activity of SOS1, NHX2 and LeNHX4. It is hypothesized that in aerial parts CBL10/SOS2 kinase complex would promote cell Na⁺ extrusion by SOS1 in young leaf and intracellular Na⁺ compartmentalization by NHXs transporters in mature leaf tissues. At the xylem parenchyma cells,

HKT1-like proteins retrieve Na⁺ from the xylem sap, thereby restricting the amount of Na⁺ reaching the photosynthetic tissues. To translocate Na⁺ back to the root, ions unloaded from xylem may be transported into phloem via additional HKT1-like protein. In addition, HKT1-like proteins also load Na⁺ into shoot phloem, and then Na⁺ is transferred into roots via phloem, preventing Na⁺ accumulation in shoots. Incoming Na⁺, in root and shoots, is stored in the large central vacuole by tonoplast-localized NHX exchangers. CS, Casparian Strip; SPC, Stelar Parenchyma Cells; XPC, Xylem Parenchyma Cells; PCC, Phloem Companion Cells. Arrow thickness indicates the hypothetical dominance of the ion flux. Adapted from Belver *et al.* (2012).

I3.1.1. Entrada de Na⁺ a través de la raíz

En condiciones normales, las plantas mantienen en el citosol una concentración relativamente alta de potasio (100-200 mM) y una concentración relativa baja de sodio (1-10 mM) (Tester y Davenport, 2003). Debido a la diferencia de potencial existente a través de la membrana, mucho más negativo en el interior (-140 mV), la entrada pasiva de Na⁺ hacia el citosol de la célula se ve favorecida, especialmente cuando la concentración de Na⁺ es elevada en el suelo. Por el contrario, el eflujo de Na⁺ (es decir, la salida de Na⁺ al exterior de la célula) no es pasivo y requiere un gasto de energía (Fig. I8) (Maathuis *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2017). La entrada pasiva de Na⁺ tiene lugar a nivel de las células epidérmicas y corticales de la raíz. Tradicionalmente se han descrito tres posibles rutas de entrada de este catión al interior de la planta (Tester y Davenport, 2003). Dos de ellas son de tipo simplástico. En la primera, la vía simplasto propiamente dicha, el Na⁺ fluye de una célula a otra a través de plasmodesmos (canales especializados que atraviesan la membrana y la pared celular actuando como compuertas que facilitan y regulan el transporte de agua y solutos), mientras que en la segunda, la ruta transmembrana, el Na⁺ cruza las membranas plasmáticas, pasando a través de las paredes celulares mediante transportadores. La tercera ruta es de tipo apoplástico y se atribuye a la filtración de Na⁺ a través de interrupciones de la endodermis que permiten el movimiento de agua y solutos como el Na⁺ a través de la pared celular y los espacios intercelulares.

La banda de Caspary (banda de células endodérmicas suberinizadas) constituye un punto importante de control y regulación del transporte radicular de iones, ya que forma una barrera impermeable para el flujo apoplástico de solutos (Figs. I9 e I10), obligando a que el movimiento de agua e iones se realice mediante la vía simplasto (Maathuis *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2017). La importancia del flujo apoplástico en el flujo total de Na⁺ de la planta varía entre distintas especies y entre distintas condiciones de crecimiento. Por ejemplo, en arroz, esta vía se considera la principal ruta de entrada de Na⁺ a la planta, aportando hasta el 50% del flujo total de entrada de Na⁺ (Yeo *et al.*, 1987; Kronzucker y Britto, 2011), mientras que en otras plantas como el trigo, la entrada de Na⁺ a través de esta vía es 10 veces menor (García *et al.*, 1997).

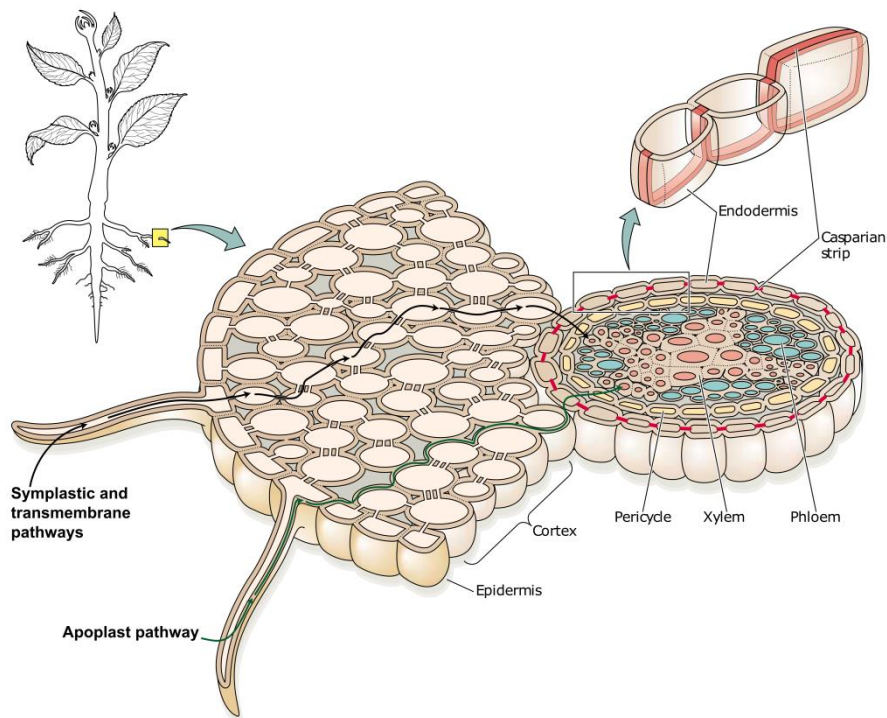


Figure I10. Pathways for Na^+ uptake by the root. Through the cortex, Na^+ may travel via the apoplast pathway, the transmembrane pathway, and the symplast pathway. In the symplast pathway, Na^+ flows between cells through the plasmodesmata without crossing the plasma membrane and in the transmembrane pathway, across the plasma membranes, with a short visit to the cell wall space. At the endodermis, the apoplast pathway is blocked by the Casparian strip. Extracted from Taiz & Zeiger (2010).

H^+ -ATPasa de la membrana plasmática

El transporte activo primario es llevado a cabo por una serie de bombas existentes en la membrana plasmática, que necesitan un gasto de energía, normalmente procedente de la hidrólisis de ATP (proceso liberador de energía), para transportar los solutos en contra del gradiente electroquímico existente a través de la membrana. En las células de plantas y hongos podemos encontrar la ATPasa, que opera como bomba de protones (H^+), desempeñando un papel crucial en la regulación de la concentración de H^+ y en el transporte de otros iones, ya que genera el gradiente electroquímico de H^+ existente a través de la membrana plasmática (necesario para el transporte activo de solutos). Las H^+ -ATPasas de la membrana plasmática pertenecen a una clase conocida como de tipo P (P-ATPasas), denominadas de esta forma porque se fosforilan durante el proceso de transporte (Gaxiola *et al.*, 2007; Fuglsang *et al.*, 2011). Estas bombas están formadas por una única subunidad proteica, que contiene 10 hélices trans-membrana y un gran dominio citoplasmático (Fuglsang *et al.*, 2011). Los genomas de *Arabidopsis* y arroz codifican 11 y 10 P-ATPasas, respectivamente (Axelsen, 2001; Arango *et al.*, 2003). La fuerza protón motriz generada por las P-ATPasas son responsables del potencial existente a través de la membrana plasmática, el cual es esencial para la captación de nutrientes por la raíz, la apertura estomática, la carga floemática y el crecimiento celular (Blumwald *et al.*, 2000; Gaxiola *et al.*, 2007; Mansour, 2014; Pedersen y Palmgren, 2017). Además de participar en la regulación de estos procesos fisiológicos, las P-ATPasas tienen un papel fundamental

en la adaptación de las plantas a condiciones de estrés por salinidad. Por ejemplo, una mayor actividad P-ATPasa en condiciones salinas repolariza la despolarización de la membrana plasmática provocada por el Na⁺. Esta respuesta se ha asociado fuertemente con la tolerancia a la salinidad (Ballesteros *et al.*, 1997; Mansour, 2014). El mantenimiento del potencial de la membrana plasmática en condiciones salinas a través de la actividad P-ATPasa interviene en la reducción de la carga neta de Na⁺ mediante la energización del antiportador Na⁺/H⁺, SOS1 implicado en la extrusión de Na⁺, ayudando así a recuperar la elevada razón K⁺/Na⁺ (Shi *et al.*, 2000, 2002; Sun *et al.*, 2009). En resumen, se ha documentado profusamente que en halófitas y glicófitas tolerantes existe una mayor actividad de las P-ATPasas, la cual se correlaciona con la tolerancia a la salinidad (Pons *et al.*, 2011; Mansour, 2014).

Transportadores de K⁺

Con respecto al transporte simplástico de Na⁺, como ya se ha mencionado anteriormente, el gradiente electroquímico existente a través de la membrana plasmática de las células vegetales favorece su transporte pasivo al citosol mediante canales y transportadores, compitiendo con el K⁺ por los sistemas de transporte de este último catión, que podrían transportar Na⁺ a baja afinidad. Existe un amplio consenso de que la mayoría de los transportadores de K⁺ presentan una alta selectividad para dicho catión, por lo que no parecen estar implicados en una entrada masiva de Na⁺ al simplasto de la raíz. Sin embargo, se sabe que el Na⁺ tiene un fuerte efecto inhibitorio sobre algunos de los sistemas de transporte específicos del K⁺, tales como AKT1, un canal de tipo KIR (*K⁺ Inward-Rectifying Channel*), siendo éste uno de los principales responsables de la captación de K⁺ en plantas (Fig. I11) (Hirsch, 1998; Fuchs *et al.*, 2005). Esto tiene obvias implicaciones en la reducción de la absorción de K⁺ y por tanto, en la razón K⁺/Na⁺ citosólica (Qi y Spalding, 2004; Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006; Shabala y Cuin, 2007). HAK5, un transportador de tipo HUP/HAK/KT, también podría estar implicado en dicha disminución de la absorción de K⁺, inducida por elevadas concentraciones de Na⁺ (Fig. I11) (Nieves-Cordones *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015b; Nieves-Cordones *et al.*, 2016). Además, la despolarización de la membrana causada por la gran acumulación de Na⁺ en el citoplasma provoca un aumento del eflujo de K⁺, posiblemente mediante la apertura de canales de K⁺ regulados por voltaje, tales como SKOR (*Stele K⁺ Outward Rectifying Channel*), en la raíz o GORK (*Guard Cell Outward-Rectifying K⁺ Channel*), en las hojas, contribuyendo nuevamente a la reducción de la razón K⁺/Na⁺ citosólica (Fig. I11) (Adams y Shin, 2014; Demidchik *et al.*, 2014). Por lo tanto, la habilidad de las células de las plantas para prevenir la despolarización de la membrana mediante el mantenimiento de un potencial más negativo en el interior, ayudando a retener el K⁺ en el interior celular (inhibiendo el eflujo de K⁺), constituye un mecanismo crucial de tolerancia a la salinidad (Janicka-Russak y Kabała, 2015).

Transportadores HKT2

La identidad de los transportadores implicados en la entrada masiva de Na^+ a la célula es todavía materia de debate (Apse y Blumwald, 2007; Yeo, 2007; Munns y Tester, 2008). Por ejemplo, algunos trabajos han atribuido a un transportador de la subfamilia 2 de HKT (HKT2;1) un papel relevante en la entrada de Na^+ en la planta (Fig. I11) (Tester y Davenport, 2003; Apse y Blumwald, 2007 y sus referencias). Este transportador se ha encontrado sólo en gramíneas (arroz y cebada), ubicado en el plasmalema de la epidermis y células corticales de la raíz y parece funcionar como un sistema de absorción de Na^+ de alta afinidad en la raíz cuando se dan condiciones de deficiencia de K^+ (Horie *et al.*, 2007). Sin embargo, HKT2;1 de gramíneas no parece constituir una vía masiva de entrada de Na^+ a la raíz, ya que se induce sólo cuando hay déficit de K^+ en el medio y se inhibe en condiciones milimolares de Na^+ (Horie *et al.*, 2007). En todo caso, parece ser un mero partícipe en la absorción de pequeñas cantidades de Na^+ para sustituir al K^+ en algunas de sus funciones (probablemente, las osmóticas), cuando la planta se encuentra en condiciones de deficiencia de K^+ (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006; Horie *et al.*, 2007).

Canales de cationes no selectivos (NSCC)

Según evidencias bioquímicas y electrofisiológicas, en los últimos años se ha llegado al consenso de que la entrada pasiva de Na^+ a las células de la raíz en condiciones de estrés por salinidad está mediada principalmente por una familia de canales catiónicos no selectivos (NSCC, *Non-Selective Cation Channels*) (Fig. I11) (Demidchik y Tester, 2002; Demidchik *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2015). Estos canales son ubicuos en plantas, siendo especialmente abundantes en la membrana plasmática, aunque también pueden encontrarse en endomembranas, fundamentalmente en el tonoplasto (Demidchik y Maathuis, 2007; Assaha *et al.*, 2017). Presentan una baja selectividad para el K^+ y el Na^+ en comparación con los canales de tipo KIR y SKOR. Sin embargo, la entrada de Na^+ a través de los NSCC es mucho más alta que la del resto de canales previamente mencionados, viéndose además fuertemente afectada por la presencia de concentraciones milimolares de Ca^{2+} . Ello explicaría en gran medida el alivio sintomático que induce el Ca^{2+} en los daños ocasionados por la salinidad (Demidchik *et al.*, 2002; Essah *et al.*, 2003; Horie y Schroeder, 2004; Almeida *et al.*, 2017). Los NSCC están presentes tanto en plantas como en animales, constituyendo un amplio y heterogéneo grupo de canales. Suelen mostrar una mayor selectividad para los cationes que para los aniones, pero, por lo general, no discriminan fuertemente entre distintos cationes monovalentes. Catalizan el movimiento pasivo de un amplio rango de cationes monovalentes, que en condiciones normales suelen ser impermeables (o poco permeables) a través de canales selectivos de Na^+ o de K^+ (Demidchik y Tester, 2002; Tester y Davenport, 2003; Shabala y Cuin, 2007; Davenport *et al.*, 2007; Assaha *et al.*, 2017). Además, se ha sugerido que una parte sustancial del eflujo de K^+ inducido por el exceso de Na^+ en el citoplasma de las células estaría mediado por estos NSCC (Fig. I11) (Shabala *et al.*, 2006; Demidchik *et al.*, 2014; Assaha *et al.*, 2017; Almeida *et al.*, 2017).

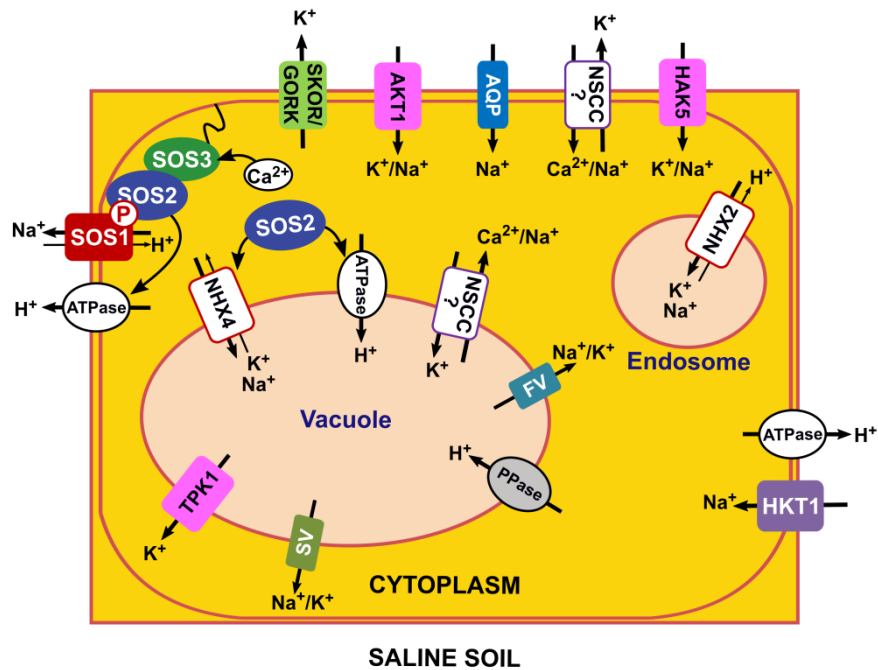


Figure I11. Schematic representation of Na^+ uptake (and K^+ efflux) in a classical glycophyte cell via Na^+ and/or K^+ transporters and channels under salt stress. SOS1, Salt Overly Sensitive 1; NHX, Na^+/H^+ Antiporters; ATPase, Plasma membrane and Vacuolar ATPase; PPase, Vacuolar Pyrophosphatase; HKT1, High Affinity Potassium Transporter; HAK5, High Affinity K⁺ Transporter 5; AKT1, Shaker K⁺ Channel; NSCC, Non-Selective Cation Channels; GORK, Guard cell Outward Rectifying K⁺ Channel; SKOR, Stellar K⁺ Outward Rectifying Channel; AQP, aquaporin (PIP2;1, Plasma membrane Intrinsic Protein 2;1); TPK1, Two-Pore K⁺ 1. Modified from Himabindu *et al.* (2016).

Acuaporinas

Investigaciones recientes han mostrado la existencia de una ruta adicional de entrada de Na^+ a las células, en la cual intervendrían las acuaporinas (Byrt *et al.*, 2017). Las acuaporinas de plantas son proteínas de membrana que transportan agua y una serie de solutos neutros (Chaumont y Tyerman, 2014). Algunas acuaporinas transportan sólo agua y otras transportan gases (CO_2 , amonio), metaloides (boro, silicio, arsénico), o especies de oxígeno reactivo (H_2O_2), siendo por tanto cruciales en la homeostasis hídrica de la planta y en la tolerancia a distintos tipos de estrés, entre los que se encuentra el estrés por salinidad (Fig. I12) (Chaumont y Tyerman, 2014; Chevalier y Chaumont, 2014; Li *et al.*, 2014). En animales, algunas acuaporinas también participan en el transporte de iones, tales como el Na^+ (Ikeda *et al.*, 2002), lo cual incentivó el estudio de este tipo de transporte también en acuaporinas de plantas. Recientemente se demostró que el transporte de Na^+ mediado por acuaporinas estaba realmente presente en plantas, o al menos en *Arabidopsis* (Byrt *et al.*, 2017). En este trabajo se estudió la acuaporina AtPIP2;1, una proteína intrínseca de la membrana plasmática de *Arabidopsis*, implicada en el cierre estomático, pero también altamente expresada en la membrana plasmática de las células epidérmicas de la raíz. Al expresar esta proteína en oocitos de *Xenopus laevis* se puso de manifiesto que inducía fuertemente la conductancia de Na^+ , aunque no quedó claro si presentaba o no una permeabilidad selectiva para el transporte de este catión. Estos hallazgos necesitan de más investigación para poder establecer la presencia de genes ortólogos de AtPIP2;1 en

otras plantas. De ser así, esta vía constituiría otra fuente potencial de entrada de Na^+ en plantas a través de la raíz, ya que además, en algunas plantas, los genes que codifican acuaporinas se inducen en condiciones de déficit hídrico, las cuales son también características del estrés por salinidad (Chaumont y Tyerman, 2014).

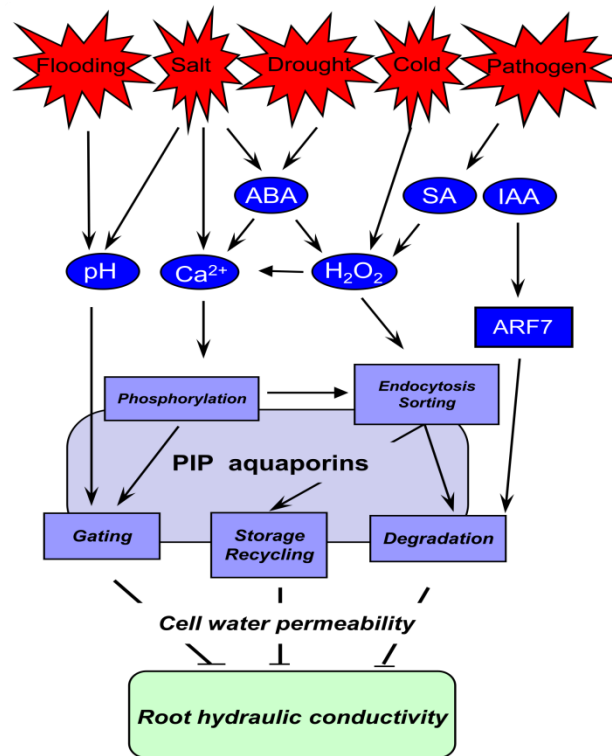


Figure I12. Signaling diagram of root hydraulic conductivity (L_{p_r}) regulation under various stress conditions. L_{p_r} is repressed by various stresses (e.g. flooding, salt, drought, cold or pathogen attack), which effects are mediated by phytohormones (ABA, SA) or signaling intermediates (cytosolic pH, Ca^{2+} and H_2O_2). These signals can alter the modification status (for instance, phosphorylation) and/or the sub-cellular dynamics (endocytosis and intracellular sorting) of PIP aquaporins. For the sake of simplicity, the transcriptional up- or down-regulation of specific isoforms by several of the indicated stresses or hormones is not shown. PIP, Plasma membrane Intrinsic Proteins; ABA, Abscissic Acid; SA, Salicylic Acid; IAA, Indoleacetic Acid. Taken from Li *et al.* (2014).

I3.1.2. Eflujo de Na^+ : SOS1

Una vez que el Na^+ entra al citoplasma de las células de la epidermis radical, se mueve radialmente hacia la estela. Allí, es cargado en el xilema y llevado hacia la parte aérea de la planta, a través del tallo, mediante la corriente de transpiración. Restringir el movimiento radial de Na^+ a través de la raíz reduce en una gran medida la cantidad de este catión que es cargada en el xilema, reduciendo así la cantidad de Na^+ que llega a la parte aérea de la planta (Assaha *et al.*, 2017).

Antiportadores Catión/ H^+ (SOS1)

El antiportador Na^+/H^+ SOS1 (*Salt Overly Sensitive 1*), localizado en las células de la epidermis de la raíz, ofrece la primera línea de resistencia a la absorción de Na^+ , mediante la extrusión de dicho catión al medio externo (Shi *et al.*, 2002; Quintero *et al.*, 2002). Se piensa que este antiportador podría actuar a modo de sensor de Na^+ , aunque su

mecanismo de acción todavía no se conoce por completo (Shi *et al.*, 2000). Lo que sí parece estar claro es que SOS1 forma parte de una de las principales rutas reguladoras de la homeostasis del Na⁺ y el K⁺ en condiciones salinas (Zhu, 2002, 2003, Martínez-Atienza *et al.* 2007; Olías *et al.*, 2009a, 2009b, Oh *et al.*, 2009, 2010; Katschnig *et al.*, 2015). En esta ruta reguladora, además de SOS1, están implicadas las proteínas SOS2, una serina/treonina proteína quinasa (Liu *et al.*, 2000), y SOS3, una proteína miristoilada que une calcio y que teóricamente actúa a modo de sensor de Na⁺, activando el eflujo de este catión (a cambio de H⁺) hacia el medio externo o hacia la vía apoplasto (Figs. I9, I11 e I13) (Shi *et al.*, 2002; Zhu, 2002). SOS3 detecta los cambios en la concentración de Ca²⁺ citosólico producidos por el estrés salino, interaccionando con el dominio auto-inhibitorio de SOS2 (CIPK24), un miembro de la familia SnRK (*Sucrose nonfermenting-Related serine/threonine Kinase*) (Pardo y Rubio, 2011; Zhu, 2002, 2003). Esta interacción resulta en la formación del complejo SOS3/SOS2, estimulando su actividad quinasa, induciendo la fosforilación y consiguiente activación del antiportador SOS1, implicado en el eflujo de Na⁺ a cambio de H⁺ desde el citosol de las células de la raíz hacia el medio externo o hacia la vía apoplástica (Quintero *et al.*, 2002; Zhu, 2002, 2003). Esta ruta ocurre tanto en las raíces como en la parte aérea de las plantas, aunque presenta algunas diferencias con respecto a la proteína sensora de Ca²⁺. En la raíz, el sensor es SOS3, mientras que en las hojas, SOS3 es reemplazado por un ortólogo, el CBL10 (Fig. I9) (Quan *et al.*, 2007; Olías *et al.*, 2009b; Pardo y Rubio, 2011). Por lo tanto, aunque en la ruta SOS el antiportador SOS1 está efectivamente implicado en el transporte de Na⁺, los complejos SOS3/SOS2 o CBL10/SOS2 son necesarios para su actividad antiportadora (Quintero *et al.*, 2002). Esto implica que a la hora de realizar estudios funcionales sobre la actividad de SOS1 haya que estudiar también los otros dos componentes de esta ruta (Quintero *et al.*, 2002).

Por otro lado, parece ser que la ruta SOS, a través de SOS2, independientemente de SOS3; también facilita la compartimentación de Na⁺ en las vacuolas estimulando la actividad translocadora de H⁺ de la V-ATPasa y la actividad antiportadora de NHX2 y NHX4 (Figs. I9 e I13; Qiu *et al.*, 2004; Batelli *et al.*, 2007; Huertas *et al.* 2012). Evidencias genéticas sugieren que SOS1 también regula de forma positiva la actividad AVP1, interviniendo de igual manera en la acumulación vacuolar de Na⁺ y por tanto, en la tolerancia de la planta a la salinidad (Fig. I13) (Undurraga *et al.*, 2012).

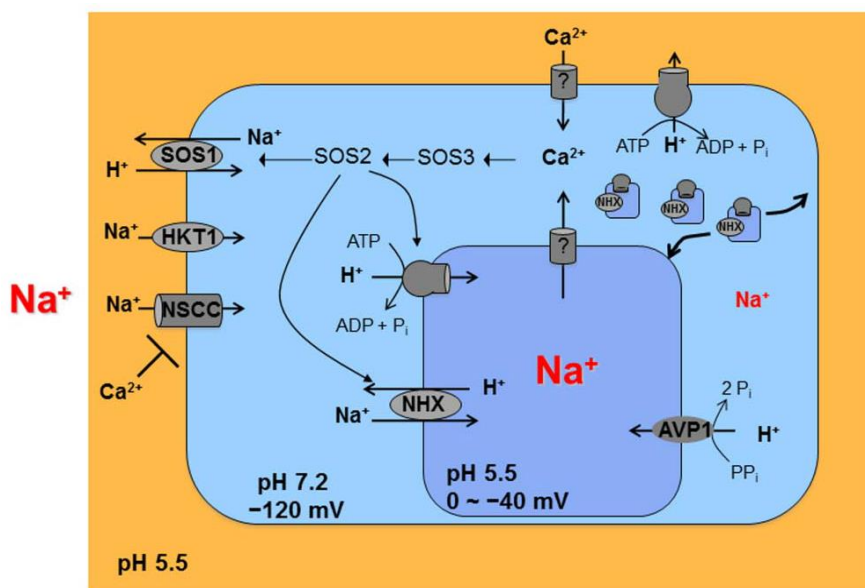


Figure I13. Transport proteins that facilitate intracellular Na^+ homeostasis at high Na^+ levels. H^+ pumps at the plasma membrane (P-type ATPase) and tonoplast (V-type ATPase and AVP1 pyrophosphatase) generate the H^+ electrochemical potential, responsible for steady-state pH gradients and membrane potentials. These pumps couple the energy from ATP hydrolysis to H^+ transport across membranes. Intracellular Na^+ uptake occurs, among others, through nonselective cation channels (NSCC), the Na^+ transporter HKT1 and high affinity K^+ uptake systems by electrophoretic flux down the Na^+ gradient. High NaCl increases cytosolic Ca^{2+} by uptake from the apoplast or release from the vacuole and other intracellular storage compartments. Ca^{2+} binds to the sensor-like protein SOS3, which facilitates interaction with and activates the serine/threonine protein kinase SOS2. The SOS2-SOS3 complex associates with the plasma membrane and SOS2 phosphorylates SOS1 to activate the Na^+/H^+ antiporter and Na^+ efflux by secondary active transport. SOS2 activates the vacuolar ATPase (V-ATPase) and vacuolar Na^+/H^+ antiporter NHX exchangers, which compartmentalizes Na^+ into vacuoles. A vacuolar pyrophosphatase (AVP1) also transports H^+ into the vacuolar lumen to establish H^+ electrochemical potential. A V-ATPase and NHX exchanger(s) are involved in Na^+ compartmentalization into endosomes that serve as prevacuoles or vesicles for exocytosis. Na^+ compartmentalization into the vacuole/endosomes facilitates osmotic adjustment and detoxifies the cytoplasm. Coordination of the protein transport function at the plasma membrane and tonoplast restricts net intracellular Na^+ uptake to a rate that is within the capacity of cells to compartmentalize Na^+ , limiting its accumulation in the cytoplasm. Taken from Hasegawa (2013).

I3.1.3. Compartimentación vacuolar de Na^+ : NHX1

Como ya se ha mencionado anteriormente, la acumulación excesiva de Na^+ en el citoplasma es perjudicial para las células. Una importante estrategia para eliminar el exceso de Na^+ citosólico es la compartimentación de este catión en las vacuolas. De esta forma, se genera turgencia en las células mediante el ajuste osmótico con las sales almacenadas y se evita la toxicidad iónica producida por el Na^+ en el citoplasma. Por ello, la compartimentación de Na^+ en las vacuolas, que ocurre en todos los tejidos de la planta, constituye otro de los principales mecanismos implicados en la tolerancia de las plantas a la salinidad, ya que ayuda a mantener una elevada razón K^+/Na^+ en el citoplasma de las células (Zhu, 2003; Apse y Blumwald, 2007; Munns y Tester, 2008; Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009; Bassil *et al.*, 2012). Además, se sabe que tanto en plantas halófitas como en glicófitas tolerantes existe una clara correlación entre la compartimentación vacuolar del

Na⁺ y la tolerancia a la salinidad (Ballesteros *et al.*, 1996, 1997; Blumwald *et al.*, 2000). Sin embargo, la retención del Na⁺ en las vacuolas supone una difícil tarea, ya que este catión tiende a salir nuevamente al citoplasma mediante los canales SV y FV (*Slow Vacuolar* y *Fast Vacuolar*, respectivamente). Por ello, estos canales se han asociado con la sensibilidad a la salinidad (Isayenkov *et al.*, 2010; Bonales-Alatorre *et al.*, 2013; Pottosin y Dobrovinskaya, 2014). La inclusión de Na⁺ en la vacuola se lleva a cabo por la acción de sistemas antiporte Na⁺/H⁺, energizados por el gradiente electroquímico de H⁺ generado por las ATPasas y PPasas del tonoplasto, las cuales pueden trabajar alternativamente o en paralelo (Apse y Blumwald, 2007; Munns y Tester, 2008; Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009), y serán brevemente revisadas a continuación.

H⁺-ATPasa del tonoplasto

De los tres tipos de bombas de protones que se pueden encontrar en las células de plantas (P-ATPasa, V-ATPasa y PPasa), la H⁺-ATPasa de la vacuola (V-ATPasa) es la más compleja (Pardo *et al.*, 2006; Gaxiola *et al.*, 2007; Krebs *et al.*, 2010). Las V-ATPasas suelen estar asociadas a los sistemas de endomembranas, acidificando y generando una fuerza protón motriz dentro de diversos compartimentos celulares (vacuola, retículo endoplasmático y red de cisternas del aparato de Golgi) (Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009). Sin embargo, también se han encontrado V-ATPasas asociadas a la membrana plasmática de las células (Hanitzsch *et al.*, 2007). La habilidad de las V-ATPasas para mantener la homeostasis del pH citosólico y acidificar los compartimentos intracelulares (especialmente la vacuola) es crucial durante procesos esenciales, tales como el crecimiento y la elongación celular (Hanitzsch *et al.*, 2007). Las V-ATPasas están formadas por varias subunidades proteicas, agrupadas en dos subcomplejos (V₁ y V₀). El subcomplejo V₁ consta de ocho subunidades (A, B, C, D, E, F, G y H), responsables de la hidrólisis de ATP y el subcomplejo integral de membrana V₀ consiste en un máximo de seis subunidades distintas (a, c, c', c'', d y e) responsables de la translocación del protón (Fig. I14) (Gaxiola *et al.*, 2007). El complejo V₁ consiste en: 1) una cabeza globular hexamérica, con tres copias alternantes de las subunidades A y B en forma de anillo; 2) un tallo rotacional central, compuesto de una única copia de las subunidades D y F; y 3) un tallo externo, compuesto por las subunidades C, E, G y H. Las subunidades A y B median la hidrólisis de ATP. Ambos tallos (el rotacional y el externo) conectan el complejo V₁ al complejo V₀ (insertado en la membrana). El complejo V₀ consiste en seis o más subunidades, que también están agrupadas en forma de anillo. Cada complejo V₀ contiene una copia de las subunidades a, d y e (Fig. I14) (Hanitzsch *et al.*, 2007; Beyenbach y Wiczorek, 2006). La V-ATPasa es la bomba más abundante en el tonoplasto y se sabe que su actividad es modulada para hacer frente a los cambios ambientales y metabólicos (Ratajczak, 2000; Almeida *et al.*, 2017). Por ejemplo, en condiciones salinas, muchas especies de plantas presentan un aumento de la actividad V-ATPasa (Matsumoto y Chung, 1988; Ballesteros *et al.*, 1996, 1997; Silva y Gerós, 2009). La V-ATPasa proporciona la fuerza motriz necesaria para la compartimentación vacuolar del Na⁺, proceso relacionado con la actividad antiportadora de NHX1 (Jiang *et al.*, 2010; Bassil y Blumwald, 2014). No obstante, el papel de la V-ATPasa en la acumulación de Na⁺ se ha puesto en

duda, al observarse que mutantes de pérdida de función para algunas de sus subunidades no presentaron una acumulación diferencial de Na^+ en las vacuolas, si bien se requirió para un eficiente almacenaje de nutrientes (Krebs *et al.*, 2010).

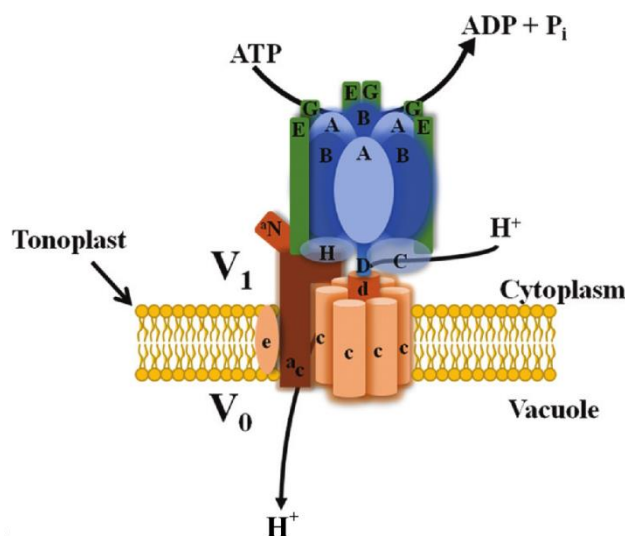


Figure I14. Structural model of the plant V-ATPase. The peripheral V1 complex (blue) and the membrane integral V0 complex (orange) are linked through a peripheral stalk formed by subunits A, C, E, G and H. Hydrolysis of ATP is coupled with H^+ transport to the vacuole. Taken from Almeida *et al.* (2017).

H^+ -PPasa

Las H^+ -pirofosfatasas (H^+ -PPasas) son proteínas de una única subunidad, altamente hidrofóbicas, que junto con las V-ATPasas del tonoplasto, generan el gradiente de protones a través de la vacuola, las cisternas del aparato de Golgi y la membrana plasmática, utilizando energía procedente de la hidrólisis de moléculas de pirofosfato (PPi) (Gaxiola *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2012). Las plantas tienen dos tipos distintos de H^+ -PPasas, las de tipo I y las de tipo II. Las H^+ -PPasas de tipo I dependen de la concentración citosólica de K^+ para llevar a cabo su actividad y son moderadamente sensitivas a inhibición por Ca^{2+} , mientras que las de tipo II son independientes de la concentración de K^+ , pero son extremadamente sensibles a la concentración de Ca^{2+} (Gaxiola *et al.*, 2012). El genoma de *Arabidopsis* codifica dos H^+ -PPasas: una de tipo I (AVP1) y otra de tipo II (AVP2) (Drozdowicz *et al.*, 2000) y el de arroz también codifica dos H^+ -PPasas: OVP1 y OVP2 (Sakakibara *et al.*, 1996). Sin embargo, se ha propuesto la existencia de más isoformas (Choura and Rebai, 2005). Se ha sugerido que las H^+ -PPasas de tipo I participarían principalmente en la acidificación de las vacuolas (Gaxiola *et al.*, 2007). Sin embargo, estas PPasas también se han encontrado en la membrana plasmática (Ratajczak *et al.*, 1999; Alexandersson *et al.*, 2004). Por otro lado, las H^+ -PPasas de tipo II de *Arabidopsis* parecen estar localizadas únicamente en el aparato de Golgi (Mitsuda *et al.*, 2001).

En relación al estrés salino, muchos trabajos han mostrado que la acumulación de iones en las vacuolas constituye un mecanismo clave en la tolerancia a dicho estrés,

dependiente del establecimiento de un gradiente electroquímico de H⁺ generado por las H⁺-PPasas de la vacuola (Ballesteros *et al.*, 1996; Gaxiola *et al.*, 2012). El hecho de que la V-H⁺-PPasa utilice PPi como fuente de energía, una moneda energética muy barata, además de ser un metabolito de desecho procedente de las reacciones de biosíntesis del DNA, sugiere que el mantenimiento del gradiente electroquímico de H⁺ por la PPasa podría ser clave para el transporte activo de Na⁺ hacia el interior de la vacuola, mediante el antiporte Na⁺/H⁺, reduciendo así los niveles de Na⁺ en el citoplasma celular y con ahorro de ATP (Gaxiola *et al.*, 2012). Además, la V-H⁺-PPasa tiene la ventaja añadida de estar formada por un único polipéptido, lo que le hace ser un sistema más fácilmente manipulable desde el punto de vista biotecnológico que la V-ATPasa, de mayor complejidad estructural y reguladora (Pardo *et al.*, 2006; Gaxiola *et al.*, 2007; Krebs *et al.*, 2010). Efectivamente, varios trabajos han puesto de manifiesto el papel de esta bomba de H⁺ en la tolerancia, no sólo a la salinidad, sino también a la sequía, en base a su capacidad de energizar la acumulación de osmolitos iónicos y disminuir el potencial osmótico vacuolar (Gaxiola *et al.*, 2012; Schilling *et al.*, 2013).

Antiportadores Catión/H⁺ (NHX1)

Como ya se ha comentado previamente, la acumulación de Na⁺ en el citosol que se produce bajo condiciones salinas es muy perjudicial para las células (Roy *et al.*, 2014). En este sentido, para contrarrestar esta acumulación, es de gran importancia la actuación de los antiportadores catión/H⁺ de tipo NHXs, que secuestran Na⁺ en las vacuolas acoplados al gradiente electroquímico de H⁺ generado por la acción de las V-H⁺-ATPasas y las V-H⁺-PPasas del tonoplasto (Figs. I9 e I11) (Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009; Bassil *et al.*, 2012; Gaxiola *et al.*, 2012). Los miembros de la familia NHX se consideran de gran importancia para el mantenimiento de la homeostasis iónica y el pH, el crecimiento y desarrollo, las funciones estomáticas, el tráfico de proteínas y vesículas y la tolerancia al estrés abiótico (Jiang *et al.*, 2010; Huertas *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015a). El almacenamiento de Na⁺ en las vacuolas normalmente conlleva una liberación de K⁺ al citosol, que se realiza mediante los canales TPK (*Two-Pore K⁺ 1*), SV y FV (Fig. I13). Sin embargo, la retención de Na⁺ en las vacuolas supone una difícil tarea, ya que este catión tiende a salir nuevamente al citoplasma mediante los canales FV y SV (*Fast Vacuolar* y *Slow Vacuolar*, respectivamente) (Fig. I13). Por ello, estos canales han sido asociados con la sensibilidad a la salinidad (Isayenkov *et al.*, 2010; Bonales-Alatorre *et al.*, 2013; Pottosin y Dobrovinskaya, 2014).

AtNHX1 fue el primer antiportador vacuolar clonado de plantas, siendo inicialmente identificado como un antiportador Na⁺/H⁺ del tonoplasto (Apse *et al.*, 1999; Gaxiola *et al.*, 1999; Quintero *et al.*, 2000). Este antiportador aumentaba la tolerancia a la salinidad cuando se sobreexpresaba en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, tomate y *Brassica*, lo cual sugería que AtNHX1 era la proteína responsable de la compartimentación de Na⁺ en la vacuola (Apse *et al.*, 1999; Zhang y Blumwald, 2001; Zhang *et al.*, 2001). Sin embargo, estudios posteriores pusieron de manifiesto que esta proteína, además, acepta K⁺ como sustrato, con una afinidad similar a la del Na⁺ (Venema *et al.*, 2002). Estos datos, junto con los obtenidos en mutantes insercionales para este gen sugerían que AtNHX1

tenía además un papel importante en la regulación de la homeostasis de K^+ y el pH (Venema *et al.*, 2002; Apse *et al.*, 2003; Sottosanto *et al.*, 2004; Pardo *et al.*, 2006; Leidi *et al.*, 2010). Además, tras reevaluar el papel de AtNHX1 en la tolerancia a la salinidad mediante la sobreexpresión del mismo en *Arabidopsis* y tomate (Yang *et al.*, 2009; Leidi *et al.*, 2010; De Luca *et al.*, 2017), no se reprodujeron los resultados previamente obtenidos en ambas especies (Apse *et al.*, 1999; Zhang y Blumwald, 2001). En tomate, líneas sobreexpresoras de AtNHX1 mostraron una mayor absorción de K^+ que las líneas control a expensas del pool citosólico de K^+ , que fue menor en las plantas transgénicas (Leidi *et al.*, 2010; De Luca *et al.*, 2017). Esto podría ser debido a un aumento en la actividad antiportadora K^+/H^+ en la vacuola (Venema *et al.*, 2002). Asimismo, las líneas sobreexpresoras exhibían un fenotipo paradójico de deficiencia de K^+ , que inducía una señal de deficiencia de este catión, estimulando por tanto una mayor absorción de K^+ por las raíces (Leidi *et al.*, 2010; De Luca *et al.*, 2017).

Actualmente, se considera que la familia de antiportadores NHX de *Arabidopsis* está formada por seis miembros, que se pueden encontrar en vacuolas y endosomas (Pardo *et al.*, 2006; Qiu, 2016). AtNHX1, junto a las isoformas 2, 3 y 4, pertenecen a la clase I, localizándose en la membrana tonoplastidial y siendo caracterizadas como transportadores tanto de K^+ como de Na^+ , presentando K_m similares para ambos sustratos (Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010), mientras que las isoformas 5 y 6 pertenecen a la clase II, ubicándose en el sistema endosomal, Golgi y vesículas endocitóticas, presentando una mayor afinidad por el K^+ que por el Na^+ (Venema *et al.*, 2002, 2003a; Pardo *et al.*, 2006). Esto apoya la idea de que los antiportadores NHX intervienen principalmente en el transporte K^+/H^+ (más que en el Na^+/H^+), ya que habitualmente, la concentración de K^+ en el citoplasma tiende a ser mayor que la de Na^+ , incluso en condiciones salinas (Jiang *et al.*, 2010; Pardo y Rubio 2011, Maathuis *et al.*, 2014). Miembros de nuestro laboratorio han identificado en tomate los genes LeNHX1, 2, 3 y 4, que codifican proteínas antiportadoras K^+ , Na^+/H^+ de membranas intracelulares (Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009; Gálvez *et al.*, 2012). LeNHX2 fue el primer antiportador K^+/H^+ de clase II, descrito en plantas, localizado en membranas de Golgi o prevacuolas (Venema *et al.*, 2003a). La sobreexpresión de este transportador en *Arabidopsis* y tomate transgénico confiere una mayor tolerancia a la salinidad, mejorando la nutrición de K^+ en estas plantas (Rodríguez-Rosales *et al.*, 2008; Huertas *et al.*, 2013).

Además de AtNHX1, en el genoma de *Arabidopsis* se han identificado un gran número de genes que codifican proteínas de la superfamilia de antiportadores catión/protón (CPA, *Cation/Proton Antiporters*), que pueden intercambiar Ca^{2+} , Na^+ y K^+ con H^+ (Mäser *et al.*, 2001). Estas proteínas pueden dividirse en las siguientes subfamilias: CPA1, constituida por las proteínas tipo NHX y NhaP/SOS1; CaCA, que contiene los genes que codifican a las proteínas CAX, EF-CAX, CCX y MHX (Gaash *et al.*, 2013; Morris *et al.*, 2008; Emery *et al.*, 2012); CCC, que funciona como un simportador $NaCl/KCl$ (K^+ , Na^+ y Cl^-) (Colmenero-Flores *et al.*, 2007); NhaD, que funciona como un antiportador Na^+/H^+ (Barrero-Gil *et al.*, 2007; Furumoto *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2014); y CPA2,

constituida por transportadores de tipo CHX y KEA (Pardo *et al.*, 2006; Hall *et al.*, 2006; Aranda-Sicilia *et al.*, 2012, 2016). El número de genes CHX ha aumentado drásticamente desde las algas carofitas a las plantas con flor. Se sabe que estos genes son necesarios en procesos reproductivos y vegetativos que están relacionados con la supervivencia en la tierra (Chanroj *et al.*, 2012; Padmanaban *et al.*, 2007). Además, estos genes parecen estar implicados en la tolerancia a la salinidad y la nutrición del K⁺ (Cellier *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2008). Por el contrario, los genes KEA se han mantenido relativamente constantes, aumentando de 3 a 7 genes desde las algas unicelulares hasta las plantas con flor. Esto indica que los transportadores KEA tienen funciones muy conservadas (Chanroj *et al.*, 2012). Aranda-Sicilia y colaboradores (2012) realizaron el primer estudio funcional de una proteína KEA de plantas (AtKEA2), que constituye un antiportador catión/H⁺ del cloroplasto. Este estudio sugiere que AtKEA2 está implicado en la homeostasis del K⁺ y del pH en cloroplastos y plastidios. Además, en un estudio posterior, encontraron que AtKEA1 y AtKEA2 parecen ser esenciales para el correcto desarrollo y la organización estructural del sistema de membranas del tilacoide (Aranda-Sicilia *et al.*, 2016).

Por tanto, es muy probable que NHX1 (y/o NHX2-4) no sea el único antiportador responsable de la acumulación vacuolar de Na⁺, y que algunas de las proteínas previamente mencionadas pudieran estar también implicadas. De ahí que sea necesario investigar más a fondo la función de todos estos transportadores para conocer la relevancia de cada uno de ellos en la acumulación vacuolar de Na⁺ como proceso clave implicado en la tolerancia del tejido a la salinidad (Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009; Munns *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2017).

I3.1.4. Transporte de Na⁺ larga distancia: SOS1 y HKT

El transporte de Na⁺ a través de la membrana plasmática de las células del parénquima del xilema (XPC, del inglés *Xylem Parenchyma Cells*) constituye el último paso del movimiento radial de los iones desde el suelo hacia la corriente de transpiración (Tester y Davenport, 2003). Se estima que la diferencia de potencial existente entre las XPC y los vasos del xilema es de -100 mV (De Boer, 1999), lo que hace que el proceso de carga del Na⁺ al xilema constituya un transporte activo secundario en condiciones normales (es decir, sin estrés salino). Sin embargo, en condiciones salinas, la carga xilemática podría ocurrir de forma pasiva, a través del gradiente electroquímico de Na⁺. Por tanto, una elevada concentración de Na⁺ en el citoplasma de las XPC facilitaría el movimiento de Na⁺ hacia el xilema (Shi *et al.*, 2002; Wegner *et al.*, 1999). Se ha sugerido que el antiportador SOS1 participa en la carga de Na⁺ en el xilema (Fig. I9), tanto en glicófitas como en halófitas, especialmente bajo condiciones de moderada salinidad (Shi *et al.*, 2002; Munns y Tester, 2008; Olías *et al.*, 2009a, 2009b; Bonales-Alatorre *et al.*, 2013). Parece ser que el transportador HKT1 está implicado principalmente en el proceso opuesto, es decir, en la descarga de Na⁺ desde el xilema hacia las XPC (Fig. I9), siendo también esta función clave en la tolerancia a la salinidad (Mäser *et al.*, 2002; Berthomieu *et al.*, 2003; Rus *et al.*, 2004; Sunarpi *et al.*, 2005; Moller *et al.*, 2009; Plett *et al.*, 2010). Debido a la actividad antagónica de estos dos transportadores, se ha hipotetizado que podría

existir una coordinación entre las rutas de SOS1 y HKT1 en el transporte de Na⁺ a larga distancia a través del xilema, estando ambos transportadores implicados en la regulación de la homeostasis del Na⁺ (y del K⁺) y por tanto, en la tolerancia de las plantas a la salinidad (Rus *et al.*, 2004; Pardo *et al.*, 2006; Olías *et al.*, 2009b; Wang *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2015).

Antiportadores SOS1

Como ya se ha comentado anteriormente, SOS1 actúa en el proceso de eflujo de Na⁺ a través de la raíz (ver apartado I3.1.2). Sin embargo, según la localización de la expresión de SOS1 y la caracterización fisiológica de plantas mutantes *sos1*, se ha sugerido que este transportador interviene en el transporte de Na⁺ a larga distancia en *Arabidopsis* (Shi *et al.*, 2002). La localización de la expresión de SOS1 fue analizado utilizando la fusión promotor:*GUS*. La actividad de *GUS* se detectó principalmente en los tejidos internos que rodean los haces vasculares en toda la planta (Shi *et al.*, 2002). El análisis de los cortes transversales en la raíz reveló que la actividad de *GUS* se localizaba principalmente en el periciclo y en las XPC (Shi *et al.*, 2002). En las secciones transversales de tallo y de peciolo, la actividad de *GUS* también se restringía a las XPC, en el límite entre el xilema y simplasto (Shi *et al.*, 2002). Además de asociada a los haces vasculares, la actividad de SOS1 también se observó en las células de la epidermis del ápice de la raíz (Shi *et al.*, 2002). Como las células indiferenciadas del ápice de la raíz carecen de vacuolas lo suficientemente grandes como para una compartimentación significativa de Na⁺, SOS1 podría ser crítico para evitar que este catión se acumule en estas células mediante la extrusión activa de Na⁺ a la solución del suelo (Shi *et al.*, 2002; Almeida *et al.*, 2017). La expresión preferencial de SOS1 en las células que rodean la vasculatura de la planta sugiere que este transportador interviene en el transporte de Na⁺ a larga distancia, ya que el Na⁺ es transportado desde la raíz hasta la parte aérea a través del xilema (Shi *et al.*, 2002; Almeida *et al.*, 2017). En plantas mutantes *sos1* que crecieron en presencia de una alta concentración de Na⁺ (100 mM NaCl), las raíces y la parte aérea acumularon más sodio que en las plantas *wild-type* (Shi *et al.*, 2002). La concentración de Na⁺ en la savia del xilema (savia bruta) fue aumentando con el tiempo, pero siempre fue mayor en los mutantes *sos1* (Shi *et al.*, 2002). En contraste, las plantas mutantes *sos1* acumularon menos Na⁺ que las *wild-type* en respuesta a bajos niveles de sal (25 mM NaCl) (Shi *et al.*, 2002). Estos resultados contradictorios se han explicado en base a que SOS1 podría intervenir en la carga de Na⁺ al xilema, mediante el control del Na⁺ que llega a la parte aérea y el almacenamiento en las células del mesófilo en condiciones de estrés salino moderado, mientras que, en condiciones salinas extremas, se desajusta el mecanismo de exclusión de Na⁺ en la raíz, generándose un fuerte gradiente electroquímico de Na⁺ a través del límite entre xilema y simplasto, que puede ser de mayor magnitud que el gradiente de pH, lo cual provocaría una inversión de la actividad de SOS1 y una recuperación de Na⁺ del xilema para evitar su sobreacumulación en la corriente de transpiración (Shi *et al.*, 2002). Sin embargo, esta última hipótesis sobre la actividad bidireccional de SOS1 no parece ser muy plausible, no sólo por consideraciones de tipo termodinámico, sino también, por el

hecho de que dicha función parece ser llevada a cabo por transportadores de tipo HKT, como se verá en el siguiente apartado.

Además de en *Arabidopsis*, la intervención de SOS1 en el transporte de Na⁺ a larga distancia y su papel en la tolerancia a la salinidad se ha descrito en otras especies, tales como *Thellungiella salsuginea*, tomate (*Solanum lycopersicum*) y la xerófita *Zygophyllum xanthoxylum* (Oh *et al.*, 2009; Amtmann, 2009; Olías *et al.*, 2009a, 2009b; Ma *et al.*, 2013). *T. salsuginea* es un pariente cercano de *Arabidopsis*, pero a diferencia de ésta, crece bien en condiciones extremas de temperatura, salinidad y sequía, así como en condiciones limitantes de nitrógeno (Oh *et al.*, 2009). Así, la pérdida de función de *TsSOS1* ocasiono un fenotipo de pérdida de halofitismo en *Thellungiella*, mostrando una vez mas su importante papel en la tolerancia a la salinidad (Oh *et al.*, 2009). Por otro lado, Olías *et al.* (2009a) identificaron *SISOS1* en tomate, utilizando la expresión heteróloga en levaduras para confirmar que *SISOS1* era un homólogo funcional de *AtSOS1*. En dicho trabajo se evaluó el papel de *SISOS1* en el transporte de Na⁺ a larga distancia mediante el silenciamiento génico post-transcripcional, observándose que las plantas transgénicas de tomate, con una baja expresión de *SISOS1*, presentaron una mayor disminución de la tasa de crecimiento en comparación con las plantas WT en condiciones salinas (Olías *et al.*, 2009a). Esta disminución del crecimiento se correlacionaba con una mayor acumulación de Na⁺ en hojas y raíces y una menor en tallos en las plantas silenciadas (Olías *et al.*, 2009a). Estos resultados demostraban que el antiportador *SISOS1* no sólo es esencial en el mantenimiento de la homeostasis iónica en condiciones salinas, sino también para la correcta distribución del Na⁺ entre los diferentes órganos de la planta (Olías *et al.*, 2009a).

Utilizando un abordaje experimental similar al de tomate, Ma *et al.* (2013) obtuvieron resultados similares sobre la función de SOS1 en el transporte a larga distancia, utilizando la xerófita *Z. xanthoxylum*. Al igual que en tomate, las plantas silenciadas mostraron un fenotipo de hipersensibilidad a la sal, asociado a una mayor cantidad de Na⁺ en las raíces y una menor en hojas y tallos que las plantas WT cuando se aplicó un tratamiento salino de 50 mM NaCl (Ma *et al.*, 2013). Sin embargo, las plantas silenciadas para *ZxSOS1* mostraron una menor concentración de K⁺ en hojas y raíces que las WT a 50 mM de NaCl, así como un incremento selectivo del transporte de K⁺ sobre el de Na⁺ desde la raíz al tallo y una disminución del transporte de dicho catión desde el tallo hacia las hojas en comparación con las plantas WT (Ma *et al.*, 2013). Estos resultados sugerían que *ZxSOS1* era esencial en el transporte de Na⁺ a larga distancia y la distribución espacial de Na⁺ y K⁺ a lo largo de la planta, así como para el mantenimiento de la homeostasis del K⁺ en *Z. xanthoxylum*.

En resumen, todos estos trabajos sugieren que SOS1, además de actuar en el eflujo de Na⁺ a través de la raíz, participa en el transporte de Na⁺ a larga distancia mediante la carga de este catión al xilema y su posterior distribución entre los diferentes órganos de la planta, reteniendo Na⁺ en los tallos en condiciones salinas para evitar que dicho catión alcance los tejidos fotosintéticos (Assaha *et al.*, 2017; Almeida *et al.*, 2017).

Transportadores HKT1

Como se ha mencionado anteriormente, además de SOS1, los transportadores de tipo HKT también juegan un importante papel en el control la homeostasis de Na^+ y K^+ a través de su participación en el transporte de Na^+ a larga distancia (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006; Pardo *et al.*, 2006; Horie *et al.*, 2009; Hauser y Horie, 2010). Aunque son homólogos a los transportadores de K^+ de tipo TRK de hongos (Rodríguez-Navarro, 2000), los transportadores HKT catalizan el transporte Na^+ en plantas (mostrando permeabilidad al K^+ dependiendo del tipo de isoforma), localizándose en el plasmalema de diversos tipos celulares, dependiendo de la especie analizada (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006; Horie *et al.*, 2009; Hauser y Horie, 2010).

Se han propuesto dos modelos complementarios que explican el mecanismo de acción de HKT en *Arabidopsis* (Berthomieu *et al.*, 2003; Sunarpi *et al.*, 2005). En el primero de ellos, denominado “modelo de recirculación a través del floema”, AtHKT1;1 carga Na^+ en las células del floema de la parte aérea para que sea transportado hacia la raíz a través de la corriente floemática, evitando de esta manera la acumulación de Na^+ en exceso en la parte aérea. Sin embargo, en este modelo, la recirculación de Na^+ a través del floema no excede el 10% del total de Na^+ cargado en la corriente de transpiración del xilema (Fig. I9) (Berthomieu *et al.*, 2003). En el segundo modelo, se ha propuesto que AtHKT1;1 participa en la descarga de Na^+ desde la corriente de transpiración hacia las XPC de la raíz, disminuyendo así la cantidad de Na^+ que llega a los tejidos fotosintéticos y mejorando por tanto la tolerancia a la salinidad (Fig. I9) (Sunarpi *et al.*, 2005; Davenport *et al.*, 2007). Varios estudios sobre el papel de los transportadores HKT1 en OsHKT1;5 de arroz (Ren *et al.*, 2005), TaHKT1;4 (Huang *et al.*, 2006a) y TaHKT1;5 (Byrt *et al.*, 2007) de trigo sugieren una función de HKT1 similar a la del segundo modelo. No obstante, la dinámica de los movimientos del Na^+ encontrados en altramuz (Munns *et al.*, 1988), pimienta morrón (Blom-Zandstra *et al.*, 1998), maíz (Qing *et al.*, 2009) y *Solanum penellii* (Pérez-Alfocea *et al.*, 2000; Asins *et al.*, 2015), apoyan la existencia del “modelo de recirculación a través del floema”, en el que los transportadores de tipo HKT podrían estar implicados (Plett y Møller, 2010). Sin embargo, como ya se ha mencionado anteriormente, parece ser que el movimiento de Na^+ que baja desde la parte aérea hacia la raíz a través del floema es mucho menor que el que sube desde la raíz hacia la parte aérea a través del xilema (Berthomieu *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2017). El papel de HKT1 en la tolerancia a la salinidad y en el transporte de Na^+ a larga distancia, así como el de alguno de sus homólogos descritos en plantas será revisado con mayor detalle en el apartado I4.

Coordinación de SOS1 y HKT1 en el transporte a larga distancia

La hipótesis de que las funciones de los transportadores SOS1 y HKT1 deben estar coordinadas en el transporte de Na^+ a larga distancia fue inicialmente propuesta en *Arabidopsis*, donde se había observado que tanto SOS1 como HKT1 se expresan principalmente en las XPC, contribuyendo a la carga y descarga de Na^+ en el xilema, respectivamente (Shi *et al.*, 2002; Mäser *et al.*, 2002; Rus *et al.*, 2004; Sunarpi *et al.*, 2005; Pardo *et al.*, 2006). De esta forma, tanto por la función antagónica de estos dos

transportadores, así como por su idéntica localización, se ha sugerido que la función de SOS1 en la carga xilemática a nivel de la raíz está coordinada con la de los transportadores de tipo HKT1 en la descarga de Na⁺ a nivel de las hojas en el transporte de Na⁺ a larga distancia (Pardo *et al.*, 2006; Belver *et al.*, 2012). De acuerdo con esto, los análisis genéticos de los transportadores de Na⁺, SOS1 y AtHKT1, establecen que la nutrición del K⁺ está relacionada con la homeostasis de Na⁺ en formas más complejas que el modelo ampliamente aceptado de que Na⁺ compite con K⁺ por la captación a través de los sistemas de transporte que median la adquisición de K⁺ (Qiu *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002). Por ejemplo, en mutantes *sos* de *Arabidopsis* (mutantes de *Arabidopsis* que carecen del transportador SOS1 o una de sus proteínas reguladoras, SOS2 o SOS3), la extrusión de Na⁺ a la solución del suelo se ve afectada debido a la actividad insuficiente de SOS1 en la epidermis de la raíz (Qiu *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002). Como ya se ha mencionado, SOS1 se expresa principalmente en las XPC, donde contribuye a la carga xilemática de Na⁺ y posterior translocación a la parte aérea a través de la corriente de transpiración (Shi *et al.*, 2002). En consecuencia, el Na⁺ se acumula en las raíces de los mutantes *sos* (Shi *et al.*, 2002; Rus *et al.*, 2004). En esta situación, en la que la carga al xilema se ve comprometida, un aumento en la deposición de Na⁺ en la estela de la raíz producido por la recirculación de este catión y su posterior descarga floemática sería perjudicial para la planta (Shi *et al.*, 2002). Por ello, para tratar de evitar esta situación, se inactivarían los transportadores AtHKT1;1 (Shi *et al.*, 2002). De hecho, las mutaciones individuales *sos3* y *hkt1* promueven la acumulación de Na⁺ en las raíces y la parte aérea respectivamente, mientras que un doble mutante *sos1/hkt1* logra una distribución más equilibrada de Na⁺, siendo esta distribución más próxima a la de las plantas WT (Rus *et al.*, 2004). La retención excesiva de Na⁺ en las células de la estela de la raíz de los mutantes *sos* en un fondo de tipo silvestre para AtHKT1 puede impedir el flujo transversal de K⁺ a la estela y/o la carga de K⁺ al xilema en condiciones de baja concentración de K⁺ (Shi *et al.*, 2002; Rus *et al.*, 2004). La reducción de Na⁺ en las células de la estela producida por la mutación de AtHKT1 puede restaurar el flujo de K⁺ desde el córtex de la raíz hacia el xilema (Shi *et al.*, 2002; Rus *et al.*, 2004). Por tanto, parece ser que las funciones de transporte de los sistemas SOS y AtHKT1 están estrechamente coordinadas, y que juntas, consiguen mantener la homeostasis de Na⁺ (y de K⁺). Una perturbación en cualquiera de los dos sistemas podría alterar el transporte de Na⁺ y su correcta distribución en la planta, resultando, de este modo, en un fenotipo sensible a la salinidad (Pardo *et al.*, 2006; Belver *et al.*, 2012).

Investigaciones más recientes han corroborado, no sólo la hipótesis de que las funciones de SOS1 y HKT1 están coordinadas (Zhu *et al.*, 2015), sino que también la función de NHX estaría implicada en la regulación de la homeostasis de Na⁺ y K⁺ (Zhang *et al.*, 2017b). Así, estos tres transportadores, podrían regular sinérgicamente la homeostasis de Na⁺, controlando los sistemas de transporte a nivel de la planta completa, tanto a bajas como a altas concentraciones de sal (Zhang *et al.*, 2017b). A baja concentración de sal (25 mM NaCl) PtNHX1 compartimenta el Na⁺ lentamente en las vacuolas a nivel de la parte aérea de la planta, lo cual incrementaría la carga de Na⁺ en el xilema por PtSOS1 a nivel de la raíz, mediante retroalimentación positiva (*feedback*

regulation) (Zhang *et al.*, 2017b). En consecuencia, el Na⁺ sería transportado desde las raíces hacia la parte aérea mediante la corriente de transpiración, para conseguir un adecuado ajuste osmótico (Zhang *et al.*, 2017b). Por otro lado, cuando la concentración de sal es elevada (150 mM NaCl), el Na⁺ es rápidamente secuestrado en las vacuolas de las células del mesófilo mediante PtNHX1, saturándose la capacidad de almacenaje de la vacuola, lo que a su vez regula el transporte a larga distancia a través del xilema, desde las raíces a la parte aérea (Zhang *et al.*, 2017b). Como resultado, la expresión de PtHKT1;5 se induce fuertemente para que el exceso de Na⁺ sea descargado del xilema hacia las XPC (Zhang *et al.*, 2017b).

En base a estas investigaciones, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio de la coordinación de SOS1 y HKT1 en tomate, ya que al igual que ocurría en *Arabidopsis*, en esta especie, tanto los transportadores SIHKT1 como los antiportadores Na⁺/H⁺ SISOS1 están implicados en el transporte de Na⁺ a larga distancia (Fig. I9) (Olías *et al.*, 2009a, 2009b). Por ello, se ha estudiado en qué tejidos se localizan las proteínas HKT1 y SOS1 de tomate, su perfil de expresión en función del estadio de desarrollo de los órganos de la planta en las NILs, así como el efecto de la supresión estable de SISOS1 (Olías *et al.*, 2009a) sobre la expresión de los genes HKT1.

I3.2. OTROS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA TOLERANCIA A LA SALINIDAD

I3.2.1. Producción de osmolitos

El estrés hídrico causado por el componente osmótico de la salinidad, común a otros estreses como la sequía, el calor, la polución o el frío (Fig. I15), conlleva a la pérdida del turgor necesario para la expansión celular, ocasionando la destrucción irreparable de proteínas y membranas celulares (Vinocur y Altman, 2005). Para contrarrestar dicha pérdida de turgor y restablecer el ajuste osmótico, además de la regulación de las concentraciones de iónicas, llevada a cabo por los transportadores previamente estudiados, las plantas pueden sintetizar y acumular osmolitos compatibles con la actividad de los enzimas (principalmente en citosol de las células) (Vinocur y Altman, 2005; Krishnamurthy *et al.*, 2017). Estos osmolitos pueden ser del tipo de los polioles (glicerol, sorbitol, manitol, pinitol); azúcares no reductores (fructano, trehalosa y sacarosa); ácidos orgánicos (ácido málico) o algunos aminoácidos y derivados (prolina y glicina-betaína) (Xiong y Zhu, 2002; Zhu, 2002; Munns, 2005; Chinnusamy *et al.*, 2005; Contreras-Cornejo *et al.*, 2014; Deinlein *et al.*, 2014; Krishnamurthy *et al.*, 2017).

Entre los osmolitos mencionados, la prolina es el que se acumula con más frecuencia en condiciones de estrés osmótico, siendo producida principalmente por la sequía y la salinidad (Huang *et al.*, 2013). La prolina puede utilizarse como almacén de carbono y nitrógeno, o como secuestrador de radicales libres, estabilizando además las estructuras de la membrana y las proteínas, así como tamponando el potencial redox en condiciones de estrés (Delauney y Verma, 1993; Huang *et al.*, 2013). El papel de la prolina en la tolerancia al estrés osmótico se puso de manifiesto en la mayor tolerancia a la

salinidad detectada en mutantes acumuladores de prolina, obtenidos por mutagénesis química, variación somaclonal o ingeniería genética (Taylor, 1996; Petrusa y Winicov, 1997; Nanjo *et al.*, 1999). Asimismo, la expresión del enzima responsable de la síntesis de prolina, la 1-pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS), está inducida por el estrés salino y osmótico en plantas (Liu y Zhu, 1997; Huang *et al.*, 2013), habiéndose demostrado que la sobreexpresión de P5CS en tabaco (*Nicotiana tabacum*), así como en alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*) conlleva un incremento en la concentración de prolina, al tiempo que determina una mayor productividad en condiciones de déficit hídrico y de estrés salino, respectivamente (Kishor *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2013). No obstante, se ha constatado que en algunos casos su acumulación o su síntesis se inician cuando el daño celular es evidente, indicando que la síntesis de prolina no siempre constituye un marcador de tolerancia (Pérez-Alfocea *et al.*, 1994; Cano *et al.*, 1996; Liu y Zhu, 1997).

La glicina-betaína es otro de los osmolitos orgánicos que se acumulan en algunas plantas en condiciones de estrés osmótico, actuando como osmoprotector, estabilizando las membranas y las estructuras cuaternarias de las proteínas (Bohnert y Jensen, 1996). Se sintetiza en el estroma cloroplastidial, por medio de los enzimas colina monooxigenasa y betaína-aldehído deshidrogenasa, siendo este último inducible por estrés osmótico, y clave en la tolerancia a la salinidad del maíz (Saneoka *et al.*, 1995).

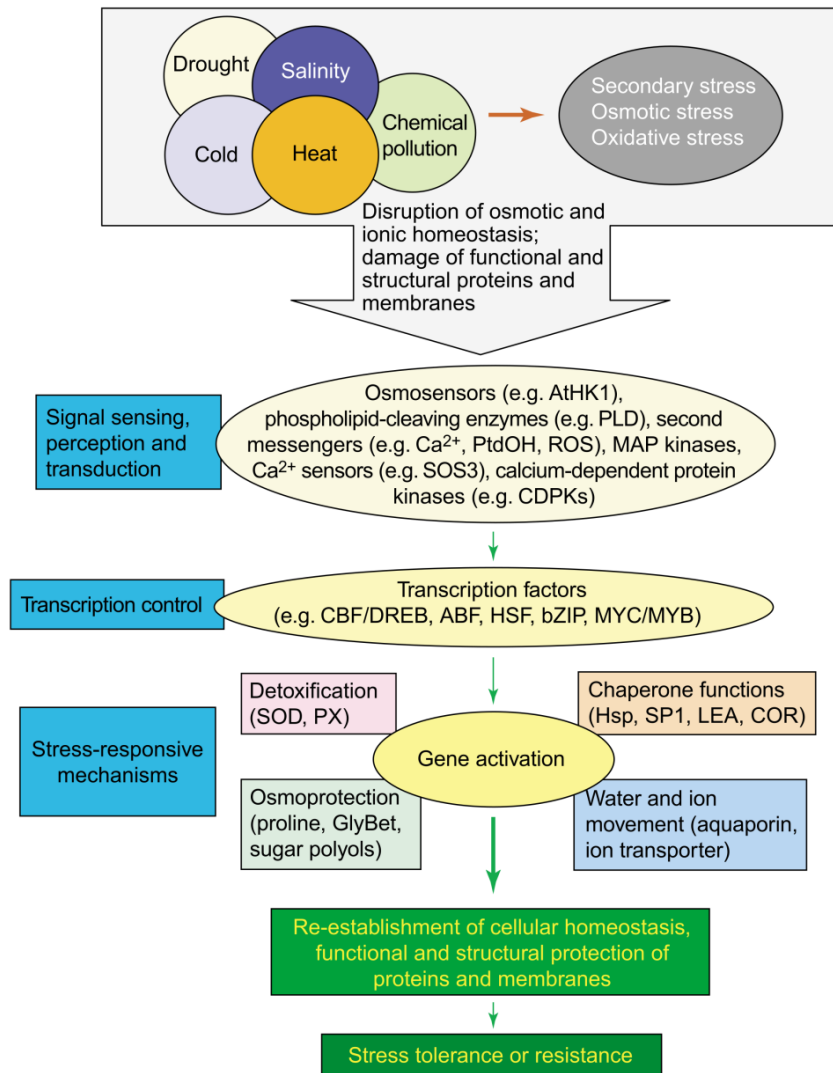


Figure I15. Plant response to abiotic stress. Primary stresses, such as drought, salinity, cold, heat and chemical pollution, are often interconnected and cause cellular damage and secondary stresses, such as osmotic and oxidative stress. The initial stress signals trigger the downstream signaling process and transcription controls, which activate stress-responsive mechanisms to re-establish homeostasis and to protect and repair damaged proteins and membranes. Inadequate responses at one or more steps in the signaling and gene activation process might ultimately result in irreversible changes in cellular homeostasis and in the destruction of functional and structural proteins and membranes, leading to cell death. ABF, ABRE Binding Factor; AtHK1, *Arabidopsis thaliana* High-affinity K⁺ Transporter 1; bZIP, basic leucine Zipper transcription factor; CBF/DREB, C-Repeat-Binding Factor / Dehydration-Responsive Binding Protein; CDPK, Calcium-dependent protein kinase; COR, Cold-Responsive protein; Hsp, heat shock protein; LEA, Late Embryogenesis Abundant; MAP, Mitogen-Activated Protein; PLD, Phospholipase D; PtdOH, Phosphatidic acid; PX, peroxidase; ROS, Reactive Oxygen Species; SOD, Superoxide Dismutase; SP1, Stable Protein 1. Taken from Vinocur y Altman (2005).

Otro de los solutos orgánicos que pueden estar involucrados en el ajuste osmótico son la sacarosa y/o los azúcares reductores solubles (Pilon-Smits *et al.*, 1995; Ishitani *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 1998). Además de su papel como osmolitos, los azúcares pueden jugar otras funciones en plantas estresadas. Así, la acumulación de azúcares solubles en respuesta a la sal permite paliar el estrés oxidativo causado por la salinidad, debido a la

capacidad de algunos de estos solutos para neutralizar los radicales hidroxilos (Hare *et al.*, 1998). Además, los azúcares no sólo son importantes para el crecimiento de la planta, sino que también afectan a los sistemas sensores que regulan la expresión de una variedad de genes involucrados en la fotosíntesis, respiración, síntesis y degradación de almidón y sacarosa y metabolismo nitrogenado (Koch, 1996).

En la revisión de Chinnusamy y colaboradores (2005) puede encontrarse un listado de plantas transgénicas de diferentes especies en las cuales se observó un incremento de la producción de osmolitos compatibles, que mejoraba la tolerancia a los estreses hídrico y salino en condiciones experimentales de laboratorio. Sin embargo, dicha mejora fue más atribuida a su efecto como osmoprotectores que a su contribución en el ajuste osmótico. De hecho, la estrategia de incrementar la producción de osmolitos vía ingeniería genética en la mejora de la tolerancia a la salinidad se ha puesto en entredicho, ya que las concentraciones a las que se acumulan estas sustancias no son lo suficientemente altas como para explicar un ajuste osmótico y suponen un alto coste energético para la planta. Además, el aumento en la concentración de estas sustancias en ningún caso ha resultado en una mejora efectiva de la tolerancia en condiciones de campo o en condiciones reales de producción (Flowers, 2004).

I3.2.2. Producción de ROS

El estrés salino, al igual que otros estreses abióticos, produce la acumulación de ROS, que es dañina para las células a altas concentraciones, ya que puede causar un daño oxidativo a lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos (Chinnusamy *et al.*, 2005). Las plantas poseen una variada gama de antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa y enzimas del ciclo ascorbato-glutation) y no enzimáticos (p.e., ascorbato, glutatión, α -tocoferol y carotenoides) para combatir el estrés oxidativo (Vinocur y Altman, 2005; Chinnusamy *et al.*, 2005). La evidencia acumulada indica que la actividad y el nivel de expresión de genes que codifican a los enzimas antioxidantes incrementan en respuesta a ROS bajo condiciones de estrés abiótico, y específicamente salinidad (Shalata y Tal, 1998; Shalata *et al.*, 2001). Puesto que no constituyen un objetivo fundamental de esta memoria, los diferentes aspectos relativos a la formación de ROS en plantas en condiciones de estrés salino no se han descrito detalladamente. Para una mayor información se puede consultar la revisión llevada a cabo por (Ashraf y Akram, 2009). Asimismo, en el apartado I2.2.4 ya se mencionaban las principales enzimas antioxidantes que podemos encontrar en las células de plantas (Fig. I7).

14. TRANSPORTADORES HKT: IMPORTANCIA Y FUNCIÓN

En este apartado se hace una mención especial a los transportadores de tipo HKT1, implicados en el transporte de Na^+ a larga distancia en plantas superiores debido a su relevancia en la presente Tesis Doctoral. Estos transportadores están presentes en el objetivo general de esta memoria: el estudio del papel de isoformas de *HKT1* de tomate y de sus variantes alélicas como genes candidatos que determinan funcionalmente un QTL mayoritario relacionado con la homeostasis de Na^+/K^+ en la parte aérea, y que parece estar asociado a la tolerancia del tomate a la salinidad. Por ello, se ha decidido dedicar un apartado completo de esta introducción al estudio de estos transportadores, en el cual se hablará sobre su importancia, función, filogenia y estructura molecular.

El descubrimiento de las proteínas HKT fue realizado por Schachtman y Schroeder (1994), los cuales identificaron una proteína transportadora de la membrana plasmática de plantas de trigo, capaz de complementar la cepa de levadura *S. cerevisiae* CY162, defectiva para el transporte de K^+ , permitiendo su crecimiento en un medio que contenía $30 \mu\text{M}$ K^+ . A continuación, estos autores expresaron el gen *HKT1* en oocitos de *Xenopus laevis*, comprobando que esta proteína era selectiva para K^+ , aunque también permitía el transporte de Cs^+ y Rb^+ , así como el de Na^+ y NH_4^+ , pero sólo en cantidades traza. Por esta razón, dicha proteína fue denominada “*High-affinity Potassium Transporter*”(HKT). Sin embargo, después de un análisis más detallado en oocitos de *Xenopus* (Gassman *et al.*, 1996; Rubio *et al.*, 1995), se comprobó que esta proteína, conocida actualmente como TaHKT2;1 (Platten *et al.*, 2006a), tiene actividad simporte Na^+/K^+ a concentraciones micromolares de Na^+ y uniporte de Na^+ a concentraciones milimolares de este catión.

Actualmente, los transportadores HKT, y particularmente, los de la subfamilia I, son ampliamente estudiados por su relevancia en el mecanismo de tolerancia a la salinidad, que se puso de manifiesto en trabajos donde este transportador se asociaba con la homeostasis de Na^+ y K^+ en la parte aérea de la planta (Ren *et al.*, 2005; James *et al.*, 2006; Byrt *et al.*, 2007; Munns *et al.*, 2012; Asins *et al.*, 2013). Se han encontrado en multitud de plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, localizándose en la membrana plasmática de XPC y células epidérmicas de la raíz (Fig. I9), donde realizan fundamentalmente el transporte de Na^+ (Mäser *et al.*, 2002; Berthomieu *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2005; Sunarpi *et al.*, 2005; Davenport *et al.*, 2007; Moller *et al.*, 2009).

14.1. FILOGENIA DE LOS TRANSPORTADORES HKT

Filogenéticamente, los miembros de la familia HKT de plantas se dividen en dos subfamilias, dependiendo de su estructura y función: la subfamilia 1 o I (*HKT1-like*) y subfamilia 2 o II (*HKT2-like*). Se ha propuesto que los transportadores que pertenecen a la subfamilia I llevan a cabo una actividad uniporte de Na^+ , mientras que los pertenecientes a la subfamilia II, una actividad simporte Na^+/K^+ (Platten *et al.*, 2006a). Aunque esta clasificación en dos subfamilias es ampliamente aceptada, en los últimos años se ha visto que uno de los transportadores HKT de *Physcomitrella patens* y varios de *Selaginella moellendorffii* no pertenecían a ninguna de estas dos subfamilias (Fig. I16), lo cual sugería

la presencia de una nueva subfamilia (Haro *et al.*, 2009). Por ello, en los trabajos más recientes, los transportadores HKT de plantas se han clasificado en tres subfamilias (subfamilias I, II y III) (Fig. I17) (Lan *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2015). Para la denominación de cada gen, el primer subíndice indica su pertenencia a las subfamilias 1, 2 o 3, respectivamente, y el segundo subíndice indica el número de la isoforma dentro de cada especie. (Figs. I17 e I18).

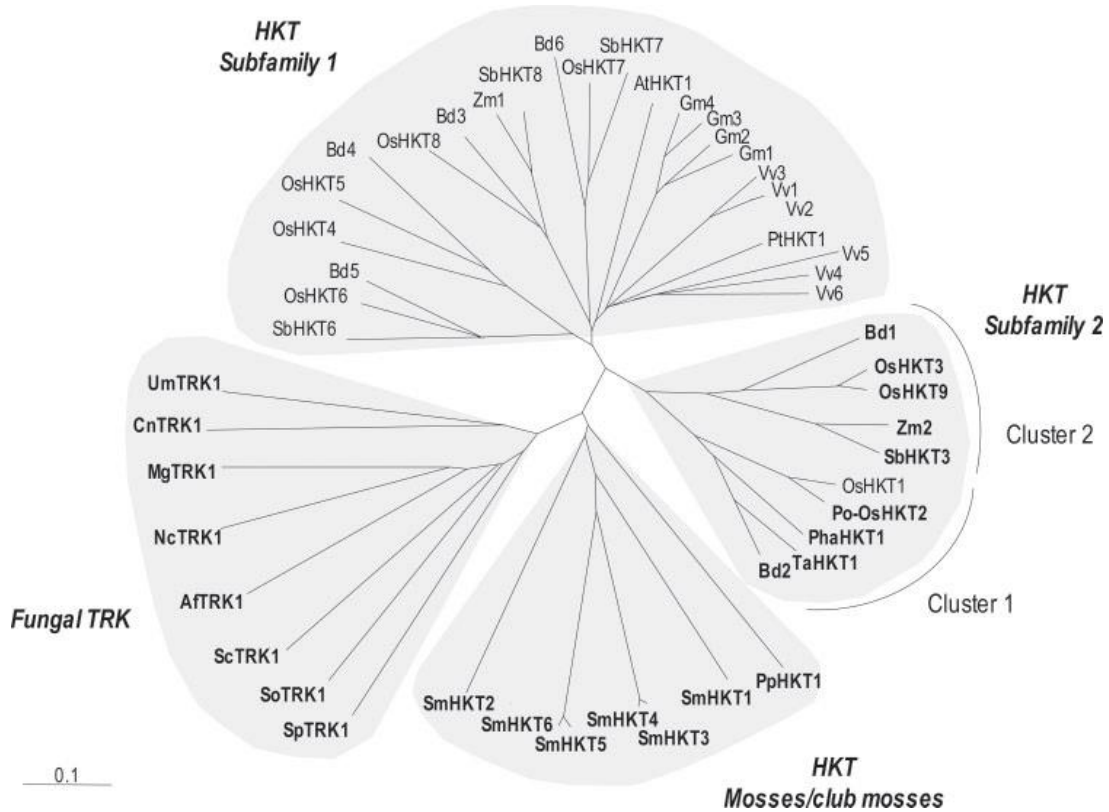


Figure I16. Phylogenetic tree of fungal TRK and plant HKT transporters. Abbreviations and accession numbers (HKT names are used when the sequence is annotated with that name; otherwise the abbreviation of the species is followed by a number; in *S. bicolor*, *B. distachyon*, *Z. mays*, *G. max*, *V. vinifera* and *S. moellendorffii* the identification numbers of the transporters correspond to the JGI database, <http://www.phytozome.net/>): *S. bicolor*, SbHKT6 > Sb04g005010.1, SbHKT8 > Sb03g012590.1, SbHKT7 > Sb06g027900, SbHKT3 > Sb10g029000.1; *O. sativa*, OsHKT6 > AJ491817, OsHKT4 > AJ491815, OsHKT5 > AJ506745, OsHKT6 > AJ491817, OsHKT7 > AJ491853, OsHKT8 > BAB93392, OsHKT3 > AJ491820, OsHKT9 > AJ491854; OsHKT1 > AJ491852, OsHKT2 > AB061313; *B. distachyon*, Bd1 > Bradi1g34210.1, Bd2 > Bradi1g34220.1, Bd3 > Bradi1g45940.1, Bd4 > Bradi5g21020.1, Bd5 > Bradi3g05570.1, Bd6 > Bradi5g21030.1; *Z. mays*, Zm8 > GRMZM2G047616, Zm9 > GRMZM2G135674; *Arabidopsis thaliana*, AtHKT1 > AF237672.1; *G. max*, Gm1 > Glima01g00530.1, Gm4 > Glima06g42340.1, Gm3 > Glima12g16040.1, Gm2 > Glima07g15590.1; *V. vinifera*, Vv1 > GSVIVT00001554001, Vv2 > GSVIVT00001555001, Vv3 > GSVIVT00001557001, Vv4 > GSVIVT00001561001, Vv5 > GSVIVT00001581001, Vv6 > GSVIVT00001583001; *P. trichocarpa*, PpHKT1 > XM_002325193; *T. aestivum*, TaHKT1 > U16709.1; *Phragmites australis*, PhaHKT1 > AB234303; *P. patens*, PpHKT1 > FN401372; *S. moellendorffii*, SmHKT1 > 449899, SmHKT2 > 449883, SmHKT3 > 449916, SmHKT4 > 449919, SmHKT5 > 1751, SmHKT6 > 97685; *S. cerevisiae*, ScTRK1 > CAA89424.1; *Schizosaccharomyces pombe*, SpTRK1 > CAA93300.1; *Schwanniomyces occidentalis*, SoTRK1 > AJ290453.1; *Aspergillus fumigatus*, AfTRK1 > XP_748113.1; *Neurospora crassa*, NcTRK1 > AJ009758.1; *Magnaporthe grisea*, MgTRK1 > XM_364274.2; *Cryptococcus neoformans*, CpTRK1 > XP_776754.1; *Ustilago maydis*, UmTRK1 > XM_755477.1. Taken from Haro *et al.* (2010).

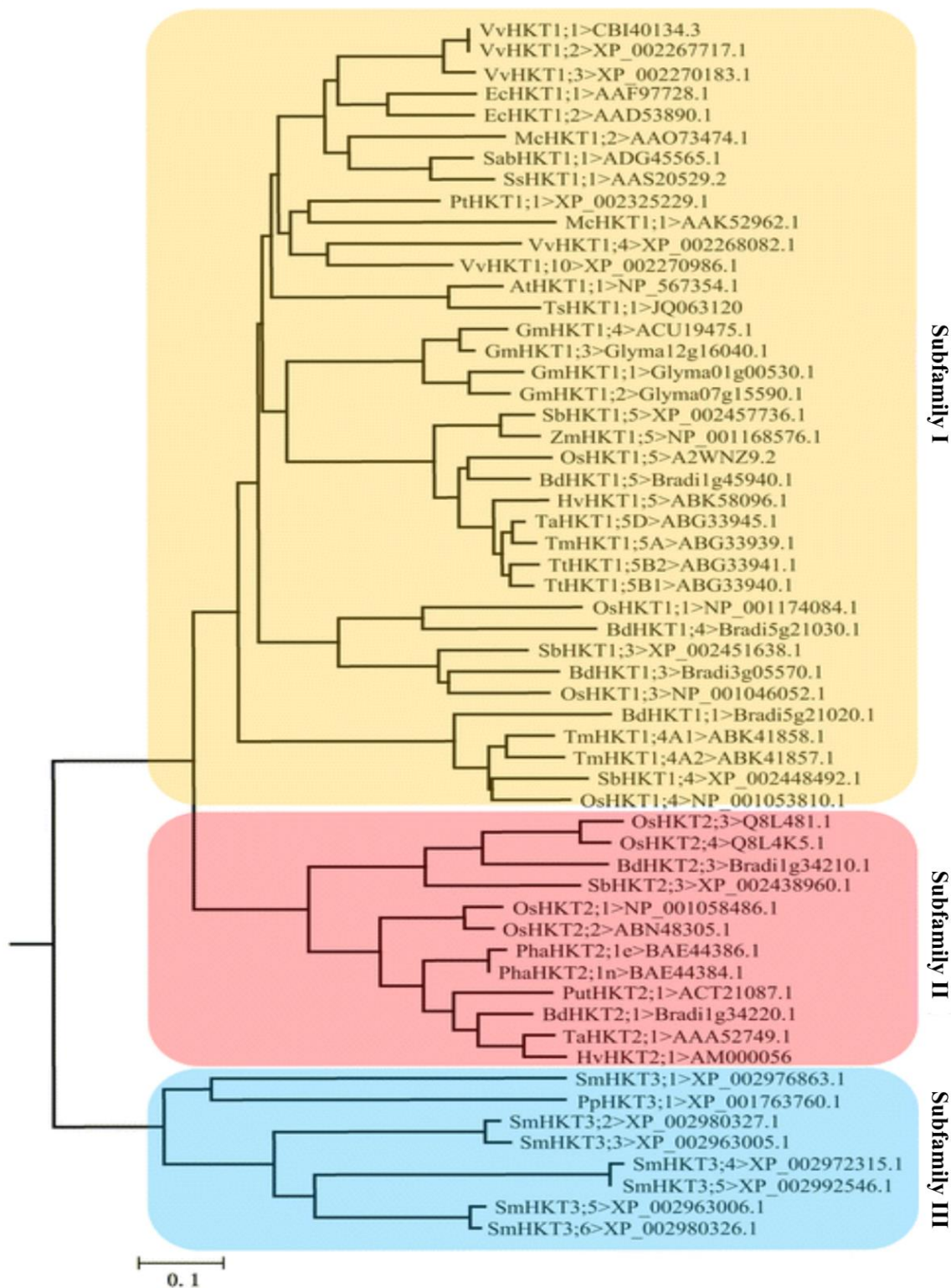


Figure I17. Phylogenetic analysis of HKT transporters in higher plants. Subfamily I of HKT transporters are all characterized by “Ser” in the first loop (PA). Subfamily II and III have the GlyGlyGlyGly-type characteristic in the amino acid sequences exception of OsHKT2;1. At, *Arabidopsis thaliana*; Ts, *Thellungiella salsuginea*; Pt, *Populus trichocarpa*; Mc, *Mesembryanthemum crystallinum*; Vv, *Vitis vinifera*; Ec, *Eucalyptus camaldulensis*; Sb, *Sorghum bicolor*; Ss, *Suaeda salsa*; Zm, *Zea mays*; Sab, *Salicornia bigelovii*; Os, *Oryza sativa*; Hv, *Hordeum vulgare*; Bd, *Brahypodium distachyon*; Tm, *Triticum monococcum*; Ta, *Triticum aestivum*; Tt, *Triticum timopheevii*; Gm, *Glycine max*; Put, *Puccinellia tenuiflora*; Pha, *Phragmites australis*; Sm, *Selaginella moellendorffii*; Pp, *Physcomitrella patens*. Extracted from Su *et al.* (2015).

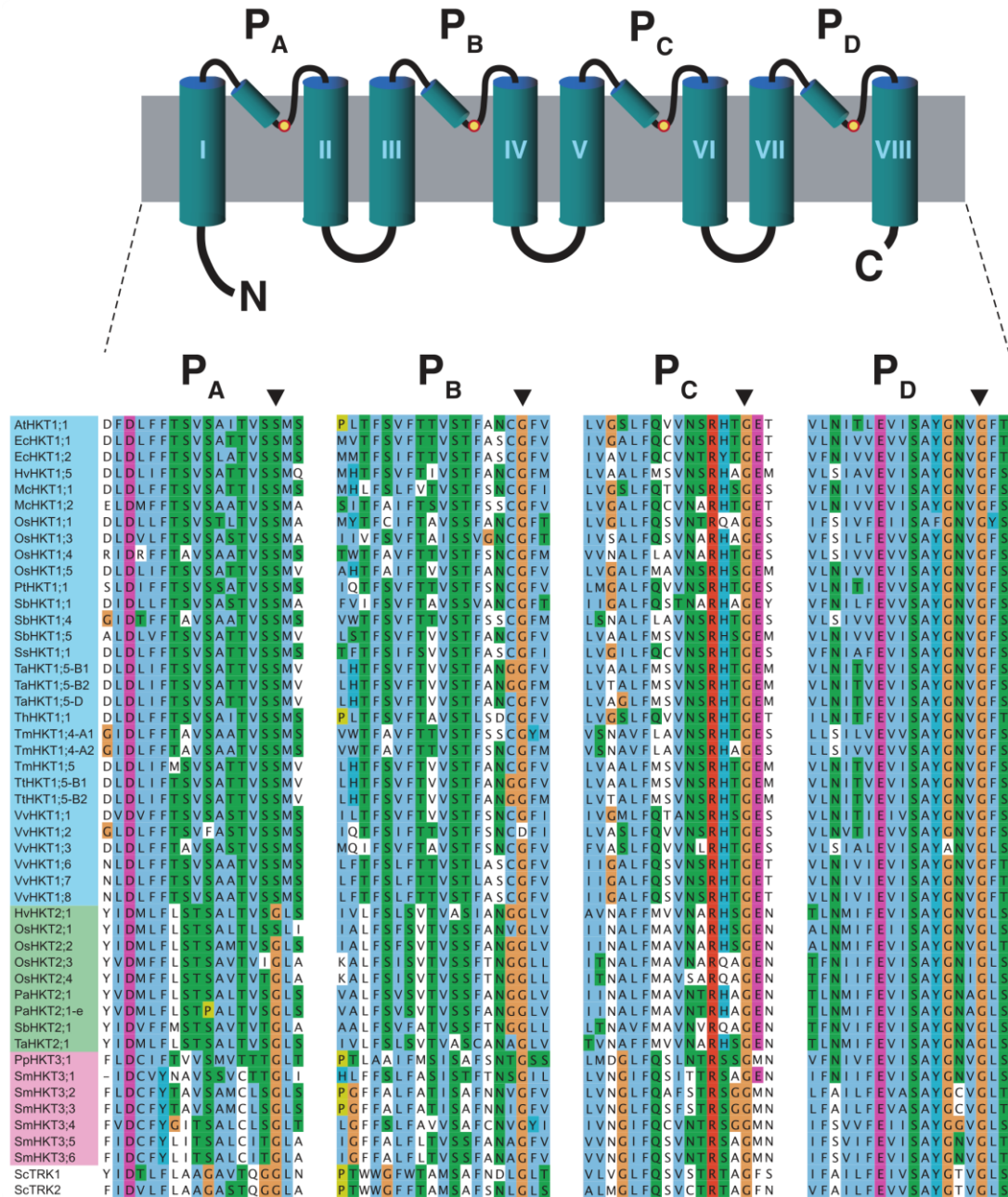


Figure I18. A sequence alignment of the four putative selectivity pore-forming regions (p-loops: P_A to P_D) of plant HKT and yeast TRK proteins that are available in public databases. Arrow heads indicate the amino acid positions where a glycine residue is conserved in K⁺ permeable HKT/TrK/Ktr transporters. Glycine residue in each P-loop has been suggested to correspond to the first glycine of the glycine-tyrosine-glycine (GYG) motif that is highly conserved in the selectivity-pore-forming region of K⁺ channels (Durell *et al.*, 1999). More Na⁺ selective class I transporters retain a serine residue at the filter position of the P_A region, whereas a glycine is conserved in the P_B to P_D with an exception in the case of VvHKT1;2 that retains an aspartic instead of the glycine in the P_B as well. Typical class I transporters show robust K⁺ permeability and the glycine residues are conserved in all p-loops. Note, however that OsHKT2;1 is a unique class II transporter that retains a serine in the P_A region as class I transporters and shows a strong preference for Na⁺ selective in yeast and *Xenopus* oocytes (Mäser *et al.*, 2002; Garcíadeblás *et al.*, 2003). New HKT transporters found in primitive plants *P. patens* and *S. moellendorffii*, which could be considered to be class III transporter, retain glycine residues in the four p-loops as in typical class II transporters. Na⁺/K⁺ selectivity of these transporters have not yet been analyzed. Class I, II and potential class III HKT transporters are colored by sky blue, green and pink, respectively. Extracted from Hauser & Horie (2010).

Hasta ahora se han documentado más de cien genes que codifican a transportadores HKT, entre los artículos publicados y las bases de datos génicas o proteicas (Su *et al.*, 2015). El número de transportadores HKT en plantas superiores muestra una gran diferencia entre distintas especies. Por ejemplo, se han identificado varios genes de tipo HKT en trigo, al menos nueve en arroz, pero sólo un tipo en *Arabidopsis* y *Physcomitrella patens* (Uozumi *et al.*, 2000; Haro *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2015). Parece ser que existen más transportadores de tipo HKT en monocotiledóneas que en dicotiledóneas (Garcia-deblás *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2017). De hecho, hasta la fecha se han aislado miembros de la subfamilia I tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, pero los miembros de la subfamilia II sólo se han aislado en monocotiledóneas (Almeida *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2015).

Como se indicará en apartado I4.2, la característica principal que distingue a la subfamilia I de la subfamilia II de HKT es la presencia de un aminoácido en una determinada posición dentro del primer dominio MP_AM. La presencia de una *Serina* (Ser/S) en esta posición es típica de la subfamilia I, estando asociada con la selectividad por Na⁺, mientras que la presencia de *Glicina* (Gly/G) es típica de la subfamilia II (a excepción de OsHKT2;1), y se asocia a una actividad simporte Na⁺/K⁺, así como al transporte de algunos cationes divalentes, como Ca²⁺ y Mg²⁺, cuando se expresa en sistemas heterólogos (Jabnour *et al.*, 2009; Lan *et al.*, 2010; Oomen *et al.*, 2012; Waters *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2015). Los miembros de la subfamilia III son similares a los de la subfamilia II, y al igual que éstos, presentan una Gly en el primer dominio MP_AM. Se ha sugerido que realizan el simporte Na⁺/K⁺, aunque existe poca información sobre esta subfamilia de transportadores (Fig. I17) (Haro *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2015).

I4.1.1. Subfamilia I (HKT1-like): implicados en la detoxificación de Na⁺

El primer miembro de la subfamilia I fue aislado de *Arabidopsis thaliana*. Cuando se expresaba en oocitos de *Xenopus laevis*, AtHKT1;1 mostraba una actividad de transporte selectiva para el Na⁺ e independiente del K⁺ (Uozumi *et al.*, 2000). Asimismo, cepas de levaduras defectivas para el transporte de K⁺ ($\Delta trk1 \Delta trk2$) transformadas con AtHKT1;1 no fueron capaces de crecer en un medio que contenía 1 mM K⁺, siendo su crecimiento reducido en un medio que contenía Na⁺ (Uozumi *et al.*, 2000). Dicha selectividad para Na⁺ fue posteriormente corroborada mediante *patch-clamp*, midiendo directamente en las membranas de células de la estela de la raíz de *Arabidopsis* (Xue *et al.*, 2011). Todos los trabajos realizados sobre AtHKT1;1 parecen coincidir en que el papel principal de este transportador *in planta* es evitar la excesiva acumulación de Na⁺ en la parte aérea de *Arabidopsis*, siendo este proceso ampliamente aceptado como mecanismo de tolerancia a la salinidad (Berthomieu *et al.*, 2003; Sunarpi *et al.*, 2005; Rus *et al.*, 2006; Davenport *et al.*, 2007; Moller *et al.*, 2009).

El número de miembros de la subfamilia I varía entre plantas mono- y dicotiledóneas. Las plantas monocotiledóneas tienen más miembros de la subfamilia I que

las dicotiledóneas (Figs. I17 e I18). Prácticamente todos los miembros de la subfamilia I aislados de plantas mono- y dicotiledóneas caracterizados hasta la fecha presentan selectividad para el Na⁺, salvo alguna excepción (ver apartado I4.2). Dichos transportadores suelen exhibir una baja afinidad para el Na⁺ (rango milimolar) y se localizan en la membrana plasmática de células de la estela de la raíz, concretamente en células del parénquima del xilema (XPC), siendo su función principal la retirada de Na⁺ de la corriente xilemática de transpiración para evitar que alcance la parte aérea y dañe los tejidos fotosintéticos (Ren *et al.*, 2005; Horie *et al.*, 2009; Hauser y Horie, 2010; Almeida *et al.*, 2013b; Su *et al.*, 2015). Entre los transportadores pertenecientes a esta subfamilia podríamos destacar, además de AtHKT1;1 (Uozumi *et al.*, 2000), OsHKT1;4/5, Tm/TaHKT1;4/5 de arroz y trigo respectivamente (Ren *et al.*, 2005; Cotsaftis *et al.*, 2012; Byrt *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2016), y más recientemente, ZmHKT1;5 y VviHKT1;1 de maíz y vid (Zhang *et al.*, 2017a; Henderson *et al.*, 2017), así como SIHKT1;1 y SIHKT1;2, presentados en este trabajo (publicados en Asins *et al.* (2013).

I4.1.2. Subfamilia II (HKT2-like): regulados por K⁺

En contraste con los miembros de la subfamilia I, algunos transportadores de la subfamilia II parecen tener un papel importante en la absorción de Na⁺ del medio externo a través de las células de la epidermis de la raíz, especialmente cuando el K⁺ es limitante (Laurie *et al.*, 2002; Garciadeblás *et al.*, 2003; Haro *et al.*, 2005; Horie *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009). Se ha observado que la expresión de los transportadores de la subfamilia II suele aumentar en condiciones de deficiencia de K⁺ (Haro *et al.*, 2005; Horie *et al.*, 2001, 2007, 2009; Wu *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2010). Los transportadores OsHKT2;1, TaHKT2;1 y HvHKT2;1, de arroz, trigo de pan y cebada forman parte de esta subfamilia (Schachtman y Schroeder, 1994; Laurie *et al.*, 2002; Horie *et al.*, 2001, 2007, 2009; Jabnourne *et al.*, 2009; Mian *et al.*, 2011).

OsHKT2;1 de arroz es un transportador de la subfamilia II algo inusual (Haro *et al.*, 2009), ya que aunque presenta un residuo de Ser en su primer dominio MP_AM (Fig. I18), su afinidad y capacidad transportadora son más similares a las de los miembros de la subfamilia I (es decir, muestra especificidad para Na⁺). OsHKT2;1 fue inicialmente caracterizado en levaduras, mostrando un tipo de transporte de alta afinidad para el Na⁺, el cual es competitivamente inhibido en presencia de concentraciones micromolares de K⁺, pero no transporta K⁺ (Garciadeblás *et al.*, 2003). Sin embargo, en levaduras también puede ser capaz de transportar K⁺ dependiendo de las concentraciones externas de Na⁺ y K⁺ (Horie *et al.*, 2007, 2009; Jabnourne *et al.*, 2009). En las raíces, OsHKT2;1 se expresa en las capas más externas (epidermis, exodermis y córtex diferenciado en aerénquima). Puesto que su expresión se induce en ausencia de K⁺ y se inhibe en presencia de concentraciones micromolares de K⁺, así como a relativamente altas concentraciones de Na⁺, se interpreta que la función de este transportador es nutricional; es decir, tomar relativamente bajas cantidades Na⁺ del suelo cuando este catión es limitante, para sustituir al K⁺ en funciones no selectivas, como las osmóticas, a baja salinidad (Horie *et al.*, 2007).

En trigo, TaHKT2;1 se expresa en el córtex de la raíz, aumentando también su expresión en condiciones de deficiencia de K⁺, por lo que parece tener una función similar a la de OsHKT2;1 de arroz, es decir, la entrada de Na⁺ a través de la raíz (Horie *et al.*, 2009; Mian *et al.*, 2011). Por último, HvHKT2;1 de cebada se expresa principalmente en el córtex de la raíz, mostrando también algo de expresión (aunque en mucho menor) en la vaina y el limbo foliar. Esta expresión también es regulada por las bajas concentraciones de K⁺ en raíces y parte aérea, así como por las altas concentraciones de Na⁺ en la parte aérea (Mian *et al.*, 2011). En conclusión, estos tres transportadores HKT2;1 (OsHKT2;1, TaHKT2;1 y HvHKT2;1) tienen semejanzas en cuanto a su expresión celular específica y su capacidad para transportar tanto Na⁺ como K⁺ cuando se expresan en sistemas heterólogos, mostrando también una inhibición del transporte de Na⁺ por K⁺, que comienza a ser visible a partir de un determinado umbral de concentración de Na⁺ (Schachtman y Schroeder, 1994; Horie *et al.*, 2001; Mian *et al.*, 2011). Otros miembros de la subfamilia II también han mostrado una permeabilidad variable a diversos cationes cuando se expresaban en sistemas heterólogos. Así, OsHKT2;2, exhibió actividad de transporte tanto para el Na⁺ como para el K⁺ (Jabnourne *et al.*, 2009; Oomen *et al.*, 2012), mientras que OsHKT2;4 mostró permeabilidad para cationes divalentes, como el Ca²⁺ y el Mg²⁺ (Lan *et al.*, 2010).

II.1.3. Subfamilia III (HKT3-like): no regulados por K⁺ ni por Na⁺

Los miembros de la subfamilia III son similares a los de la subfamilia II, presentando una Gly en el primer dominio MP_{AM} (Fig. II.8). Al igual que los miembros de la subfamilia II, se ha sugerido que los transportadores de la subfamilia III realizan el simporte de Na⁺/K⁺, aunque existe poca información sobre ellos (Haro *et al.*, 2009). Los transportadores pertenecientes a esta subfamilia se han encontrado en algunas de las plantas más primitivas, como son *Selaginella moellendorffii* y *Physcomitrella patens* (Figs. II.6, II.7 e II.8) (Haro *et al.*, 2009; Hauser y Horie, 2010; Su *et al.*, 2015).

Haro y colaboradores (2010) identificaron y aislaron un miembro de HKT procedente del musgo *Physcomitrella patens* y varios procedentes de *Selaginella moellendorffii*. Un árbol filogenético hecho con todas las secuencias proteicas de HKT conocidas hasta la fecha reveló que los genes HKT de *P. patens* y *S. moellendorffii* no pertenecían a ninguna de las dos subfamilias de HKT (Platten *et al.*, 2006a). Por ello, se propuso la clasificación de estos miembros de HKT en una nueva subfamilia (Haro *et al.*, 2009). La expresión de PpHKT1 en células de levaduras defectivas para el transporte de K⁺ e incapaces de tomar Na⁺ a bajas concentraciones de este catión, mostró que PpHKT1 mediaba tanto el transporte de Na⁺ como de K⁺ al interior de las células (Haro *et al.*, 2009). Sin embargo, cuando los musgos WT y mutantes de *P. patens* crecieron a diferentes concentraciones de Na⁺ y K⁺, incluyendo condiciones de ayuno de K⁺, no se observaron diferencias en la tasa de crecimiento ni en los contenidos de Na⁺ y K⁺. Además, la expresión de PpHKT1 no se veía afectada por el ayuno de K⁺, ni por diferencias en los valores de pH o la presencia de Na⁺ en el medio (Haro *et al.*, 2009). Estos resultados son diferentes a todos los obtenidos para los miembros de las subfamilias I y II de HKT,

pudiendo deberse estas diferencias a la diferente morfología y modo de vida de *P. patens* y *S. moellendorffii* en comparación con las plantas mono- y dicotiledóneas. Sería interesante aislar transportadores HKT procedentes de otras especies diferentes a *Physcomitrella* y *Selaginella* para comprobar si las características de transporte y expresión previamente estudiadas en *PpHKT1* son similares entre distintas especies de musgos (Almeida *et al.*, 2013).

14.2. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS TRANSPORTADORES HKT

Los transportadores de tipo HKT sólo están presentes en plantas, pero presentan similitudes en secuencia y función con los transportadores de cationes TrkH/KtrB de bacterias y hongos (Durell y Guy, 1999; Corratgé-Faillie *et al.*, 2010), por lo que también se considera que su estructura es similar a la de estas proteínas (Cao *et al.*, 2011; Cotsaftis *et al.*, 2012). Tanto los transportadores HKT de plantas, como los Ktr/Trk de bacterias/hongos presentan una estructura típica en cuatro dominios membrana-poro-membrana (MPM, *Membrane-Pore-Membrane*), P_A, P_B, P_C y P_D, cada uno de los cuales está formado a su vez por dos hélices transmembrana (es decir, ocho hélices transmembrana en total, MI-MVIII) y un bucle o *P-loop* (cuatro bucles en total, *1st-4th P-loop*) (Figs. I18 e I19), que podrían haber evolucionado a partir de canales de K⁺ KcsA, ya que la secuencia aminoacídica de los cuatro dominios MPM están muy conservadas y son muy similares a los KcsA de bacterias, pero, aunque cada dominio MPM haya evolucionado de un KcsA de bacterias, no son simples repeticiones, teniendo cada uno de ellos sus propias características (Schachtman y Schroeder, 1994; Durell y Guy, 1999; Uozumi *et al.*, 2000; Horie *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2015). De hecho, la similaridad entre dos MPM distintos es inferior al 30% (Su *et al.*, 2015).

14.2.1. Selectividad iónica de los transportadores HKT

Las proteínas HKT se han caracterizado como transportadores de cationes monovalentes (Horie *et al.*, 2009) que median principalmente el uniporte de Na⁺, aunque se ha propuesto que algunos miembros también pueden realizar el simporte Na⁺/K⁺, e incluso ser permeables al transporte de cationes divalentes como el Mg²⁺ y Ca²⁺ (Lan *et al.*, 2010). Además, algunas proteínas HKT, como ECHKT1;1, incluso cambian su selectividad dependiendo del ambiente iónico en el que se encuentren (Fairbairn *et al.*, 2000). La función de los transportadores HKT de plantas depende de su estructura. Por lo tanto, para entender mejor el funcionamiento de estos transportadores en plantas es muy útil la construcción de un modelo de absorción de cationes mediante el análisis sistemático de las estructuras conservadas de HKT. Su y colaboradores (2015) describieron los posibles modelos de selección y transporte de cationes mediados por los transportadores HKT (Fig. I20).

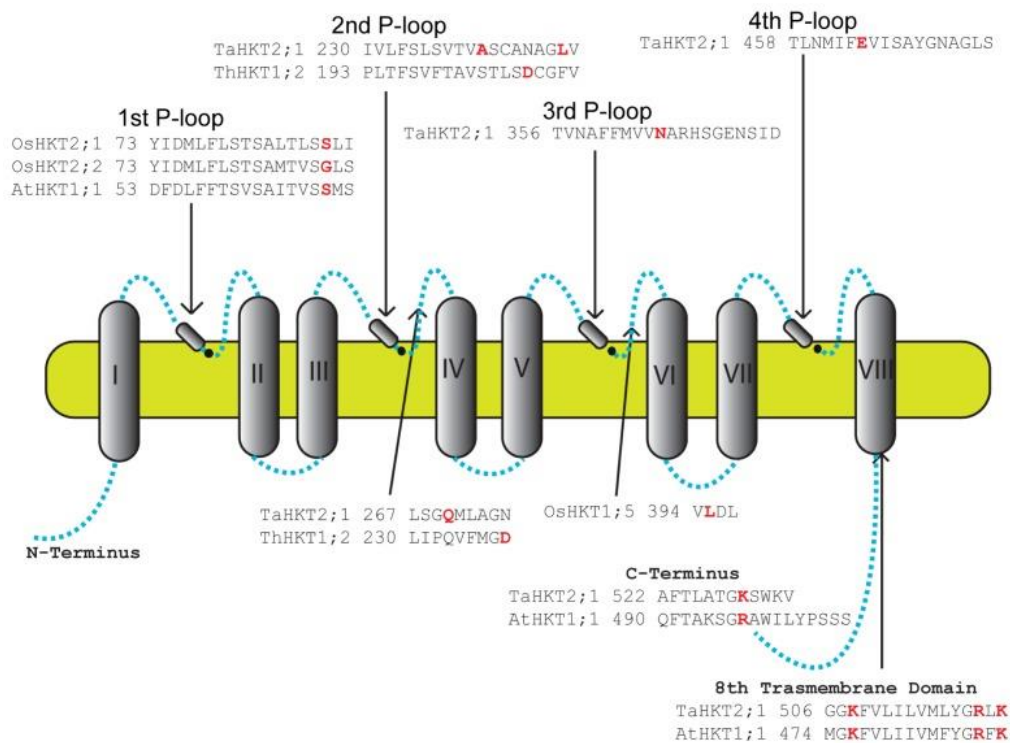


Figure I19. HKT structure and location of specific amino acids that were shown to affect the transport properties when mutated. Alignments show the amino acid sequence of specific domains where these amino acids (highlighted in red) are present (different plant species) and have been shown to have a crucial role in the correct functioning of the transporter. The function of the highlighted amino acids has been studied by expression of the mutated proteins in heterologous systems. Taken from Almeida *et al.* (2013).

Modelos de selección de cationes

El mecanismo mediante el cual se transportan los cationes no está del todo claro, quedando todavía muchas cuestiones por resolver: 1) ¿Cómo capturan los cationes los transportadores HKT?; 2) ¿Cómo se transfiere e intercambia la energía teniendo en cuenta que su modo de transporte se realiza de forma activa?; 3) ¿Cuál es el mecanismo que controla las concentraciones de Na^+ y K^+ para que se regule la expresión génica o la actividad de estos transportadores? Originalmente se propuso que un simporte con H^+ proporcionaba el gradiente necesario para mover los iones a través de la membrana plasmática (Schachtman y Schroeder, 1994; Schachtman y Liu, 1999), aunque las evidencias experimentales parecen sugerir que este mecanismo es bastante improbable.

En los últimos años se han propuesto tres modelos diferentes para explicar el proceso de transporte de los cationes a través de los transportadores HKT (Fig. I20A, B y C) (Su *et al.*, 2015). Según el primer modelo, los transportadores HKT contienen una serie de residuos aminoacídicos altamente conservados (concretamente cuatro) que podrían tener un papel fundamental en su función (Su *et al.*, 2015). Estos cuatro residuos aminoacídicos forman un espacio que puede atrapar los cationes, permitiendo su transporte a través de la membrana. La presencia de una *Ser* o una *Gly* en el bucle del primer poro (1st P-loop o MP_AM) (Figs. I18, I19, I20A) determina la selectividad iónica de HKT. De esta forma, cuando la *Ser* está presente, el transportador adquiere selectividad

por Na⁺, mientras que la presencia de *Gly*, permitiría el simporte Na⁺/K⁺ e incluso el transporte de cationes divalentes, tales como Mg²⁺ y Ca²⁺ (Fig. I20A) (Horie *et al.*, 2001, 2011; Lan *et al.*, 2010). En ambos casos, los otros tres residuos aminoacídicos clave de los poros P_B, P_C y P_D del resto de dominios MPM serían *Gly*. La *Gly* es el aminoácido más pequeño, mientras que la *Ser* tiene polaridad. Por lo tanto, el espacio formado por *Gly-Gly-Gly-Gly* es más flexible que el formado por *Ser-Gly-Gly-Gly*, permitiendo a los transportadores HKT de plantas alojar más tipos de cationes, como K⁺ y cationes divalentes (Fig. I20A).

En el segundo y el tercer modelo, además de intervenir la *Ser/Gly* del dominio MP_AM, dos residuos muy conservados de *Arginina* (R) y *Lisina* (K), cargados positivamente estarían presentes en la hélice MP_DM de los transportadores HKT de plantas (Su *et al.*, 2015). La carencia de estos residuos podría causar la pérdida de la función transportadora de HKT (Fig. I20). Los transportadores de cationes requieren una barrera para evitar la libre difusión de iones a favor del gradiente electroquímico, siendo posible que estos residuos positivos dentro del poro del transportador estén implicados en la regulación de la actividad de los transportadores. De hecho, cuando se reemplazaba uno de los aminoácidos cargados positivamente de la hélice MP_DM con *Glutamina* (Q), no se perdía la actividad de absorción de cationes del transportador, indicando que el intercambio de uno de los residuos de carga positiva podía ser tolerado (Kato *et al.*, 2007). Sin embargo, el reemplazo de dos o más residuos de carga positiva con *Glutamina* causaba una pérdida considerable de actividad en TaHKT2;1 (Kato *et al.*, 2007). Al estar cargadas positivamente, la *Arginina* y la *Lisina* producen repulsión electrostática, evitando la permeabilidad del catión a través de HKT. Por tanto, la hélice MP_DM podría actuar a modo de barrera o “interruptor” para la entrada de cationes. Al igual que ocurría en el primer modelo, la presencia de *Gly* o *Ser* en el dominio MP_AM determina la selectividad iónica, de forma que en el segundo modelo, la existencia de *Gly* en dicha posición permite el transporte de Na⁺, K⁺ y algunos cationes divalentes (Fig. I20B) y en el tercero, la presencia de *Ser* restringe la selectividad al Na⁺ (Fig. I20C). En ambos modelos, un activador produciría un cambio conformacional en la barrera, abriendo el paso a los cationes (Figs. I20B y C). Se ha sugerido que el ATP podría ser la fuente de energía impulsora de este transporte, ya que se sabe que la hidrólisis de esta molécula impulsa el transporte de cationes en las membranas celulares, produciendo la fosforilación de los transportadores, proceso que produce en ellos un cambio estructural, permitiendo la permeabilidad del catión (Cao *et al.*, 2013; Vieira-Pires *et al.*, 2013). Sin embargo, no existen evidencias de que la actividad de los transportadores HKT esté relacionada con la actividad ATPasa, siendo necesaria más investigación para saber si el ATP es realmente la fuente de energía empleada por los transportadores HKT y, de ser así, qué tipo de ATPasa estaría implicada en el proceso de fosforilación.

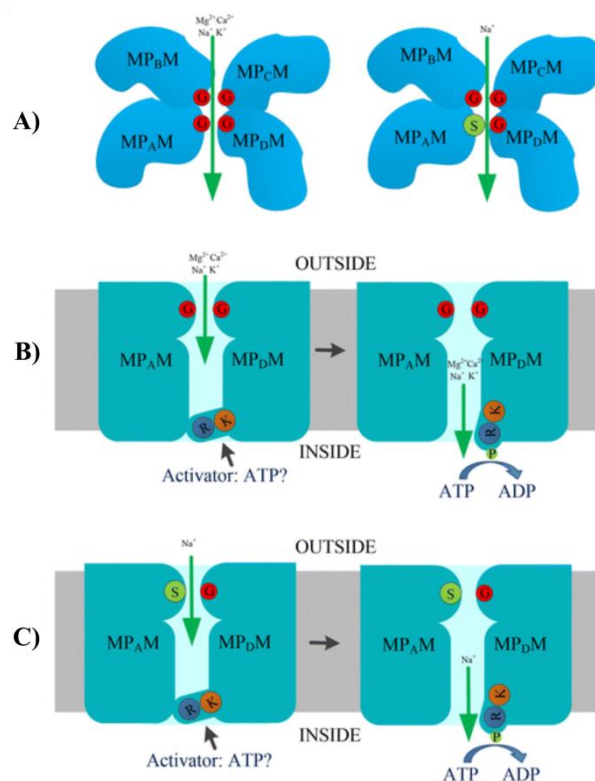


Figure I20. Model of cation trapping and selection of plant HKTs. A) Four glycine (G) residues form a trap space and allow Na^+ , K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+} across. Serine (S) and three glycine (G) residues form a trap space and allow Na^+ across. B) and C) Positive arginine (R) and lysine (K) residues form a cation barrier to stop cation across. Extracted from Su *et al.* (2015).

La función de estos aminoácidos se ha estudiado mediante la expresión en sistemas heterólogos de las proteínas mutadas para cada aminoácido específico. Así, la expresión de *TaHKT2;1* en células de levadura sensibles a la salinidad que crecieron en presencia de NaCl, disminuyó su sensibilidad a la salinidad (Rubio *et al.*, 1995, 1999). En trigo, la mutación del *Glutamato* E464 a *Glutamina* Q464 en *TaHKT2;1* afectaba al funcionamiento normal del transportador (Diatloff *et al.*, 1998). Levaduras defectivas en sistemas de absorción de K^+ (CY162) que expresaban *TaHKT2;1-E464Q* mostraban una mejora en el crecimiento en presencia de 50 mM de NaCl. Esta mejora en el crecimiento de células de levadura que expresaban dicha variante fue mucho más evidente en presencia de bajas concentraciones de NaCl (2.5 mM). Las determinaciones de la absorción de Na^+ mostraron que la mutación E464Q disminuía la afinidad de *TaHKT2;1* para el Na^+ , afectando a la unión del transportador con este catión y reduciendo el flujo de Na^+ , pero no el de K^+ . Estos resultados sugieren la implicación del cuarto *P-loop* de *TaHKT2;1* en el transporte de Na^+ a través del transportador (Diatloff *et al.*, 1998).

Varios trabajos estudiaron el primer dominio *P-loop* (Fig. I17) (Mäser *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2007; Ali *et al.*, 2012; Cotsaftis *et al.*, 2012). Así, Mäser y colaboradores (2002), realizaron varias mutaciones puntuales para estudiar el papel de los aminoácidos específicos presentes en primer dominio *P-loop* de las proteínas *AtHKT1;1*, *TaHKT2;1*, *OsHKT2;1* y *OsHKT2;2*. Las levaduras CY162 que expresaban las mutaciones *AtHKT1;1-*

S68G y OsHKT2;1-S88G fueron capaces de crecer a bajas concentraciones de K⁺, mientras que las levaduras que expresaban AtHKT1;1-S68S y OsHKT2;1-S88S no lo fueron. De estos experimentos se concluyó que la presencia de una Gly en este primer P-loop era necesaria para el transporte de K⁺ mediado por AtHKT1;1, TaHKT2;1 y OsHKT2;2.

En un trabajo posterior, donde se mutaron varios residuos positivos del segundo dominio en hélice transmembrana (MII) de AtHKT1;1 y TaHKT2;1, se observó que dichos residuos también tenían un papel importante en el funcionamiento de los transportadores HKT de plantas (Kato *et al.*, 2007). La sustitución de una arginina (R), R519 en TaHKT2;1 y R487 en AtHKT1;1 por una alanina (A), glutamina (Q), ácido glutámico (E) y lisina (K), se analizó en células de levadura CY162 y oocitos de *Xenopus laevis*. Todas las células de levadura transformadas con TaHKT2;1 fueron capaces de crecer en presencia de 1 mM KCl. Experimentos parecidos realizados con AtHKT1;1 mostraron que sólo los oocitos que expresaban AtHKT1;1 y R487K transportaban Na⁺. Estos resultados indicaban que R519 y R478 jugaban un papel fundamental en el transporte iónico llevado a cabo por TaHKT2;1 y AtHKT1;1 respectivamente. Otros aminoácidos cargados positivamente presentes en el dominio M2 también se mutaron, entre ellos, la lisina (K) K508, K521 y K529 (en TaHKT2;1) y K476, K489 y R497 (en AtHKT1;1), analizándose la actividad de transporte de cationes en oocitos de *Xenopus laevis*. K508Q y R519Q mostraron una actividad de transporte reducida en comparación con K521Q y K529Q. Estos resultados mostraron que la sustitución individual de aminoácidos cargados positivamente con Q en el dominio M2 no elimina la actividad de captación de cationes de HKT de plantas (Kato *et al.*, 2007).

Thellungiella salsuginea, un pariente de *Arabidopsis* tolerante a la salinidad, tiene dos genes HKT, TsHKT1;1 y TsHKT1;2, que se inducen por NaCl. Teniendo en cuenta la diferente respuesta inducida por la salinidad en los patrones de expresión de HKT de *Arabidopsis* y *Thellungiella*, Ali y colaboradores (2012) generaron líneas TsHKT-RNAi y analizaron su sensibilidad a la salinidad. Las líneas silenciadas que crecieron en hidropónico y fueron tratadas con 250 mM NaCl durante 24 horas mostraron una disminución en la acumulación de K⁺ y una menor proporción Na⁺/K⁺ en la parte aérea y mayor en la raíz, lo cual sugería un papel de TsHKT1;2 en el mantenimiento de la homeostasis del K⁺. La especificidad para el K⁺ de TsHKT1;2 parece depender de la presencia de dos residuos de ácido aspártico (D) localizados en las posiciones D207 y D238. Cuando estos dos residuos, juntos o por separado, se reemplazaban por residuos de Asparagina (N), presente en AtHKT1;1, se reducía el crecimiento de células de levadura CY162 transformadas que crecían en presencia de Na⁺ y bajas concentraciones de K⁺. Estos resultados mostraron que, en el caso de TsHKT1;2, que tiene un residuo de Ser en el primer dominio P-loop, dos residuos específicos de D, tienen una gran influencia en la selectividad iónica del transportador (Ali *et al.*, 2012).

Además de los aminoácidos mencionados anteriormente, se ha analizado la función de ciertos aminoácidos en dominios específicos, que parecen tener un papel crucial para el correcto funcionamiento de los transportadores HKT (Figs. I18 e I19) (Ren *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2013b; Waters *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2017). De este modo, en

arroz, Ren y colaboradores (2005) propusieron que cuatro sustituciones aminoacídicas (A140P, H184R, D332H and V395L) eran las responsables de las diferencias en el funcionamiento de HKT entre variedades de arroz con distinta tolerancia a la salinidad (Nona Bokra, tolerante y Koshihikari, sensible). De estas cuatro sustituciones aminoacídicas, Cotsaftis y colaboradores (2012) mostraron que sólo la sustitución V395L estaba asociada con las diferencias en los niveles de Na^+ de la planta completa, la retención de Na^+ en la raíz, las tasas de transporte de Na^+ y la tolerancia a la salinidad de los distintos cultivares. Todos estos ejemplos sugieren que, además de los residuos presentes en los dominios *P-loop*, existen otros residuos localizados en otras regiones de la proteína que también son de gran relevancia para el funcionamiento de los distintos transportadores HKT (Almeida *et al.*, 2013).

I4.3. FUNCIONES DE HKT EN LA TOLERANCIA DE LAS PLANTAS A LA SALINIDAD

Como ya se mencionó en apartado I3.1.4, en *Arabidopsis* se ha sugerido la existencia de dos modelos complementarios que explican el mecanismo de acción de HKT1 (Berthomieu *et al.*, 2003; Sunarpi *et al.*, 2005). El “modelo de recirculación a través del floema” (Berthomieu *et al.*, 2003) y el “modelo de descarga de Na^+ desde la corriente de transpiración del xilema hacia las XPC de la raíz” (Fig. I9) (Sunarpi *et al.*, 2005; Davenport *et al.*, 2007; Moller *et al.*, 2009). Aunque existen estudios que avalan ambos modelos, se asume que la función más importante de HKT1 es la descarga de Na^+ desde los vasos del xilema (Fig. I9) (Davenport *et al.*, 2007), ya que el movimiento de Na^+ que baja desde la parte aérea hacia la raíz a través del floema es mucho menor que el que sube desde la raíz hacia la parte aérea a través del xilema (Berthomieu *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2017). Además de estas dos funciones, HKT1 también se ha asociado con la regulación de la acumulación de Na^+ en la parte aérea, concretamente, con el mecanismo de exclusión de Na^+ desde la parte aérea (Almeida *et al.*, 2014; Su *et al.* 2015; Zhang *et al.*, 2017a).

Los genes *HKT* se han encontrado frecuentemente asociados a QTLs previamente descritos que explicaban la variabilidad en la tolerancia a la salinidad en trigo (Dvořák *et al.*, 1994; Dubcovsky *et al.*, 1996; Byrt *et al.*, 2007), habiéndose demostrado que en ecotipos tolerantes con variantes hipo- e hiperalélicas, la manipulación de la expresión génica de HKT para mejorar la tolerancia a la salinidad aportaba grandes beneficios en plantas como *Arabidopsis* (Rus *et al.* 2006; Møller *et al.* 2009), arroz (Ren *et al.*, 2005; Plett y Møller, 2010; Cotsaftis *et al.*, 2012), cebada (Mian *et al.*, 2011) y trigo (Munns *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2006a). Así, por ejemplo, la expresión específica de AtHKT1;1 en células de la estela del cilindro vascular de la raíz mejoraba la tolerancia a la salinidad en *Arabidopsis* y arroz (Møller *et al.* 2009; Plett *et al.*, 2010). Por otro lado, plantas de cebada que sobreexpresaban HvHKT2 mostraban una tasa de crecimiento un 25-30% mayor que las plantas silvestres cuando se cultivaban en sistema hidropónico con soluciones suplementadas con 50 o 100 mM de NaCl y 2 mM de K^+ (Mian *et al.*, 2011). Más tarde, Munns *et al.* (2012) mejoraron la tolerancia a la salinidad del trigo mediante la

introducción de un transportador ancestral de Na⁺ de *Triticum monococcum* (TmHKT1;5-A) en el cultivar de trigo moderno, *Triticum turgidum* ssp. *durum* var. Tamaroi. En arroz, se ha identificado un rasgo cuantitativo o QTL (*SKC1*) implicado en el mantenimiento de una mayor proporción K⁺/Na⁺ en condiciones de estrés por salinidad (Ren *et al.*, 2005). Al comparar el cDNA del rasgo *SKC1* con las bases de datos disponibles, se comprobó que correspondía al gen *OsHKT1;5* (Ren *et al.*, 2005). Tras realizar un análisis de la expresión génica, y de la acumulación de Na⁺ y K⁺ en la parte aérea, así como de la expresión heteróloga en oocitos de *Xenopus laevis* se concluyó que este gen tenía una función similar a la descrita previamente para *AtHKT1;1* en *Arabidopsis thaliana* (Uozumi *et al.*, 2000; Sunarpi *et al.*, 2005). A diferencia de *Arabidopsis*, en el genoma de arroz existen cuatro miembros más de transportadores HKT pertenecientes a la subfamilia I (HKT1): *OsHKT1;1*, *OsHKT1;2*, *OsHKT1;3* y *OsHKT1;4* (Garcia-deblás *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2005; Jabnourne *et al.*, 2009; Cotsaftis *et al.*, 2012). Aunque existen algunas diferencias con respecto a los niveles de expresión de los distintos transportadores de arroz HKT1, casi todos se expresan en la raíz (excepto *OsHKT1;2*) y en la parte aérea, tanto en células buliformes como en los tejidos vasculares, y tanto en xilema como en floema (Garcia-deblás *et al.*, 2003; Jabnourne *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Cotsaftis *et al.*, 2012).

En trigo, el análisis de QTLs mediante el uso de un nuevo trigo duro, la línea 149 (*Triticum turgidum* L. subsp. *Durum*), identificó dos loci, *Nax1* (Bañuelos *et al.*, 2008) y *Nax2* (Byrt *et al.*, 2007), implicados en la exclusión de Na⁺ desde el xilema y la reducción del transporte de Na⁺ hacia la parte aérea (Byrt *et al.*, 2007; Bañuelos *et al.*, 2008). Además, el trigo harinero (o trigo de pan), *Triticum aestivum*, que contiene los genomas A, B y D, es más tolerante a la salinidad que el trigo duro, que contiene los genomas A y B (Gorham *et al.*, 1990; Dubcovsky *et al.*, 1996). Parece ser que el genoma D tiene un locus, *Kna1*, responsable de la alta proporción K⁺/Na⁺ durante el estrés salino, que confiere la tolerancia a la salinidad al trigo harinero (Gorham *et al.*, 1987; Dubcovsky *et al.*, 1996). Los tres QTLs *Nax1*, *Nax2* y *Kna1* de *Triticum* sp. controlan tanto la retirada de Na⁺ procedente del xilema como la acumulación de Na⁺ en la vaina de las hojas (Huang *et al.*, 2006a; Byrt *et al.*, 2007; James *et al.*, 2011). Estos genes tienen claramente una función similar a la de *AtHKT1;1* de *Arabidopsis* y *OsHKT1;5* y *OsHKT1;4* de arroz (Ren *et al.*, 2005; Sunarpi *et al.*, 2005; James *et al.*, 2006; Plett *et al.*, 2010; Cotsaftis *et al.*, 2012). Por el contrario, en dicotiledóneas, en dos ecotipos de *Arabidopsis* tolerantes a la salinidad, caracterizados por una mayor acumulación de Na⁺ en la parte aérea, se correlacionó con la presencia de un alelo de *AtHKT1*, que presentaba una expresión reducida en raíces, debido a una delección en tandem de una secuencia repetitiva 5kb aguas arriba de su codón de inicio, lo que parecía impedir la retirada de Na⁺ del xilema, conduciendo a unos niveles elevados de catión en la parte aérea, rasgo que sin embargo se asociaba con una mejor tolerancia a la sal en estos ecotipos (Rus *et al.*, 2006; Baxter *et al.*, 2010). Más recientemente, se ha conocido que la tolerancia a la salinidad de estos ecotipos era en parte debido a una mayor expresión de una variante de *AtHKT1;1* en la parte aérea, que proveía la capacidad de excluir Na⁺ de los órganos reproductivos (flores) (An *et al.* 2017).

Aunque la manipulación de la expresión génica, como ya se ha comentado, es claramente útil para mejorar la tolerancia de las plantas de cultivo (Munns *et al.*, 2012), es importante entender bien la función, regulación y patrones de expresión de estos transportadores para poder conseguir los resultados deseados (Waters *et al.*, 2013). Por ejemplo, Moller *et al.* (2009) sobreexpresaron el gen *HKT1;1* de *Arabidopsis* utilizando un promotor constitutivo y un promotor que era específico para las células de la estela de la raíz. Las plantas transgénicas que sobreexpresaban *AtHKT1;1* constitutivamente acumularon mayores cantidades de sal en la parte aérea y fueron relativamente más sensibles a la salinidad que las plantas control, mientras que las plantas que sobreexpresaban el mismo gen de forma específica en las células de la estela de la raíz acumularon menos sal en la parte aérea y fueron más tolerantes a la salinidad. Similares resultados se han obtenido expresando *AtHKT1;1* bajo el control de un promotor específico para las células de la estela de la raíz en arroz (Plett *et al.*, 2010). También hay evidencias de que las proteínas HKT pueden tener diferentes funciones dentro de una misma planta, por lo que a la hora de modificar la expresión de *HKT* con el objetivo de mejorar la tolerancia a la salinidad, es importante elegir correctamente el alelo. Por ejemplo, *TmHKT1;5-A* se localiza en la membrana plasmática de las células que rodean el xilema de la raíz, donde el transportador mueve el Na^+ a favor del gradiente electroquímico, lo que en la mayoría de las circunstancias fisiológicas supone sacar dicho catión del xilema. Sin embargo, *TaHKT2;1*, *OsHKT2;1* y *OsHKT2;4* parecen expresarse en la membrana plasmática de las zonas más externa de la raíz, incluyendo los pelos radicales, proporcionando un punto de entrada para el Na^+ desde la solución del suelo hacia la raíz. Esto se ha interpretado como que dichas isoformas generan un gradiente electroquímico para la entrada de Na^+ en las células vegetales que ayudaría con la entrada de K^+ de alta afinidad en las raíces cuando el K^+ se encuentra a bajas concentraciones en la solución del suelo (Schachtman y Schroeder, 1994; Laurie *et al.*, 2002; Horie *et al.*, 2007; Lan *et al.*, 2010; Sassi *et al.*, 2012). Con todo ello en mente, queda patente la importancia de conocer y entender cómo funciona concretamente cada una de las proteínas HKT antes de manipular su expresión o seleccionar un alelo para aumentar la productividad de una especie o de una variedad en un suelo salino.

15. EL TOMATE COMO PLANTA MODELO EN ESTUDIOS DE SALINIDAD

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es la hortaliza más consumida en el mundo. Perteneciente a las solanáceas, un grupo de plantas de sensibilidad intermedia a la salinidad, aunque puede ser particularmente sensible cuando se encuentra en estadio de plántula. La salinidad afecta de diversas maneras a las plantas de tomate, siendo adversos la mayoría de sus efectos. Existen especies silvestres más tolerantes a la salinidad que el tomate cultivado, tales como *Solanum pennellii* Correll, *S. cheesmaniae* (L. Riley) Fosberg y *S. pimpinellifolium* L., las cuales, por su proximidad con el tomate podrían utilizarse como fuentes de variabilidad genética en cultivares de interés comercial. En este apartado se estudiará detalladamente el tomate cultivado y su importancia como planta modelo en los estudios de salinidad, así como las mencionadas especies silvestres relacionadas con el tomate, entre las que destacaremos *S. cheesmaniae*, por su tolerancia a la salinidad y por su relevancia en la presente Tesis Doctoral.

15.1. DESCRIPCIÓN DEL TOMATE CULTIVADO (*S. lycopersicum*)

El tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*) es una especie de porte herbáceo perteneciente al género *Solanum*, de la familia *Solanaceae*, la cual comprende 98 géneros y más de 3000 especies que crecen en una gran diversidad de hábitats, desde zonas áridas hasta la alta montaña. Además del tomate, incluye otras especies de interés agronómico como el pimiento (*Capsicum*), la patata (*Solanum tuberosum*), la berenjena (*Solanum melongena*) y el tabaco (*Nicotiana tabacum*), constituyéndose en una de las familias de mayor importancia alimenticia y económica del mundo (Weese y Bohs, 2007; Frodin, 2004).

15.1.1. Taxonomía y características del tomate

La taxonomía del tomate ha sufrido cambios a través del tiempo. Originalmente fue clasificado como *Solanum lycopersicum* por Linneo (Linnaeus, 1753), siendo posteriormente reclasificado como *Lycopersicum esculentum* por Miller (1754). Esta clasificación fue sujeto de debate durante largo tiempo, hasta que, gracias al uso de herramientas moleculares, a finales del siglo pasado se aceptó como denominación botánica definitiva del tomate la propuesta inicialmente por Carlos Linneo. Estas herramientas moleculares revelaron la suficiente información a nivel genómico como para permitir la revisión de la clasificación filogenética de la familia *Solanaceae*, momento a partir del cual el antiguo género *Lycopersicum* se reintrodujo dentro del género *Solanum*, tal y como lo había clasificado Linneo 200 años antes (Foolad, 2007; Peralta et al., 2008). Por ello, la taxonomía actualmente aceptada para esta especie es la que aparece en la Tabla I5.

Table I5. Taxonomic classification of tomato (Linnaeus, 1753).

TAXONOMY OF TOMATO	
DOMAIN:	Eucarya
KINGDOM:	Plantae
PHYLUM:	Magnoliophyta
CLASS:	Magnoliopsida
SUBCLASS:	Asteridae
ORDER:	Solanales
FAMILY:	Solanaceae
GENUS:	<i>Solanum</i>
ESPECIES:	<i>Solanum lycopersicum</i> L.

El tomate es una planta perenne de porte arbustivo, por lo que en su hábitat natural (regiones tropicales o subtropicales de todo el mundo) puede vivir durante varios años. Sin embargo, en nuestro clima la cultivamos como planta anual o bienal, ya que las bajas temperaturas del invierno no le permiten sobrevivir (Chamarro, 1995). Existen dos tipos de plantas en base al tipo de crecimiento: las plantas de crecimiento determinado y las de crecimiento indeterminado (Chamarro, 1995). El tomate cultivado pertenece a las

plantas de crecimiento indeterminado, en el cual, los tallos presentan segmentos uniformes con tres hojas (debajo de las cuales encontramos yemas) y una inflorescencia, terminando siempre con un ápice vegetativo (Chamarro, 1995; Acquaah, 2009). A diferencia de éstas, las plantas con crecimiento determinado tienen tallos con segmentos que presentan progresivamente menos hojas por inflorescencia y terminan en una inflorescencia, lo que resulta en un crecimiento limitado de la planta. Los tallos son gruesos y angulosos, de color verde o amarillado, con pelos cortos con o sin glándulas y pelos largos, blancos y pluricelulares (Fig. I21A), pudiendo aparecer tallos secundarios que salen de las axilas de las hojas (Chamarro, 1995; Acquaah, 2009). El sistema radicular está compuesto por una raíz principal corta y débil, y raíces secundarias que son numerosas y potentes (Fig. I21B). Las hojas son compuestas, anchas y aplanadas, con 7-11 folíolos peciolados y lobulados, con el borde dentado (Chamarro, 1995). Las flores son hermafroditas, simétricas, regulares e hipóginas (Chamarro, 1995; Acquaah, 2009). Las inflorescencias están compuestas por 4-12 flores, que presentan corolas formadas por 5 o más pétalos de color amarillo, lanceolados y fusionados en la base (Chamarro, 1995; Acquaah, 2009). Los sépalos son más pequeños que los pétalos (Chamarro, 1995; Acquaah, 2009). Contienen cinco estambres fusionados a la corola por sus filamentos, anteras largas de color amarillo, que están unidas lateralmente, formando un cono estaminal que envuelve el gineceo (Chamarro, 1995). El pistilo está formado por un ovario bi- o plurilocular, de estilo delgado y el estigma cubierto por una secreción de naturaleza lipídica (Chamarro, 1995; Acquaah, 2009). Los carpelos se presentan en posición oblicua con respecto al plano mediano de la flor (Fig. I21C). El fruto es una baya, que puede presentar una gran diversidad de tamaños y formas, que se encuentra unido a la planta por un pedicelo con un engrosamiento articulado que contiene la capa de abscisión (Chamarro, 1995). Generalmente son de color rojo o anaranjado, pudiendo ser biloculares o multiloculares. Presentan una placenta gruesa, con numerosas semillas recubiertas de una sustancia mucilaginosa (Fig. I21D) (Chamarro, 1995; Peralta *et al.*, 2008; Acquaah, 2009).



Figure I21. Appearance of tomato plant showing its different parts. A) Stems; B) roots; C) inflorescence; D) fruits.

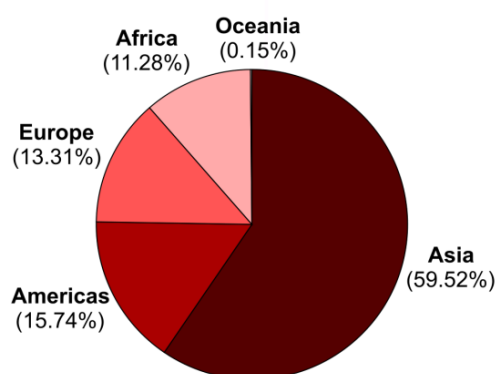
I5.1.2. Importancia agronómica del tomate

El cultivo del tomate es uno de los más extendidos en la actualidad y de mayor valor económico (FAO, 2014). Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. El tomate se puede consumir tanto en fresco como procesado, existiendo en el mercado una gran variedad de productos disponibles, tales como sopas,

salsas, zumos, deshidratados, enlatados... (Bergougnoux, 2014). Según las estadísticas de la Organización de Agricultura y Alimentación de las Naciones Unidas (FAOSTAT), el tomate se cultiva aproximadamente en 5 Mha alrededor del mundo, con una producción de 170.75 millones de toneladas (MMt) de tomate fresco en el año 2014. Actualmente, Asia domina el mercado de tomate, con prácticamente un 60% de la producción mundial, seguido por América, Europa, África y por último Oceanía, con apenas un 0.15% de la producción mundial (Fig. I22A). España, con 14.51 MMt, es actualmente el octavo país con más producción de tomate, siendo China el mayor productor a nivel mundial, con 52.72 MMt (Fig. I22B).

El cultivo del tomate está bastante extendido en España, encontrándose las mayores producciones en Andalucía, Extremadura, Región de Murcia, Navarra y Castilla-La Mancha (Tabla I5). En estas zonas, fuertemente dependientes de la irrigación, se viene produciendo un fenómeno de salinización creciente de los suelos y del agua de riego, tal y como se había mencionado previamente (Apartado I1.2.1). Esta salinización, originada fundamentalmente por las malas prácticas de riego y el uso de aguas salobres, está afectando gravemente a la producción del cultivo de tomate (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999). Andalucía es la principal productora de tomate de España, con alrededor de 2.49 MMt producidas en 2016 (Tabla I6), alcanzando así el 47.5% de la producción nacional de tomate. Su producción se destina principalmente al mercado en fresco, exportándose una gran parte de ella, siendo el tomate fresco o refrigerado el segundo producto agroalimentario más exportado por Andalucía, después del aceite de oliva virgen (Anuario de Estadística Agraria. Datos de 2016).

A) Tomato production by continents (%)



B) Largest tomato producing countries

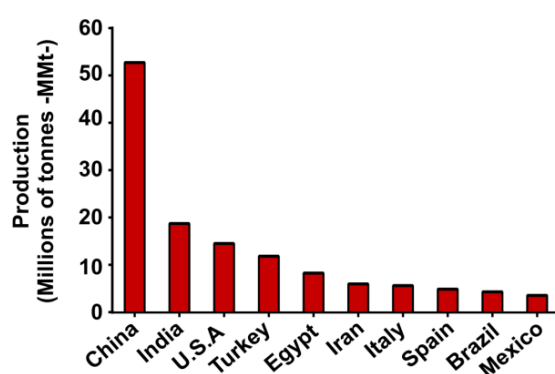


Figure I22. Tomato production around the World. A) Tomato production by continents (%); B) Largest tomato producing countries. Data for the year 2014. Source: FAOSTAT (<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>).

Table I6. Area and production of tomato in Spain. Source: Anuario de Estadística Agraria. Data for the year 2016.

Provinces and Autonomous Communities	Area (hectares)				Yield (kg/ha)			Production (tonnes)
	Dry Land	Irrigation		Total	Dry Land	Irrigation		
		Outdoors	Protected			Outdoors	Protected	
Andalusia	104	10.984	14.859	25.947	71.109	89.294	100.790	2.485.839
Extremadura	-	24.332	-	24.332	-	72.827	-	1.772.026
R. of Murcia	-	-	2.408	2.408	-	-	119.798	288.474
Navarre	-	2.186	50	2.236	-	81.990	82.000	183.330
Castile-La Mancha	77	1.197	33	1.307	4.226	72.558	160.000	92.458
Galicia	-	222	879	1.101	-	56.383	87.415	89.356
Canary Islands	4	96	790	890	35.000	44.708	98.945	82.598
Valencian Comm.	38	733	484	1.255	7.663	35.777	108.099	78.835
Aragon	38	720	6	764	16.118	74.907	131.833	55.337
Catalonia	59	1.060	141	1.260	5.470	34.606	109.555	52.454
La Rioja	-	195	19	214	-	71.000	105.000	15.840
Balearic Islands	-	330	60	390	-	34.875	50.000	14.509
Basque country	80	139	75	294	9.125	19.658	51.721	7.341
Castile and León	-	110	22	132	-	38.535	66.564	5.703
Madrid	-	21	33	54	-	52.000	120.000	5.052
P. of Asturias	50	30	35	115	15.000	30.000	45.000	3.225
Cantabria	16	-	-	16	72.810	-	-	1.165
SPAIN	466	42.355	19.894	62.715	25.176	75.242	102.289	5.233.542

I5.1.3. El tomate como planta modelo en la investigación de los mecanismos de tolerancia a la salinidad

El tomate se considera una especie modelo para los análisis genéticos (Bergougnoux, 2014; Schwarz *et al.*, 2014). Aunque existen otras plantas modelo, como maíz, arroz o *Arabidopsis thaliana*, el tomate es filogenéticamente distinto a las anteriores especies, ya que posee características morfológicas específicas (Bergougnoux, 2014) que hacen de ella un excelente modelo de planta de cosecha, siendo especialmente idónea para la investigación en frutos carnosos (Foolad, 2007). Ofrece ciertas ventajas, como son un genoma de tamaño reducido (950 Mbp) con respecto a otros cultivos, tiempos de generación relativamente cortos, autogamia, elevado potencial reproductivo (fácil polinización y propagación vegetativa) y posibilidad de ser utilizada en ensayos rutinarios de transformación. Por todo ello ha sido posible obtener gran cantidad de información sobre esta planta, así como recursos genéticos, citogenéticos, fisiológicos y moleculares (<http://solgenomics.net/>). Entre las herramientas genéticas que tenemos a nuestra disposición, podemos encontrar numerosos mutantes caracterizados (<http://www.zamir.sgn.cornell.edu>), marcadores de DNA (Tanksley *et al.*, 1992), colecciones de ESTs (Van der Hoeven, 2002), *microarrays* y bases de datos públicos (Yano *et al.*, 2007), así como librerías de insertos genómicos tipo YAC (Bonnema *et al.*, 1996) y BAC (Budiman *et al.*, 2000; Hamilton y Baulcombe, 1999), además de abundantes recursos fitogenéticos y entradas de especies silvestres (<http://tgrc.ucdavis.edu/>). Todos estos aspectos hacen del tomate uno de los más efectivos modelos entre las especies cultivadas.

En relación a la investigación de los mecanismos de tolerancia de plantas a la salinidad, la planta modelo por excelencia, *Arabidopsis thaliana*, presenta dos grandes limitaciones en lo que se refiere al estudio del transporte de Na⁺ a larga distancia con respecto al tomate. La primera, es la práctica ausencia de tallo, siendo éste tan corto que no permite una disección precisa de los contenidos relativos de Na⁺ en éste con respecto a las hojas, lo cual limita el estudio de importantes factores que controlan la homeostasis de Na⁺ y K⁺ a nivel de planta completa bajo condiciones salinas, como pueden ser los procesos de reabsorción de Na⁺ por el tallo y su redistribución en hojas viejas (Tester y Davenport, 2003). La segunda gran limitación es el interés agronómico de *Arabidopsis* con respecto al de tomate. Sin embargo, el tomate constituye un conveniente modelo de planta de cosecha donde estudiar las bases moleculares de la homeostasis de Na⁺ y K⁺ bajo condiciones salinas en especies hortícolas de interés agronómico, ya que presenta una gran diversidad genotípica en relación a la homeostasia iónica, proceso clave en la tolerancia a la salinidad. Así, se ha demostrado que el control del transporte de iones a larga distancia durante el estrés salino constituye un importante determinante de su tolerancia a condiciones salinas, de forma que las variedades más halotolerantes acumulan mayor cantidad de sales en tallos y hojas (con una distribución diferencial en hojas viejas, evitando así su acumulación en hojas jóvenes) y las más sensibles lo hacen preferencialmente en raíces (Cuartero y Fernandez-Muñoz, 1999; Foolad, 2004; Cuartero *et al.*, 2006). La raíz de tomate parece determinar, en una gran medida, las concentraciones de Na⁺ que llegan a la parte aérea en función de la intensidad del estrés (Estañ *et al.*, 2005).

Asimismo, el tomate presenta la ventaja añadida de su gran relevancia económica, tanto nacional como internacional, el gran número de estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares de los que ha sido objeto, así como la gran cantidad de información disponible a través de proyectos de secuenciación a gran escala (*The International Tomato Genome Sequencing Consortium*, http://solgenomics.net/about/tomato_sequencing.pl) que hicieron posible la liberación de la secuencia completa de DNA del cultivar “Heinz 1706” en abril del año 2012.

El tomate se suele considerar como una planta que tolera moderadamente la salinidad, aunque cuando se encuentra en estado de plántula puede ser particularmente sensible a dicho estrés (Cuartero, 2006). La salinidad afecta de diversas maneras a las plantas de tomate, siendo la mayoría de sus efectos adversos (Cuartero, 2006). Por ejemplo, el porcentaje de germinación disminuye a concentraciones de NaCl relativamente bajas, alargándose además el tiempo de dicho proceso. A nivel de la raíz, el crecimiento también se ve afectado por la salinidad, ralentizándose a partir de los 4-6 dS/m. Sin embargo, la parte de la planta que parece verse más afectada en cuanto al crecimiento es la parte aérea, viéndose reducida la altura del tallo, así como el número y el tamaño de las hojas, presentando éstas desecación en sus bordes. Esto afecta a la relación entre el peso seco de la parte aérea y el peso seco de la parte radical, que se vuelve mayor en plantas sometidas a estrés por salinidad (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999; Romero-Aranda *et al.*, 2001; Reina-Sánchez *et al.*, 2005). La disminución en el número y el tamaño de las hojas está directamente relacionada con una reducción en la tasa fotosintética, por lo que se reduce la producción de fotoasimilados, lo cual a su vez hace disminuir el número y el crecimiento de los frutos (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999; Romero-Aranda *et al.*, 2001; Reina-Sánchez *et al.*, 2005).

A pesar de todos estos efectos negativos, si consideramos estrictamente la calidad de los frutos en términos organolépticos, la salinidad puede tener efectos positivos sobre el tomate, ya que puede aumentar el contenido de compuestos solubles, como la sacarosa, los licopenos y los ácidos orgánicos, mejorando la calidad del fruto. Sin embargo, al hacer balance entre los efectos favorables y adversos, claramente predominan los efectos adversos, ya que, si el estrés causado por la salinidad se prolonga en el tiempo, puede llegar a causar un déficit hídrico, que puede provocar en muchos casos la putrefacción del fruto e incluso la muerte de la planta (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999).

En resumen, podemos decir que la mayoría de los cultivares comerciales de tomate son moderadamente sensibles a la salinidad durante todos los estadios de desarrollo de la planta, incluyendo la germinación de la semilla, el crecimiento vegetativo y la reproducción. Como resultado, el rendimiento económico de las cosechas se reduce sustancialmente en condiciones de estrés por salinidad (Foolad, 2004).

15.2. ESPECIES SILVESTRES DEL TOMATE COMO FUENTE DE VARIABILIDAD GENÉTICA

Actualmente se reconocen trece especies de tomates (Peralta *et al.*, 2005), once de las cuales se encuentran distribuidas a lo largo de la costa occidental de Sudamérica, desde la zona central de Ecuador hasta el norte de Chile, y otras dos endémicas de las Islas Galápagos (Table I6). Dentro del género *Solanum* se incluye el tomate cultivado (*S. lycopersicum*), única especie domesticada, y otras 12 especies afines (Prohens *et al.*, 2008). Estas especies afines, más conocidas como tomates silvestres, poseen una gran diversidad genética que todavía está por explorar (Bohnert *et al.*, 2006; Cuartero *et al.*, 2006; Foolad, 2007; Nevo y Chen, 2010), representando en la actualidad el principal recurso genético en la mejora del tomate cultivado (Bai y Lindhout, 2007; Foolad, 2007). A título de ejemplo, algunas de estas especies silvestres, como *Solanum pimpinellifolium* o *Solanum cheesmaniae* soportan concentraciones de 150-200 mM NaCl sin merma aparente en el crecimiento (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999), pudiendo actuar como donadores de dichos rasgos de tolerancia (Foolad, 2004). Estas especies de comportamiento halófito se diferencian del tomate cultivado en una serie de rasgos determinados que minimizan los efectos osmóticos y tóxicos de las sales, tales como la compartimentación de dichas sales en vacuolas celulares, la recirculación de los iones a través de los órganos de las plantas y en definitiva, un mejor ajuste osmótico, manteniendo en todo momento una alta relación K^+/Na^+ en el citosol (Cuartero y Fernandez-Muñoz, 1999; Cuartero *et al.*, 2006; Asins *et al.*, 2013). Sin embargo, en la actualidad, apenas conocemos qué genes determinan la tolerancia a la salinidad en estas entradas silvestres (Yang y Guo, 2017).

Tal y como se ha comentado en varias ocasiones a lo largo de esta memoria, los elevados niveles de salinidad que con frecuencia encontramos en los suelos o en el agua de riego plantean serias limitaciones en la producción del tomate, problema que además va empeorando con el paso del tiempo (Foolad, 2004). Por lo tanto, para mantener los niveles actuales de productividad o aumentar la producción total mediante el uso de suelos salinos marginales, son necesarios cultivares de tomate con una mayor tolerancia a la salinidad (Foolad, 2004).

El tomate cultivado posee una variabilidad genética limitada, en gran parte debida a las selecciones naturales y artificiales producidas durante la domesticación y desarrollo de los cultivares modernos (Ladizinsky, 1985) y especialmente por el cuello de botella que se produjo al importarlo a Europa. Así, el reducido número de tomates introducidos por los españoles tras el descubrimiento de América, constituye la base genética de todo los cultivares modernos. Se estima que solo un 5% de la variabilidad total del genero *Solanum* secc. *Lycopersicon* está presente en *S. lycopersicum* (Miller y Tanksley, 1990). A pesar de que las especies silvestres de tomate actualmente son una fuente de genes de interés agrícola para programas de mejora, aún están muy poco aprovechadas. Para aprovecharlas es necesario, por un lado, la identificación de las fuentes de variabilidad en un carácter de interés, y por otro, introducir esa variabilidad en un programa de mejora (Francia *et al.*, 2005). En la tabla I7 se presenta un resumen de las principales características de las

especies silvestres de tomate, con las características de interés que han sido o podrían ser consideradas en eventuales programas de mejora genética.

Todas las especies silvestres de tomate se pueden llegar a cruzar con el tomate cultivado (*S. lycopersicum*) con mayor o menor eficiencia, siempre y cuando el tomate domesticado se utilice como receptor de polen (Bedinger *et al.*, 2011). Entre las características agronómicas más interesantes que muestran las especies silvestres de la sección *Lycopersicon* del género *Solanum* podemos encontrar la resistencia a diferentes tipos de estrés (Tabla I7). Como ejemplo cabe citar la gran tolerancia a la salinidad en especies como *S. cheesmaniae*. Otras, como *S. pennellii*, florecen en hábitats extremadamente secos de Perú Occidental; *S. habrochaites* puede tolerar el frío y las heladas, mientras que variedades de la forma silvestre de *S. lycopersicum* L. “cerasiforme” poseen tolerancia a la humedad (Prohens y Nuez, 2008).

Table I7. Characteristics of interest of wild tomato relatives in tomato breeding. Taken from Prohens & Nuez 2008.

SPECIES	CHARACTERISTIC OF INTEREST
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> L.	Tolerance to humidity, resistance to fungi and root rot
<i>S. cheesmaniae</i> (L. Riley) Fosberg and <i>S. galapagense</i> S. Darwin & Peralta	Tolerance to salinity, <i>jointless</i> gene and thick pericarp
<i>S. pimpinellifolium</i> L.	Colour, characteristics of quality, resistance to diseases
<i>S. chmielewskii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen	High sugar content
<i>S. neorickii</i> D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen	Resistance to bacteria
<i>S. pennellii</i> Correll	Resistance to drought
<i>S. habrochaites</i> S. Knapp & D. M. Spooner	Tolerance to cold and chilling, resistance to insects and diseases
<i>S. chilense</i> (Dunal) Reiche	Resistance to drought and diseases
Complex peruvianum: <i>S. peruvianum</i> (L.), <i>S. arcanum</i> (Peralta), <i>S.</i> <i>corneliomuelleri</i> (J.F. Macbr.), <i>S. huaylasense</i> (Peralta & S. Knaap)	Resistance to viral, fungal and bacterial diseases

Las nuevas herramientas de genómica funcional, algunas de las cuales se describirán en los apartados I5.3.3 e I6, nos permiten la identificación de numerosos genes inducidos por estrés, pero por el momento sólo se conoce la función de un número muy limitado de los mismos (Munns y Tester, 2008; Hasegawa, 2013; Roy *et al.*, 2014; Munns *et al.*, 2016; Yang y Guo, 2017). Además, en la mayoría de los casos, los genes identificados proceden de especies modelo (Munns, 2005; Cuartero *et al.*, 2006). En la última década, los mayores esfuerzos para identificar genes implicados en la tolerancia a estrés abiótico se han dirigido hacia la sobreexpresión de genes endógenos o la expresión heteróloga de

genes que teóricamente intervienen en diferentes procesos, como la tolerancia a la salinidad (revisado en Munns, 2005; Tuberosa y Salvi *et al.*, 2006; Cuartero *et al.*, 2006). Una estrategia alternativa sería la búsqueda de genes en especies tolerantes, en vez de centrarse en las especies cultivadas, que suelen ser más sensibles al estrés (Flowers y Colmer, 2008; Lugan *et al.*, 2010). Diferentes autores han revisado los mecanismos de tolerancia en plantas halófitas (capaces de sobrevivir y reproducirse en ambientes con altas concentraciones salinas) y han propuesto que las investigaciones futura se deberían dirigir hacia la identificación de los determinantes de tolerancia en estas especies (Flowers y Colmer, 2008; Lugan *et al.*, 2010). Además, las plantas halófitas parecen poseer más genes relacionados con la tolerancia a la salinidad y la sequía que las plantas glicófitas (Askari *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2011; Bartels y Dinakar, 2013), por lo que el uso de especies halófitas para identificar genes implicados en la tolerancia a la salinidad o sequía puede ser una buena estrategia para mejorar la tolerancia a estos estreses en los cultivos actuales (Hasegawa, 2013; Munns *et al.*, 2016; Yang y Guo, 2017).

En resumen, el tomate puede ser un modelo excelente en este sentido, ya que existen especies silvestres relacionadas, como *S. cheesmaniae*, la cual tiene gran relevancia en el presente trabajo, ya que una de las NILs utilizadas en esta Tesis Doctoral para analizar los patrones de expresión y los efectos fenotípicos de *HKT1* con respecto a la salinidad, concretamente NIL14, posee los alelos de los genes *HKT1;1* y *HKT1;2* procedentes de esta especie silvestre, la cual, como ya se ha mencionado, exhibe un alto grado de tolerancia a la salinidad (Tal y Shannon, 1983; Asins *et al.*, 2013; Albaladejo *et al.*, 2015).

I5.2.1. Taxonomía y características de *S. cheesmaniae*

S. cheesmaniae es una especie silvestre de tomate, endémica de las Islas Galápagos, Ecuador, que crece en zonas rocosas extremadamente áridas y salinas, desde el nivel del mar hasta los 500 sobre el nivel del mar (Darwin *et al.*, 2003; Peralta *et al.*, 2005). Al igual que *S. lycopersicum*, es una especie de porte herbáceo o arbustivo, perteneciente al género *Solanum*. Debido a que esta especie, junto con *Solanum galapagense*, también endémica de las Islas Galápagos, han crecido completamente aisladas del resto de las especies silvestres de tomate del continente, presentan una serie de características inusuales (Fig. I23), tales como un color de frutos amarillo-anaranjado, hojas de un color verde-amarillento y semillas más pequeñas que las del tomate cultivado (Nuez *et al.*, 2004). Sus hojas son relativamente pequeñas, suculentas y pegajosas, mientras que sus flores son de color amarillo y se hallan cubiertas de pelos como el resto de la planta. Inicialmente crece erecto, aunque las plantas maduras suelen ser rastreras, presentando tallos pilosos y profusamente ramificados. Puede ser muy variable desde el punto de vista morfológico, pero debido a que es una especie estrictamente autógama, los individuos de cada población son muy uniformes entre sí. Gracias a su capacidad para tolerar la salinidad extrema y su morfología inusual, representa una fuente importante de germoplasma para el tomate cultivado *S. lycopersicum* (Nuez *et al.*, 2004). Esto se debe a que *S. cheesmaniae* es fácil de cruzar con el tomate cultivado, produciendo una descendencia fértil,

constituyendo así una fuente de variación para varios rasgos de interés agronómico, como la tolerancia a la salinidad (Nuez, 1995; Rush y Epstein, 1981; Rick, 1979).

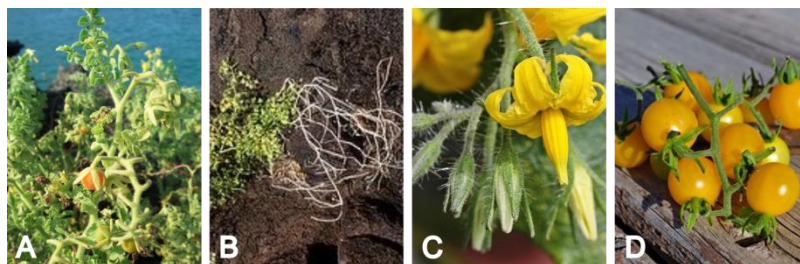


Figure I23. Appearance of *S. cheesmaniae* plant showing its different parts. A) Stems; B) roots; C) inflorescence; D) fruits.

La taxonomía de *S. cheesmaniae*, al igual que la de *S. lycopersicum*, también ha ido sufriendo cambios a través del tiempo (Peralta *et al.*, 2005), aunque actualmente se reconoce la descrita por (L.Riley) Fosberg en el año 1987. Esta especie tiene una especial relevancia en la presente Tesis Doctoral, por ser la donadora de los rasgos de tolerancia a la salinidad, introgresados en el material vegetal utilizado en nuestros ensayos.

I5.3. MEJORA DE LA TOLERANCIA DEL TOMATE A LA SALINIDAD

Debido a que los suelos y las aguas salinas son bastante habituales en todo el mundo, actualmente se está dedicando un gran esfuerzo a la comprensión de los aspectos fisiológicos de la tolerancia a la salinidad de plantas como una base previa al desarrollo de genotipos tolerantes a la salinidad. El desarrollo de cultivos tolerantes al estrés salino es imprescindible para cubrir la creciente demanda de alimentos a través de una agricultura sostenible. Para ello se han venido empleando tanto métodos de mejora clásica como métodos de ingeniería genética (Cuartero, 2006; Flowers, 2004; Ashraf y Akram, 2009).

I5.3.1. La mejora clásica en el cultivo del tomate

Los métodos de mejora clásica se basan en continuos retrocruzamientos de líneas parentales que poseen una característica deseable y la posterior selección del carácter que se quiera transmitir en la progenie (Prohens y Nuez, 2008). A pesar de los considerables avances obtenidos por medio de los métodos de mejora clásica, relacionados fundamentalmente con el aumento del rendimiento y la calidad de los cultivos, durante el siglo XX se ha avanzado relativamente poco en la mejora de la resistencia de los cultivos a los diferentes estreses abióticos, entre ellos el estrés salino (Flowers, 2004; Shabala y Cuin, 2007). Cabe destacar, sin embargo, algunos ejemplos en los que se han obtenido algunos cultivares de alfalfa (Dobrenz *et al.*, 1989; Dobrenz, 1999; Al-Doss *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2001) y trigo (Ashraf y O'leary, 1996; Hollington, 2000).

Los programas de mejora a la tolerancia a la salinidad requieren un amplio conocimiento de los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que conduzca a la identificación de rasgos halofíticos y, eventualmente, su introgresión en variedades de élite (Bolarín *et al.*, 1991; Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999; Cuartero *et al.*, 2006). Sin

embargo, el empleo de especies silvestres resistentes a la salinidad como fuente de genes no ha sido ampliamente aplicado (Flowers, 2004). Esto se debe a que la transferencia de los genes implicados en la tolerancia a la salinidad desde una especie silvestre a una especie doméstica es difícil, requiere de mucho tiempo (10 a 15 años) y de gran cantidad de mano de obra (Prohens y Nuez, 2008). Además, en este tipo de mejora por cruzamientos se pueden transferir a la progenie tanto los caracteres deseados como los no deseados y en muchas ocasiones, la incompatibilidad reproductiva puede limitar la transferencia de alelos favorables desde las fuentes inter-específicas e inter-genéricas (Prohens y Nuez, 2008).

En relación al cultivo del tomate, como ya se ha comentado en apartados anteriores, existen fuentes de variación genotípica en ciertas variedades cultivadas primitivas y, concretamente, en algunas especies silvestres genéticamente próximas con un alto nivel de tolerancia a la sal, que pueden servir como donadores de rasgos de tolerancia (ver Tabla I7) (Prohens y Nuez, 2008; Moyle y Muir, 2010). Algunas de estas especies silvestres, como *S. pimpinellifolium* o *S. cheesmaniae* soportan concentraciones de 150-200 mM NaCl sin una disminución aparente en el crecimiento (Cuartero y Fernandez-Muñoz, 1999). Estas especies de comportamiento halófito se diferencian de sus parientes sensibles en varios determinantes o rasgos de tolerancia, entre los cuales encontramos los mecanismos responsables del transporte de iones y/o de la síntesis de osmolitos y sus correspondientes rutas reguladoras (Cuartero y Fernandez-Muñoz, 1999; Cuartero *et al.*, 2006).

Un importante abordaje funcional consiste en la investigación sobre el gen o grupo de genes implicados en loci de rasgos cuantitativos (QTLs) que determinan rasgos de halotolerancia y, particularmente, sobre la asociación entre estos QTLs y los genes candidatos de funciones conocidas por abordajes anteriores de genética molecular (Asíns, 2002; Yamaguchi y Blumwald, 2005; Salvi y Tuberosa, 2007; Yeo, 2007). Sin embargo, este abordaje presenta una importante limitación, ya que la mayoría de QTLs son dependientes de las condiciones ambientales en las que se han caracterizado (Cuartero *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 2008). De acuerdo con esto, habría que determinar los QTLs que tengan un mayor efecto, independientemente del fondo genético particular y en identificar los genes que lo determinan (Mittler y Blumwald, 2010). De ello, se hablará con más detalle en apartado I6.1.1.

I5.3.2. La ingeniería genética en el cultivo del tomate

La ingeniería genética proporciona una alternativa a la mejora convencional de plantas, no sólo para la reducción de las pérdidas de rendimiento de las cosechas producidas por diferentes estreses abióticos, entre los que se incluye la salinidad, sino también para aumentar la calidad y el rendimiento potencial de muchos cultivos (Mittler y Blumwald, 2010). Esta estrategia constituye una vía relativamente rápida para la mejora de plantas de interés agronómico. Tal y como se comentará en el apartado I6, la aplicación de las herramientas de genómica funcional, como son el mapeo de QTLs, el análisis de

mutantes, la expresión heteróloga, el silenciamiento y la sobreexpresión de genes, son de gran utilidad para descifrar los mecanismos implicados en procesos clave para la producción agrícola en condiciones de salinidad y nos proporcionan un paso previo a la generación de plantas transgénicas con una mayor halotolerancia (McCallum *et al.*, 2000; Roy *et al.*, 2014; Mickelbart *et al.*, 2015).

En muchas especies, el aumento de las concentraciones de diversos compuestos orgánicos compatibles u osmolitos (ver apartado I3.2.1) ha sido una de las aproximaciones más comúnmente empleadas para obtener plantas transgénicas resistentes a la salinidad (Ashraf y Foolad, 2007; Ashraf y Akram, 2009). En este sentido, existen multitud de referencias relativas a la obtención de plantas transgénicas con diferente grado de tolerancia a la salinidad mediante la sobreexpresión de proteínas implicadas en la síntesis de diferentes osmoprotectores, como la prolina, en plantas de arroz, cebada, patata, tabaco y *Arabidopsis* (Sawahel y Hassan, 2002; Su y Wu, 2004; Hmida-Sayari *et al.*, 2005), la glicina-betaína en col, arroz, *Brassica juncea* y *Arabidopsis* (Prasad *et al.*, 2000; Bhattacharya *et al.*, 2004), así como una serie de azúcares (manitol, trehalosa, myo-inositol y sorbitol) (Cortina y Culiáñez-Macià, 2005; Ge *et al.*, 2008). De forma similar, también se ha incrementado la tolerancia a la salinidad mediante sobreexpresión de poliaminas (Waie y Rajam, 2003; Capell *et al.*, 2004; Alcázar *et al.*, 2010), de proteínas LEA (Brini *et al.*, 2007; Lal *et al.*, 2008) y de osmotinas (Goel *et al.*, 2010).

En tomate, la obtención de plantas transgénicas con mayor tolerancia al estrés salino también se ha utilizado para lograr una mejor comprensión de las bases genéticas y fisiológicas de la tolerancia de esta especie a la salinidad (Cuartero *et al.*, 2006). A pesar de la existencia de estudios que muestran como la sobreexpresión de un único gen permite obtener plantas de tomate resistentes a concentraciones relativamente elevadas de sal (Zhang y Blumwald, 2001; Huertas *et al.*, 2012; Muñoz-Mayor *et al.*, 2012; Ijaz *et al.*, 2017), todavía no existen evidencias de ningún cultivar de tomate comercial con tolerancia a la salinidad (*The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications -ISAAA-*, 2016). Sin embargo, sí existen varios cultivares de tomate comerciales con otros rasgos, relacionados fundamentalmente con el retraso de la maduración del fruto (Tabla I8) (*The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications -ISAAA-*, 2016).

Table I8. List of some commercialized genetically modified (GM) tomato cultivars. *, selection Marker/Reporter. Taken from <https://isaaa.org/gmapprovaldatabase/cropslist/default.asp>

NAME	GENE INTRODUCED	GENE SOURCE	PRODUCT	FUNCTION
1345-4	Acc (truncated)	<i>S. lycopersicum</i>	modified transcript of 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase gene	suppresses the normal expression of the native ACC synthase gene, resulting in reduced ethylene production and delayed fruit ripening
	nptII*	<i>Escherichia coli</i> Tn5 transposon	neomycin phosphotransferase II enzyme	allows transformed plants to metabolize neomycin and kanamycin antibiotics during selection
35-1-N	Sam-k	<i>Escherichia coli</i> bacteriophage T3	S-adenosylmethionine hydrolase enzyme	causes delayed ripening by reducing the S-adenosylmethionine (SAM), a substrate for ethylene production
	nptII*	<i>Escherichia coli</i> Tn5 transposon	neomycin phosphotransferase II enzyme	allows transformed plants to metabolize neomycin and kanamycin antibiotics during selection
5345	cry1Ac	<i>Bacillus thuringiensis</i> bsp. Kurstaki strain HD73	Cry1Ac delta-endotoxin	confers resistance to lepidopteran insects by selectively damaging their midgut lining
	nptII*	<i>Escherichia coli</i> Tn5 transposon	neomycin phosphotransferase II enzyme	allows transformed plants to metabolize neomycin and kanamycin antibiotics during selection
8338	accd	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid deaminase enzyme	metabolizes the precursor of the fruit ripening hormone ethylene, resulting in delayed fruit ripening
	nptII*	<i>Escherichia coli</i> Tn5 transposon	neomycin phosphotransferase II enzyme	allows transformed plants to metabolize neomycin and kanamycin antibiotics during selection
F(1401F, h38F, 11013F, 7913F)	pg (sense or antisense)	<i>S. lycopersicum</i>	no functional polygalacturonase enzyme is produced (transcription of the endogenous enzyme is suppressed by a gene silencing mechanism)	inhibits the production of polygalacturonase enzyme responsible for the breakdown of pectin molecules in the cell wall, and thus causes delayed softening of the fruit
	nptII*	<i>Escherichia coli</i> Tn5 transposon	neomycin phosphotransferase II enzyme	allows transformed plants to metabolize neomycin and kanamycin antibiotics during selection
PK-TM8805R (8805R)	cmv_cp	Cucumber Mosaic Cucumovirus (CMV)	coat protein of cucumber mosaic cucumovirus (CMV)	confers resistance to cucumber mosaic cucumovirus (CMV) through "pathogen-derived resistance" mechanism

16. AVANCES EN LA GENÉTICA MOLECULAR DEL ESTRÉS SALINO

Para entender mejor las bases genéticas, fisiológicas y bioquímicas de la tolerancia a la salinidad, en el próximo apartado se detallarán algunos abordajes tecnológicos de genética y genómica funcional de plantas, entre los que destacaremos el análisis de los loci de caracteres cuantitativos (QTLs, *Quantitative Trait Loci*), la búsqueda de mutantes, el silenciamiento génico estable y la transformación genética, no sólo por haber sido utilizadas durante el periodo de investigación de esta Tesis Doctoral, sino también por ser herramientas clave en la mejora genética de las plantas frente a dicho estrés.

Es bien conocido que la tolerancia a la salinidad es un rasgo multigénico, habiéndose identificado *loci* de caracteres cuantitativos (QTLs, del acrónimo *Quantitative Trait Loci*) asociados con la tolerancia y con el transporte de iones en condiciones salinas en especies como la cebada, los cítricos, el arroz y el tomate (Flowers, 2004). Las investigaciones realizadas en este campo sugieren que este rasgo, a su vez, está determinado por una serie de sub-rasgos, cada uno de los cuales puede ser determinado por uno o varios genes. Estos sub-rasgos generalmente incluyen la capacidad de minimizar los efectos osmóticos y e iónicos de las sales mediante la compartimentación de éstas en vacuolas o mediante la recirculación de los iones a través de los órganos de las plantas, ajustando los balances iónicos y osmóticos (Roy *et al.*, 2014; Mickelbart *et al.*, 2015).

16.1. TÉCNICAS GENÉTICAS ENFOCADAS A LA MEJORA DE LA TOLERANCIA AL ESTRÉS SALINO

La obtención de variedades tolerantes a la salinidad en términos de producción, derivada de la aplicación de técnicas de mejora clásica de introgresión de caracteres de especies silvestres en variedades cultivadas, ha tenido un éxito muy limitado o casi nulo, debido al escaso conocimiento de las claves biológicas (QTLs definidos) que caracterizan a los distintos genotipos que puedan utilizarse como rasgos de halotolerancia (Roy *et al.*, 2014; Mickelbart *et al.*, 2015). A ello se une la dificultad de combinar en el proceso de selección de este rasgo tan complejo, probablemente con un gran número de genes implicados, el rasgo del rendimiento y calidad de la cosecha (Flowers, 2004; Cuartero *et al.*, 2006).

La ingeniería genética constituye un método relativamente rápido para la mejora de plantas de interés agronómico (Cuartero *et al.*, 2006). Aunque numerosos estudios han mostrado que la sobreexpresión de un único gen permite obtener plantas resistentes (incluyendo tomate) a concentraciones relativamente elevadas de sal, han surgido serias dudas sobre la efectividad de esta estrategia en la obtención de cultivos tolerantes a la salinidad en condiciones reales de producción, debido precisamente al carácter multigénico de la tolerancia. Además, la introducción de genes claves en la halotolerancia también puede afectar a otros parámetros importantes de la producción (Flowers, 2004; Cuartero *et al.*, 2006; Foolad, 2007; Yeo, 2007). No obstante, la aplicación de las herramientas de genómica funcional, como el análisis de mutantes de ganancia o pérdida

de función, la sobreexpresión homóloga y heteróloga, el silenciamiento génico por RNA de interferencia (*RNAi*), así como las recientes técnicas de edición genómica, esenciales en la identificación y análisis funcional de genes *in planta*, son de gran utilidad para descifrar los mecanismos implicados en procesos claves para la producción agrícola en condiciones de salinidad, paso previo para la mejora de la halotolerancia (Schroeder *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2014; Mickelbart *et al.*, 2015).

I6.1.1. Mapeo de loci de rasgos cuantitativos (*QTL mapping*)

Un QTL es una sección de DNA (locus) cuya variación alélica se correlaciona con la variación de un rasgo cuantitativo, es decir, con aquellos caracteres o rasgos cuantificables que varían de forma continua (Rocha *et al.*, 2007). El uso de mapas genéticos de marcadores moleculares para el estudio de la herencia de los rasgos cuantitativos permite la identificación de cromosomas o grupos de ligamiento más relevantes en la expresión del rasgo cuantitativo (Foolad, 2004). El mapeo de rasgos cuantitativos (*QTL mapping*) a partir de la identificación de loci de rasgos cuantitativos se considera una herramienta fundamental dentro de la mejora genética de plantas (Asíns, 2002; Foolad, 2004). Para la identificación de los QTLs de una planta se utiliza el principio de asociación entre marcadores moleculares polimórficos y el fenotipo de los individuos de una población de mejoramiento. Actualmente, todos los métodos de mapeo de QTLs usados se basan en la utilización del principio de mapeo por intervalos. Uno de los métodos más utilizados para identificar QTLs es el método Marcador-QTL-Marcador (MQM, *Marker-QTL-Marker*) (Lander y Botstein, 1989; Jansen, 2001). El método MQM considera dos marcadores moleculares adyacentes a un QTL, utilizando el método de máxima verosimilitud (LOD, *Logarithm Of Odds*) (Cerón-Rojas y Sahagún-Castellanos, 2007).

Un importante abordaje que puede facilitar la mejora de la tolerancia a la salinidad en plantas es la investigación sobre el gen o grupo de genes implicados en la funcionalidad de QTLs que determinan rasgos de halotolerancia y concretamente, sobre la asociación entre genes candidatos de funciones conocidas por abordajes anteriores de genética molecular con dichos QTLs (Asíns, 2002; Yamaguchi y Blumwald, 2005; Salvi y Tuberosa, 2007; Yeo, 2007). A este respecto, el análisis de genes candidatos intenta eludir procedimientos de clonaje posicional u otras estrategias de mapeo por secuenciación, que pueden ser más engorrosas (Ren *et al.*, 2005; Schneeberger *et al.*, 2009). Aunque el tamaño del intervalo de confianza QTL podría ser una limitación debido al gran número de genes candidatos en un mínimo de 10 cM (aprox, 2 a 6 Mb), la posición de la máxima significación del LOD para la detección del QTL podría ser un indicador preciso de la posición del gen responsable (Price, 2006). Además, la disponibilidad de la secuencia completa del genoma es una herramienta útil para filtrar a través de los genes en un intervalo, ya que el examen de la anotación en dicha zona, a menudo puede indicar qué genes en el intervalo del QTL podrían ser candidatos probables (Hansen *et al.*, 2008).

Precisamente, un aspecto esencial de la presente Tesis Doctoral ha sido el mapeo de los genes *HKT1* de tomate (*HKT1;1* y *HKT1;2*), previamente aislados en nuestro

laboratorio y el estudio de estos genes como candidatos posicionales de un QTL de efecto mayoritario que determina las concentraciones de Na⁺ y K⁺ en hojas y tallos. El mapeo fue realizado por el grupo de Genética de la Dra. MJ Asíns (IVIA, Valencia), utilizando para ello dos poblaciones de RILs (Apartados M1.3.1 y R2.1) (Asins *et al.*, 2013), evaluadas previamente para estos mismos rasgos por Villalta *et al.* (2008).

I6.1.2. Análisis de mutantes

La mutagénesis insercional, ya sea mediante transposones o mediante T-DNA, juega un importante papel en la genómica funcional de plantas. Es decir, la disponibilidad de líneas mutantes en las cuales, la función de un gen específico conocido ha sido interrumpida, nos proporciona una poderosa herramienta para comprender la función de ese gen (O'Malley y Ecker, 2010). En estas líneas mutantes, las inserciones pueden ser fácilmente detectadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). Además, los recientes avances en la eficiencia de la transformación de *Arabidopsis thaliana* mediante *Agrobacterium tumefaciens* han permitido la producción de miles de líneas mutantes (Tissier *et al.*, 1999; Feldmann, 1991), que se han reunido a su vez en distintas colecciones, entre las cuales, GABI-Kat es una de las más importantes, siendo públicamente accesible desde 2002 (Li *et al.*, 2003). Sin embargo, la mayoría de estas líneas son hemizigotas para la inserción, siendo necesario un paso previo de búsqueda de aquellas líneas homocigotas para la inserción, el cual se lleva a cabo mediante un proceso de genotipado (O'Malley y Ecker, 2010).

Estas colecciones de líneas mutantes son especialmente útiles en la identificación, localización y clonaje de genes esenciales para la tolerancia a la salinidad, así como su análisis funcional mediante pérdida de función (Zhu, 2000). Por ello, en esta Tesis Doctoral se han utilizado dos líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* pertenecientes a la colección GABI-Kat (Kleinboelting *et al.*, 2012a), concretamente GK-386D05 y GK-795G10, para la realización de estudios funcionales comparativos entre los genes *HKT1* de tomate y su homólogo en *Arabidopsis*, el gen *AtHKT1;1*, en relación con el transporte de Na⁺ a larga distancia y la tolerancia a la salinidad.

I6.1.3. Expresión heteróloga en levaduras

Las levaduras forman una importante clase de microorganismos muy utilizados a nivel industrial y de gran importancia para la industria alimentaria, siendo fundamental su utilización en la fabricación de alimentos como pan, cerveza y vino (Imai y Ohno, 1995). Además, la levadura *Sacharomyces cerevisiae* constituye uno de los sistemas más adecuados para la expresión heteróloga de genes eucariotas, siendo ampliamente reconocida como sistema modelo de la célula eucariota. Esto se debe a que presenta una complejidad ligeramente superior a la de las bacterias, compartiendo con ellas una serie de características que la hacen idónea para su uso en la investigación: rápido crecimiento, fácil manejo en laboratorio, fácil replicación de los cultivos y un sistema de transformación de DNA sencillo y versátil (Sherman, 2002). *S. cerevisiae* fue el primer organismo eucariota cuyo genoma fue secuenciado completamente, motivo por el cual

existen hoy día multitud de herramientas moleculares disponibles para su estudio (Goffeau, 2000). A estas propiedades se les puede sumar el hecho de que la mayoría de las levaduras se consideran no patógenas, lo cual permite su manipulación sin necesidad de tomar excesivas precauciones (Gietz y Woods, 2002). Las levaduras presentan varias ventajas con respecto a las bacterias: la primera de ellas es que la maquinaria molecular de muchos procesos celulares se encuentra muy conservada tanto en levaduras como en plantas y en mamíferos (Gietz y Woods, 2002). Otra de las ventajas es que, al igual que ocurría en el caso de *Arabidopsis*, existen mutantes de levaduras desprovistos de sistemas de transporte propios, lo que convierte a este organismo en una herramienta ideal para el estudio molecular de transportadores de membrana de eucariotas superiores (Maresova y Sychrova, 2005), y especialmente, para la caracterización de proteínas de transporte implicadas en la homeostasis de Na⁺ y K⁺ (Garcíadeblás *et al.*, 2003; Haro *et al.*, 2005; Benito *et al.*, 2011). Esto se debe a que la mayoría de las proteínas de membrana de plantas son tóxicas en bacterias, motivo por el cual las levaduras constituyen el modelo principal de elección para el estudio de dichas proteínas (Haferkamp y Linka, 2012).

Por todas estas razones, *S. cerevisiae* se ha convertido en una importante herramienta a gran escala de análisis de genómica funcional, proporcionando un punto de partida para el análisis genómico de organismos eucariotas más complejos, ya que se puede utilizar en estudios de funcionalidad génica que resultarían muy complicados o costosos en organismos multicelulares (Kumar y Snyder, 2001). En la presente Tesis Doctoral se ha utilizado la cepa WΔ6 de *S. cerevisiae* para llevar a cabo estudios de complementación funcional y ensayos de transporte de las proteínas codificadas por los genes *HKT1* de tomate (Garcíadeblás *et al.* 2003, Haro *et al.* 2005, Rodríguez-Navarro, *et al.* 2012). Esta cepa carece de los sistemas de transporte endógeno de K⁺, *TRK1* y *TRK2* y, por tanto, es incapaz de crecer a concentraciones micromolares de dicho catión. En la Fig. I24 se representan los principales transportadores de cationes alcalinos de *S. cerevisiae* y su localización dentro de la célula.

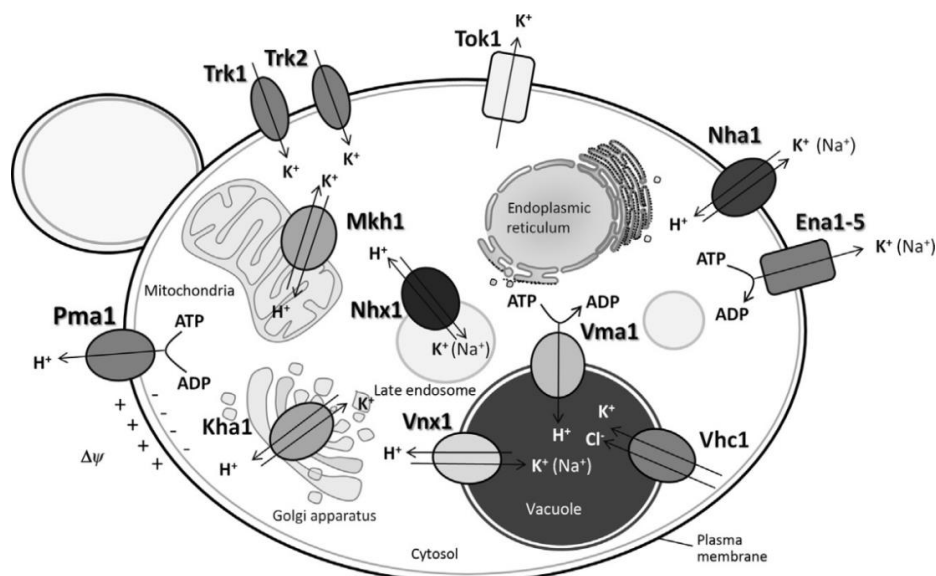


Figure I24. Plasma membrane and organellar *S. cerevisiae* transporters contributing to the potassium and pH homeostasis. Pma1 and Vma1, proton ATPases; Trk1 and Trk2, potassium uniporters; Nha1, Nhx1, Vnx1 and Kha1, cation/proton antiporters; Vhc1, cation-chloride cotransporter; Ena1-5, cation efflux ATPases; Tok1, potassium channel; and Mkh1, mitochondrial system exchanging potassium for protons. Extracted from Ariño *et al.* (2014).

I6.1.4. Silenciamiento génico postranscripcional

El silenciamiento génico mediado por RNA es un proceso de degradación de una secuencia específica de mRNA muy conservado en casi todos los organismos y que se conoce como silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS, *Postranscriptional Gene Silencing*), RNA de interferencia (RNAi) o *quelling*, en plantas, animales y hongos respectivamente. Este proceso, que puede ocurrir de forma natural en plantas, ha sido reconocido como una importante herramienta en los estudios de genética reversa (Baulcombe, 2002; Waterhouse y Helliwell, 2003). A través de este mecanismo, la maquinaria celular impide la expresión de un gen que debería estar expresándose en circunstancias normales (Fagard y Vaucheret, 2000). La expresión génica se puede regular tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional (Vaucheret y Fagard, 2001). El silenciamiento génico transcripcional (*Transcriptional Gene Silencing* o TGS) es el resultado de la modificación de las histonas. Esta modificación crea un ambiente de heterocromatina alrededor de un determinado gen que impide el acceso de la maquinaria transcripcional (factores de transcripción, RNA polimerasas, etc.). En cambio, el silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) engloba una serie de eventos dirigidos a la degradación del mRNA con especificidad de secuencia y por tanto, a la disminución de la expresión del gen correspondiente (Vaucheret y Fagard, 2001). En un principio, TGS y PTGS se consideran dos rutas separadas e independientes, pero más recientemente se ha demostrado que constituyen dos vías alternativas, aunque no excluyentes (Fagard y Vaucheret, 2000; Vaucheret y Fagard, 2001). Ambos tipos de silenciamiento génico pueden iniciarse por la misma ruta de degradación de RNA de doble cadena, aunque con cierta especificidad (Fagard y Vaucheret, 2000; Vaucheret y Fagard, 2001). Es decir, el TGS se inicia a partir de RNA de doble cadena que contiene copias de secuencias promotoras,

mientras que el PTGS lo hace a partir de RNA de doble cadena que incluye ORFs (Fagard y Vaucheret, 2000; Vaucheret y Fagard, 2001).

Mediante el uso de análisis bioquímicos y genéticos se ha establecido un modelo simplificado que describe cómo se produce el PTGS. En dicho modelo, el proceso de silenciamiento puede dividirse en dos etapas: una de iniciación y otra efectora o de mantenimiento (Hamilton y Baulcombe, 1999; Hannon, 2002; Hutvagner y Zamore, 2002; Koch y Kogel, 2014):

La etapa de iniciación (Fig. I25A) comienza con la presencia de un RNA de doble cadena (*double-stranded RNA* o *dsRNA*), que puede ser un intermediario de replicación de un virus, puede haber sido introducido artificialmente o puede proceder de un transgen. A continuación, se produce la propagación del silenciamiento a nivel molecular, desde la secuencia diana inicial a otras adyacentes (silenciamiento transitivo) y a nivel de la planta completa, desde el punto donde se originó hacia otros tejidos (silenciamiento sistémico). El *dsRNA* es reconocido y digerido por la enzima *Dicer*, que posee dominios de RNasa tipo III (enzima que degrada las moléculas de RNA), para formar moléculas de RNA pequeñas (*siRNAs*, del inglés *small interference RNAs*) de 21 a 26 nucleótidos de longitud (Hamilton y Baulcombe, 1999; Fire *et al.*, 1998; Voinnet, 2002).

Por otro lado, en la etapa efectora (Fig. I25B), las moléculas de *siRNA* se asocian de manera específica a un complejo multienzimático, conocido como *RISC* (*RNA-Induced Silencing Complex*). La actividad helicasa del complejo *RISC* separa las dos hebras del *siRNA* y sólo una de ellas permanece unida al complejo (Waterhouse y Helliwell, 2003). Una vez que *RISC* está activado, tiene como blanco la degradación de los mRNAs homólogos a dichos *siRNAs* (Waterhouse y Helliwell, 2003). En plantas existe además una etapa de amplificación, que ocurre mediante la producción de copias del *dsRNA* que originó el silenciamiento, generando más moléculas de *siRNAs* o directamente mediante la replicación de los *siRNAs* (Wesley *et al.*, 2001). En estos procesos interviene una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP), capaz de sintetizar moléculas de RNA empleando RNA como molde (Wesley *et al.*, 2001). El silenciamiento desencadenado en un punto particular de la planta genera una señal móvil formada por *siRNAs* que es capaz de inducir el silenciamiento en tejidos alejados del punto de inicio (Wesley *et al.*, 2001). Existen evidencias de que este mecanismo juega un papel esencial en la defensa de la planta frente al movimiento de elementos genéticos, tales como virus y transposones (Wesley *et al.*, 2001; Vance y Vaucheret, 2001; Baulcombe, 2002).

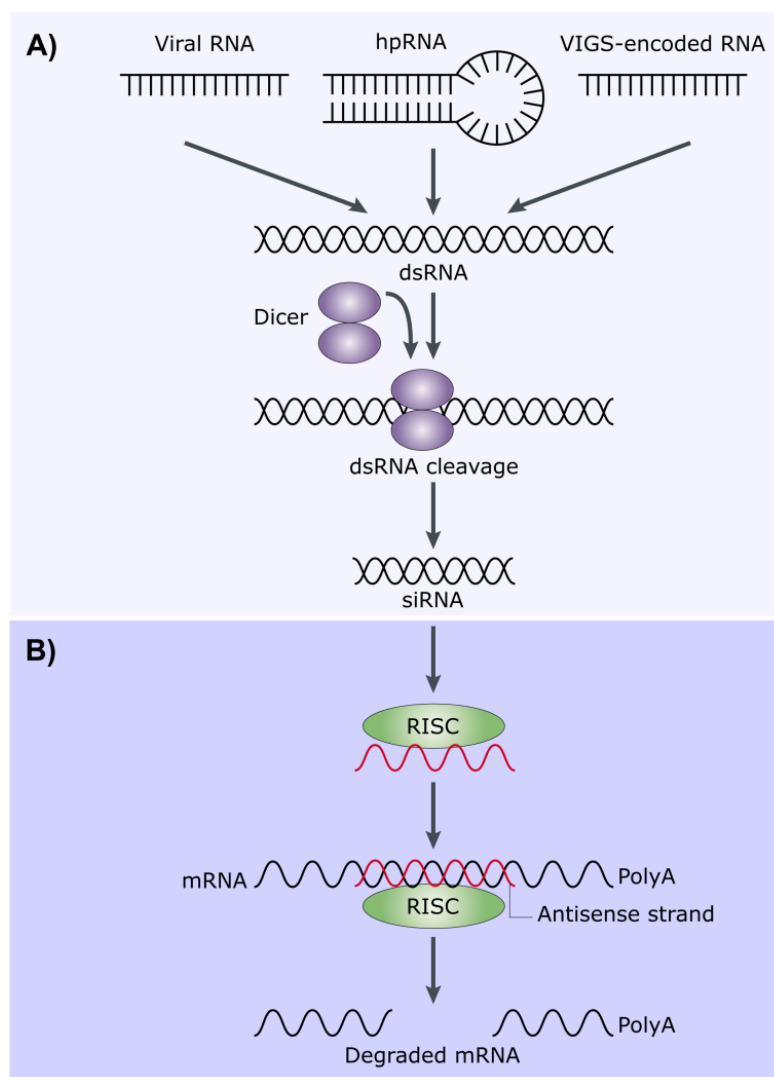


Figure I25. Current model of RNA-mediated gene silencing in plants. This model is based on the results of *in vitro* studies of RNA-induced gene silencing, or RNA interference (*RNAi*), in animal extracts (McManus y Sharp, 2002). *RNAi* is believed to operate in a similar manner in plants because small interfering RNAs (siRNAs) are found in silenced plants, and plants have homologues of the animal gene *Dicer*. **A)** Double-stranded RNA (dsRNA) from replicating viral RNA, viral-vector-derived (VIGS, or virus-induced gene silencing) RNA or hairpin RNA (hpRNA) transcribed from a transgene, is processed by a Dicer-containing complex to generate siRNAs. **B)** An endonuclease-containing complex (called the *RNAi* silencing complex, RISC), is guided by the antisense strand of the siRNA to cleave specific mRNAs, so promoting their degradation. Modified from Waterhouse & Helliwell (2003).

Por todo esto, el silenciamiento mediado por RNA de interferencia se considera una importante herramienta en genética reversa y sus aplicaciones han sido modificadas y mejoradas con el objetivo de facilitar la investigación de distintos procesos de la Biología Vegetal (Baulcombe, 2002; Waterhouse y Helliwell, 2003). La identificación de la ruta general para la inducción del silenciamiento génico en plantas condujo al desarrollo de varios métodos para llevar a cabo este silenciamiento mediado por RNA en plantas. En un principio se usaron construcciones antisentido que generaban *RNAi* y producían cosupresión génica, lo cual resultaba en una escasa proporción de individuos silenciados, que no superaba el 30% (Wesley *et al.*, 2001). Mas recientemente se ha demostrado el

potencial de las construcciones hpRNA (*hairpinRNA*) compuestas por un promotor y un terminador, entre los cuales se inserta una secuencia del gen diana y esta misma secuencia inversamente repetida, de forma que el RNA transcrito hibrida consigo mismo, formando una estructura en horquilla (Watson *et al.*, 2005). Se ha comprobado que usando este tipo de construcciones con brazos sentido y antisentido comprendidos entre 98 y 853 nucleótidos es posible silenciar genes en un gran número de especies vegetales. Además, la introducción de un intrón (*ihpRNA*) provoca un aumento en el efecto del silenciamiento hasta obtenerse casi el 100% de los transformantes (Smith *et al.*, 2000; Stoutjesdijk *et al.*, 2002). Esta construcción da lugar, tras la transcripción, a una estructura compuesta por un “bucle” de RNA de cadena simple y un “tallo” formado por RNA de doble cadena que contiene las repeticiones de los brazos sentido y antisentido (Figs. I25 y M7). Mediante el uso de este tipo de construcciones ihpRNA se obtienen una serie de transformantes, de los cuales, algunos presentan una completa supresión (*Knock-out*) del gen diana endógeno, y otros presentan niveles de actividad muy reducidos, pero detectables. Esta variación en el grado de silenciamiento constituye una herramienta muy útil para los estudios de funcionalidad génica, ya que la reducción de la expresión de un gen causada por este tipo de construcciones puede producir plantas viables con fenotipos indicativos del papel de dicho gen (Wesley *et al.*, 2001).

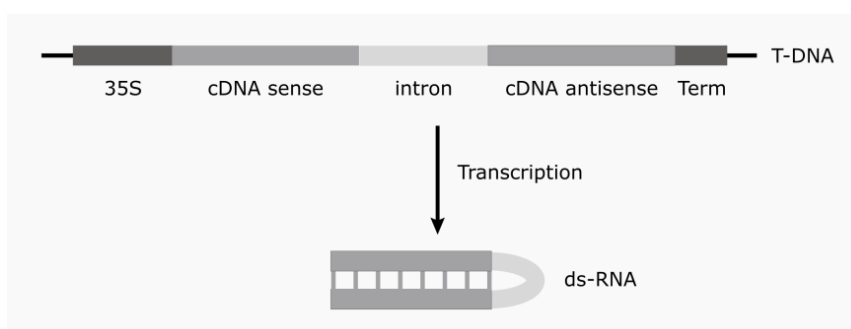


Figure I26. A typical T-DNA plasmid for the expression of intron hairpin RNAs (ihpRNAs). 35S, CaMV 35S promoter; Term, transcription termination sequence. Modified from Smith *et al.* (2000).

En el presente trabajo, el uso de los vectores plasmídicos pKANNIBAL/pART27 ha permitido la generación de construcciones de tipo *ihpRNA* para cada una de las variantes alélicas de *HKT1;1* y *HKT1;2* de *S.lycopersicum* y *S. cheesmaniae*, de forma similar a como se llevó a cabo para silenciar *SISOS1* en nuestro laboratorio (Olías *et al.*, 2009a). Con estas construcciones se han generado plantas transgénicas con reducción de función por silenciamiento génico postranscripcional (PTGS), utilizando la técnica descrita por Wesley *et al.* (2001).

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente mencionado, el silenciamiento génico de un gen diana puede llevarse a cabo de forma estable mediante la transformación genética de la planta mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, a través de una construcción del DNA que codifica alguno de los RNA mencionados en el apartado anterior. De esta forma, introduciéndose en el T-DNA de *Agrobacterium*, puede producir un silenciamiento estable tras la transformación de la planta, ya en las líneas transformantes primarias, dado su

carácter dominante. Además, este carácter se heredará en las sucesivas generaciones. En el presente trabajo se han utilizado las construcciones *ihpRNA* anteriormente descritas para silenciar las dos isoformas de *HKT1* en las dos líneas casi isogénicas, NIL14 y NIL17, previamente mencionadas en esta memoria (ver Apartado M3.1.1). Teóricamente, si el silenciamiento del locus *HKT1* provocase una disminución en los niveles de tolerancia a la salinidad en ambas NILs, esto indicaría que este específico locus tiene un papel importante en el mecanismo de tolerancia a la salinidad del tomate. Así, se generaron las 6 líneas transgénicas procedentes de dichas NILs, en las cuales un determinado alelo (procedente de *S. lycopersicum* o *S. cheesmaniae*) del locus *HKT1;1* o *HKT1;2* había sido silenciado mediante silenciamiento génico estable (Wesley *et al.*, 2001).

III. OBJETIVOS

El objetivo fundamental del grupo de investigación **Homeostasis Iónica y Transportadores de Membrana de la EEZ**, en el cual se ha llevado a cabo la presente Tesis Doctoral, es el estudio de aquellos genes que codifican a diferentes transportadores de Na⁺, K⁺ y H⁺ de plantas, implicados en la homeostasis de Na⁺ y K⁺, que pueden ser claves en el mecanismo de tolerancia de las plantas a la salinidad. Concretamente, en esta Tesis se han estudiado los transportadores de tipo HKT en tomate (una especie de gran interés agronómico), ya que se ha visto que en otras plantas como *Arabidopsis* y cereales parecen jugar un importante papel en el control de la carga xilemática de Na⁺ y el transporte de este catión a larga distancia (Ren *et al.*, 2005; James *et al.*, 2006; Byrt *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2011; Munns *et al.*, 2012).

Es importante destacar el establecimiento de una colaboración científica entre el mencionado grupo y el **Grupo de Genética de la Dra. MJ Asíns (IVIA, Valencia)**, que ha sido esencial para la **validación de los genes de tomate *SlHKT1;1* y *SlHKT1;2***, aislados y caracterizados funcionalmente en el presente trabajo, como **genes candidatos en el análisis de QTLs de tolerancia a la salinidad** en dos poblaciones de líneas recombinantes (RILs, del inglés *Recombinant Inbred Lines*), derivadas de las especies halotolerantes *S. pimpinellifolium* y *S. cheesmaniae*. Así, el grupo del IVIA había encontrado una agrupación de QTLs localizados en el cromosoma 7, concretamente el QTL mayoritario *lkc7.1*, que bajo condiciones salinas determina una mayor acumulación de Na⁺ y una menor de K⁺ en hojas en líneas RILs de la especie cultivada *S. lycopersicum* cv. Cerasiforme que portan una introgresión cromosómica de *cheesmaniae* en dicha región (Villalta *et al.*, 2008). Esta información genética previa, junto a la información molecular sobre las dos isoformas de la familia HKT de tomate (*SlHKT1;1* y *SlHKT1;2*), aportada al inicio de este trabajo, mostró que en aquella región genómica, estrechamente asociada a dicho QTL, subyacen, solos o con otros genes, ambas isoformas de HKT. Según esta información y la descrita previamente sobre este tipo de transportadores en otras especies, como *Arabidopsis* y cereales, las variantes alélicas de *HKT1;1* y/o *HKT1;2* parecen constituir los candidatos más probables a soportar la función del mencionado QTL de tolerancia a la salinidad, siendo ésta la hipótesis de partida de la presente Tesis Doctoral.

Por tanto, el objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio del papel de los genes de tipo *HKT1* y sus variantes alélicas (alelos *lycopersicum* y *cheesmaniae*) en el transporte de Na⁺ a larga distancia y su implicación en el mencionado QTL mayoritario relacionado con la tolerancia del tomate a la salinidad. Para ello se ha realizado un abordaje funcional *in planta*, mediante el análisis de fenotipos de pérdida de función (silenciamiento estable por *RNAi*), disponiéndose de material vegetal generado por el grupo de Genética del IVIA. Asimismo, estudios funcionales previos realizados en tomate han indicado que *SISOS1* juega un papel relevante en la distribución de Na⁺ en los diferentes órganos de la planta e indirectamente en la nutrición del K⁺. Por ello, también se ha investigado la posible coordinación de las funciones de *SOS1* y *HKT1* en la determinación de la cantidad de Na⁺ que llega a los tejidos fotosintéticos. Todo ello podría generar información clave para contribuir a la mejora de la tolerancia del tomate a la

salinidad y, por tanto, al aumento de su producción y la mejora de su calidad. Es decir, factores de halotolerancia presentes en especies silvestres como *S. pimpinellifolium* y *S. cheesmaniae*, podrían ser transferibles, mediante cruzamientos y selección asistida por marcadores moleculares o por ingeniería genética, a las variedades cultivadas de élite (Asíns, 2002; Cuartero *et al.*, 2006; Salvi y Tuberosa, 2007).

Este objetivo general se ha desglosado en los siguientes objetivos específicos, dando lugar al correspondiente plan de trabajo:

1. **Análisis molecular de *SIHKT1;1* y *SIHKT1;2* y expresión funcional en levaduras.** Se ha analizado la actividad, modo de transporte y especificidad de sustrato (K^+ y/o Na^+) de *SIHKT1;1* y *SIHKT1;2* mediante expresión heteróloga en levaduras.
2. ***HKT1;1/HKT1;2* como genes candidatos responsables del QTL mayoritario, *lkc7.1*, que determina la concentración de Na^+/K^+ en la parte aérea de tomate.** Este objetivo se dividió a su vez en dos subobjetivos:
 - 2.1. **Análisis molecular de *Sc/SIHKT1;1* y *Sc/SIHKT1;2* y expresión funcional en levaduras.** Se han analizado, en las dos variantes alélicas de ambas isoformas, las diferencias en las secuencias genómicas y/o de expresión que pudieran reportar características bioquímicas diferenciales que explicasen su contribución fisiológica al QTL *lkc7.1*. Dichas características, actividad, modo de transporte y especificidad de sustrato (K^+ y/o Na^+), se evaluaron mediante la expresión de cada una de las variantes alélicas en levadura.
 - 2.2. **Análisis funcional de *Sc/SIHKT1;1* y *Sc/SIHKT1;2* “in planta” mediante silenciamiento génico por RNAi.** Se ha estudiado la contribución de ambos isogenes a dicho QTL mediante el silenciamiento estable mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (construcciones *hairpin-RNAi*) de la expresión de cada uno de ellos en dos líneas casi-isogénicas (NILs) de tomate. Estas NILs se diferencian únicamente en que una de ellas porta los alelos de *S. cheesmaniae*, una especie silvestre halotolerante, mientras que la otra, los alelos de la especie cultivada *S. lycopersicum* de ambos isogenes, todos ellos en homocigosis, en la región que subyace al QTL ubicado en el cromosoma 7 de tomate (Villalta *et al.*, 2008).
3. **Coordinación de *SOS1* y *SIHKT1* en el transporte de Na^+ y K^+ a larga distancia.** Se ha estudiado la existencia de una posible coordinación entre dichos transportadores en el control del transporte de Na^+ a larga distancia, e indirectamente del de K^+ , un aspecto que parece clave en la tolerancia del tomate a la salinidad. Para ello, se determinó en qué tejidos se localizaba la expresión de los genes *HKT1* y *SOS1*, mediante la técnica de RT-PCR *in situ* y se analizó el perfil de expresión de los genes *HKT1;1* y *HKT1;2*, en función del estadio de desarrollo de los órganos de la planta, en una línea de tomate silenciada para el gen *SISOS1*, previamente generada en nuestro laboratorio (Olías *et al.*, 2009a, 2009b).

III. OBJECTIVES

The principal objective of the **Ion Homeostasis and Membrane Transporters research group at EEZ**, where this doctoral thesis has been developed, is the study of genes encoding Na⁺, K⁺ and H⁺ transporters in plants involved in Na⁺ and K⁺ homeostasis, which is a key factor in plant salinity tolerance. Specifically, we studied HKT-type transporters in tomato, a species of great agronomic interest, as these transporters appear to play an important role in the regulation of Na⁺ xylem loading and long-distance Na⁺ transport in other plants, such as *Arabidopsis* and cereals (Ren *et al.*, 2005; James *et al.*, 2006; Byrt *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2011; Munns *et al.*, 2012).

The importance of this doctoral thesis needs to be highlighted in the context of the scientific collaboration between our team and the **Genetics Group headed by Dr. MJ Asins (IVIA, Valencia)**. This has been crucial for the **validation of tomato genes, *SIHKT1;1* and *SIHKT1;2***, which were isolated and functionally characterized in this study as **candidate genes in QTL analysis of salinity tolerance** in recombinant inbred line (RIL) populations derived from the halotolerant species *S. pimpinellifolium* and *S. cheesmaniae*. The IVIA group found a cluster of QTLs located in chromosome 7, containing the major *lkc7.1* QTL, which, under saline conditions, increases Na⁺ accumulation and lowers K⁺ accumulation in leaves in recombinant inbred lines (RILs) from the cultivated species *S. lycopersicum* cv. Cerasiform harboring *S. cheesmaniae* introgression in this chromosomal region (Villalta *et al.*, 2008). With this genetic information and molecular data pertaining to tomato HKT isoforms *SIHKT1;1* and *SIHKT1;2* given at the beginning of this study, we found these HKT isoforms in the genomic region where QTL *lkc7.1* is located. Hence, the initial working hypothesis of this doctoral thesis was based on the possibility of *HKT1;1* and/or *HKT1;2* allelic variants being the most likely candidates to support the function of QTL *lkc7.1*, given the functionality of these transporters described in *Arabidopsis* and cereals (see Introduction).

The overall objective of this doctoral thesis has been **to study the role of HKT1-type genes and their allelic variants (*lycopersicum* and *cheesmaniae*) in long-distance Na⁺ transport and their involvement in QTL *lkc7.1*, which is associated with tomato salt tolerance**. An *in planta* functional analysis was carried out by studying loss-of-function phenotypes using stable gene silencing by *RNAi* with appropriate plant material generated by the IVIA Genetics group. Likewise, previous functional studies in tomato indicate that *SISOS1* plays an important role in Na⁺ distribution in the different plant organs and indirectly in K⁺ nutrition. The possible functional coordination of *SOS1* and *HKT1* in determining the amount of Na⁺ reaching the photosynthetic tissues has also been investigated. This could generate important information to improve tomato salinity tolerance and to increase tomato production and quality. The halotolerance traits present in wild species, such as *S. pimpinellifolium* and *S. cheesmaniae*, could be used to cultivate elite varieties by crossing and selecting species with the aid of molecular markers and genetic engineering (Asins, 2002; Cuartero *et al.*, 2006; Salvi and Tuberosa, 2007).

The overall objective has been divided into the following specific objectives and corresponding working plans:

1. **Molecular analysis of *SIHKT1; 1* and *SIHKT1; 2* and functional expression in yeast.** Characteristics, activity, transport and substrate specificity (K^+ and/or Na^+) of *SIHKT1;1* and *SIHKT1;2* were analyzed by heterologous expression in yeast.
2. ***HKT1;1/HKT1;2* as candidate genes involved in the major *lkc7* QTL which determines Na^+ / K^+ concentrations in the aerial part of tomato.** This objective was divided into two sub-objectives:
 - 2.1. ***Molecular analysis and functional expression of *Sc/SIHKT1;1* and *Sc/SIHKT1;2* in yeast.*** In all allelic variants of both isoforms, we analyzed possible differences in genomic sequences and/or expression which may identify differential biochemical characteristics in order to explain their physiological contribution to *lkc7.1*. These characteristics, such as activity, transport mode and substrate specificity (K^+ and/or Na^+) were evaluated through heterologous expression of each allelic variant in yeast.
 - 2.2. ***In planta functional analysis of *Sc/SIHKT1;1* and *Sc/SIHKT1;2* using gene silencing by RNAi.*** We studied the functional contribution of each allelic variant of both isogenes to *lkc7.1* through *Agrobacterium*-mediated stable silencing (using *hairpin-RNAi* constructs) of each allelic variant in two tomato near-isogenic lines (NILs). One NIL harbors *cheesmaniae* alleles, while the other NIL harbors the *lycopersicum* alleles of *HKT1;1/HKT1;2* genes, all of which are in homozygosis in the region underlying the QTL located on chromosome 7 (Villalta *et al.*, 2008).
3. **Functional coordination of *SOS1* and *SIHKT1* isoforms in long-distance Na^+ / K^+ transport.** We investigated the coordination between these transporters involved in regulating long-distance Na^+ transport and indirectly that of K^+ , which appears to be a key factor in the tomato salinity. To do this, tissue localization of *SOS1* and *HKT1* gene expression was carried out using an *in situ* RT-PCR technique. We also studied *HKT1;1* and *HKT1;2* gene expression profiles according to the plant development stage in a *SISOS1*-silenced tomato line previously generated in our laboratory (Olías *et al.*, 2009a, 2009b).

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV. MATERIAL AND METHODS

M1. MATERIAL BIOLÓGICO

M1.1. BACTERIAS

M1.1.1. Cepas bacterianas utilizadas

Para el clonaje y amplificación rutinaria de plásmidos, en este trabajo se utilizaron las cepas Mach1^{TMT1} y NovaBlue GigasinglesTM de *Escherichia coli* (*E. coli*) (Tabla M1).

Table M1. Characteristics of *E. coli* strains used.

STRAIN	GENOTYPE	SOURCE
Mach1 ^{TMT1} ^R	F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX</i> 74 <i>hsdR</i> (r _K m _K ⁺) Δ <i>recA</i> 1398 <i>endA1 tonA</i>	Invitrogen TM
NovaBlue	<i>endA1 hsdR</i> 17(r _K 12-m _K 12 ⁺) <i>supE</i> 44 <i>thi</i> -1 <i>recA1 gyrA</i> 96 <i>relA1 lac</i> [F' <i>proA</i> ⁺ B ⁺ <i>lacI</i> 9ZΔM15::Tn10 (Tcr)]	Novagen

Para la transformación de tomate se utilizó la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* (Tabla M2).

Table M2. Characteristics of the *A. tumefaciens* strain used.

STRAIN	CHROMOSOMAL BACKGROUND / RESISTANCE	Ti PLASMID / SELECTION	REFERENCE
LBA4404	TiAch5/Resistance to Rifampicin	pAL4404/ Streptomycin Tetracycline	(Hoekema <i>et al.</i> , 1983)

M1.1.2. Cultivo de bacterias

Las bacterias se cultivaron en diferentes medios líquidos y sólidos, obteniéndose estos últimos por adición de 15g/l de agar bacteriológico a los correspondientes medios líquidos (Tabla M3). La esterilización de los medios se llevó a cabo mediante autoclavado (Autoclave Selecta mod. Presoclave 75 l) a 120 °C y 1.8 atmósferas de presión durante 20 minutos.

Para la selección de transformantes, los medios de cultivo se suplementaron con distintos antibióticos: Ampicilina (100 µg/ml), Kanamicina (50 µg/ml), Rifampicina (50 µg/ml), Espectinomicina (50 µg/ml) y Estreptomomicina (50 µg/ml). En todos los casos, los antibióticos se prepararon como soluciones concentradas (10 mg/ml y 5 mg/ml) en agua Milli-Q® a excepción de la Rifampicina, que se disolvió en metanol, a una concentración de 10 mg/ml. Todas las soluciones de antibióticos se esterilizaron por filtración a través de filtros de 0.22 µm (*Pall Corporation*, Ann Arbor, Michigan EE.UU) y se adicionaron a los medios previamente autoclavados. La manipulación de los cultivos bacterianos se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal (ESCO modelo LHC-4B1) para evitar la contaminación de los mismos.

Para cultivar las bacterias en medio líquido, se inoculó una colonia procedente de un cultivo sólido previo en 3 ml de medio o se inoculó una dilución 1/250 de un cultivo líquido madre saturado. El cultivo de *E.coli* se incubó durante 16 horas a 37 °C en rotación suave (cepa NovaBlue) o durante 8-12 horas (cepa Mach1™-T1^R) y el de *A. tumefaciens* a 28 °C durante 48 horas.

Table M3. Culture media used for growing bacteria.

MEDIUM	COMPOSITION	PURPOSE
LB	Tryptone 1% (w/v) NaCl 1% (w/v) Yeast extract 0.5% (w/v) pH 7.0 using NaOH	Culture of <i>E. coli</i> and <i>A. tumefaciens</i>
SOB	Tryptone 1% (w/v) Yeast extract 0.5% (w/v) NaCl 10 mM KCl 25 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 10 mM pH 7.0 using NaOH	Culture of <i>E. coli</i> for the procurement of competent cells
SOC	Tryptone 2% (w/v) Yeast extract 0.5% (w/v) NaCl 10 mM KCl 2.5 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose 2% (w/v)	Culture of <i>E. coli</i> after a transformation procedure
TYNG	Tryptone 1% (w/v) Yeast extract 0.5% (w/v) NaCl 170 mM MgSO ₄ 7 H ₂ O 0.8 mM pH 7.5 using NaOH	Culture of <i>A. tumefaciens</i>

M1.1.3. Obtención de células competentes de *E.coli*

Las células competentes de *E.coli* fueron suministradas directamente por Novagen o Invitrogen (Tabla M1) en alícuotas de 50 µl congeladas a -80°C, o bien se prepararon para transformación en el laboratorio, según el método descrito por Inoue *et al.* (1990). Para ello se inocularon 125µl de un cultivo saturado de *E. coli* en 250 ml de medio SOB (Tabla M3), incubándose a 18-25 °C en un agitador de rueda a 250 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica (OD, *Optical Density*) de 0.6 medida a 600 nm. El cultivo se enfrió en hielo y se centrifugó a 2500 g durante 10 minutos a 4 °C. Al sedimento se le añadieron 80 ml de tampón de transformación frío, compuesto por 100 mM PIPES (ácido piperazina-N, N'-bis (2-etanosulfónico), 250 mM KCl, 15 mM CaCl₂, 55 mM MnCl₂, ajustando el pH a 6.7 con KOH y se incubó en hielo durante 10 minutos. Después de otra centrifugación a 2500 g durante 10 minutos, al sedimento resultante se le añadieron 20 ml de tampón de transformación frío y DMSO (Dimetil sulfóxido) hasta alcanzar una concentración final del 7%. Se prepararon alícuotas de 200 µl en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml, que a continuación se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

M1.1.4. Transformación de *E.coli*

Se partió de alícuotas de 50 µl (compradas) o 200 µl (preparadas) de células competentes previamente almacenadas a -80 °C, que se descongelaron en hielo durante 5 minutos, a las cuales se les añadió entre 1 y 5 µl de plásmido (de 10 pg a 100 ng) o bien de producto de ligación. Las células se incubaron en hielo durante 30 minutos y luego se sometieron a un choque térmico de 42 °C durante 30 segundos. Seguidamente, se enfriaron en hielo durante 2 minutos y se les añadió 1 ml de medio SOC (Tabla M3), incubándose el conjunto a 37 °C en agitación durante una hora para expresar el correspondiente gen de resistencia a antibiótico. Transcurrido este tiempo, se tomaron alícuotas de 25-100 µl y se sembraron en placas de Petri con medio LB sólido suplementado con los antibióticos de selección adecuados para la selección de las células que contenían el plásmido. Las placas se incubaron a 37 °C durante 8-16 horas, dependiendo del antibiótico utilizado. Los transformantes se confirmaron mediante digestión enzimática o PCR con los cebadores apropiados (Apartado M2.1.1) de una mini preparación de DNA plasmídico obtenida a partir de las colonias presentes en las placas (Apartado M2.4.1)

M1.1.5. Obtención de células competentes de *A. tumefaciens*.

Se cultivó un inóculo de 50 µl de un cultivo madre saturado de *A. tumefaciens* en 5 ml de TYNG (Tabla M3) suplementado con los antibióticos adecuados, en agitación orbital a 200 rpm y 28 °C durante 2 días. El cultivo se sometió entonces a una fuerte agitación para romper los grumos formados por agregación de células y se tomó una alícuota de 0.5 ml, que se inoculó en 60 ml de TYNG y se cultivó en un agitador orbital a 28 °C y 200 rpm durante 14-17 horas. Transcurrido este tiempo, se esperó a que el cultivo alcanzara una OD de 0.5-0.6 medida a 660 nm y se incubó en hielo durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 3500 g y 4 °C durante 6 minutos para eliminar los restos de antibiótico. El sedimento resultante se resuspendió en 20 ml de una solución fría de CaCl₂ 20 mM, centrifugándose de nuevo a 3500 g durante 6 minutos. El sedimento obtenido se resuspendió en 1 ml de CaCl₂ 20 mM frío y se almacenó a -80° C en alícuotas de 150 µl que contenían glicerol al 15% (v/v) o bien se utilizó inmediatamente para comenzar el proceso de transformación (Apartado M1.1.6).

M1.1.6. Transformación de *A. tumefaciens*.

Se partió de alícuotas de 150 µl de células competentes previamente congeladas a -80 °C a las que se añadió al menos 10 µg de DNA plasmídico. Se agitó el conjunto y se congeló en nitrógeno líquido durante al menos 5 minutos. Después de descongelar a temperatura ambiente, se adicionó 1 ml de LB o TYNG y se transfirió el cultivo a tubos estériles de 15 ml, que se incubaron durante 14-17 horas en agitación orbital a 200 rpm y 28 °C. Tras este tiempo, se sembró el cultivo en medio TYNG suplementado con los antibióticos de selección y se incubó a 28 °C hasta la visualización de colonias (aproximadamente 3-4 días). La presencia del transgen se confirmó por PCR, utilizando

los cebadores adecuados (Apartado M2.1.1) tras la recuperación del plásmido (Apartado M2.4.1).

M1.2. LEVADURAS

M1.2.1. Cepas de levadura utilizadas

Para llevar a cabo estudios de complementación funcional y ensayos de transporte de las proteínas codificadas por los genes *HKT1* se ha usado la cepa de *Sacharomyces cerevisiae* WΔ6 (*Mat a ade2 ura3 trp1 trk1D::LEU2 trk2D::HIS3*), que se obtuvo eliminando las regiones codificantes completas de los genes *TRK1* y *TRK2* de la cepa W303.1A (Haro y Rodríguez-Navarro, 2003). Esta cepa fue amablemente cedida por los Drs. Rosario Haro y Alonso Rodríguez-Navarro (CBGP, UP Madrid). Al carecer de los sistemas endógenos de transporte de K⁺, esta cepa no crece a concentraciones micromolares de dicho catión, ya que no puede incorporarlo a la célula a tan baja concentración. En este trabajo se transformó dicha cepa con los marcos abiertos de lectura u ORFs (*Open Reading Frames*) de las diferentes variantes alélicas de *HKT1* mediante dos procedimientos de clonaje diferentes (Apartados M2.2.4 y M4.2).

M1.2.2. Cultivo de levaduras

Los medios utilizados para el cultivo de las células de levadura (detallados en la Tabla M4) se esterilizaron mediante autoclavado a 1.8 atmósferas de presión y 120 °C durante 20 minutos. Algunos componentes, como las vitaminas, bases nitrogenadas y antibióticos se esterilizaron por filtración a través de filtros de 0.22 µm, antes de ser adicionados a los medios previamente autoclavados. La preparación de medios sólidos se realizó mediante la adición de 20 g/l de agar bacteriológico al medio líquido correspondiente previo al autoclavado.

Se utilizó el medio mínimo SD, suplementado con 50 mM de K⁺, o el medio SC-Ura para cultivar las levaduras transformadas (Tabla M4), mientras que para cultivar levaduras en medios suplementados con cationes alcalinos, se utilizó el medio AP (*Arginine Phosphate*, Tabla M4) (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984). Este medio carece de K⁺ y otros cationes alcalinos. En los ensayos de complementación de tolerancia salina de la levadura, tras añadir al medio con las células 50 mM de KCl, se eliminó el K⁺ de dicho medio (condiciones de ayuno de K⁺) y se suplementó con NaCl o KCl a diferentes concentraciones. Por último, se utilizó el medio rico YPD, al que se añadió KCl después del autoclavado, para llevar a cabo el crecimiento rutinario de los cultivos. Como fuente de carbono se utilizó D-glucosa al 2% (w/v). En todos los casos, la temperatura de crecimiento de las levaduras fue de 28 °C y la manipulación de los cultivos en condiciones estériles se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal (*Microflow* mod. Horizontal 480).

Para cultivar levaduras en medios líquidos, se inoculó una colonia procedente de un cultivo previo en 3 ml de medio o se inoculó en medio fresco una dilución 1/1000 de

un cultivo madre saturado y se incubó a 28 °C durante 16-24 horas (medio rico) o 32-72 horas (medio mínimo) en rotación a 40 rpm.

Table M4. Culture media used for growing yeasts.

MEDIUM	COMPOSITION
AP	H ₃ PO ₄ 8 mM L-Arginine 10 mM CaCl ₂ 0.2 mM MgSO ₄ 2 mM Glucose 2% (w/v) Trace elements ¹ 1 ml Vitamins ² 1 ml pH 6.5 using arginine
SC-Ura	Glucose 2% (w/v) YNB ³ 0.7% (w/v) Drop-out medium ⁴ 0.2 % (w/v) MES 0.4 % (w/v) pH 5.7 using arginine
SD	Glucose 2% (w/v) YNB 0.7% (w/v) MES 0.4 % (w/v) pH 5.7 using arginine
YPD	Peptone 2% (w/v) Glucose 2% (w/v) Yeast extract 1% (w/v)

¹Trace elements

BO₃H₃ 0.8 mM
CuSO₄ 5 H₂O 0.016 mM
KI 0.06 mM
Fe₃ 6 H₂O 0.07 mM
MnSO₄ 0.26 mM
Na₂MoO₄ 0.08 mM
ZnSO₄ 7H₂O

²Vitamins

Biotina 0.80 µM
Niacina 0.32 µM
Piridoxina 0.19 µM
Tiamina 0.12 µM
Ca-pantotenato 0.08 µM

³YNB

Yeast Nitrogen Base (Difco™)

⁴Drop-out medium

Yeast Synthetic Drop-out Medium
Supplement Without Uracil (Sigma-Aldrich®)

M1.2.3. Transformación de levaduras

Las transformaciones de levaduras se llevaron a cabo siguiendo el protocolo de transformación rápida de levaduras descrito por Gietz y Woods (2002). Se inocularon 10-50 µl de un cultivo madre saturado de la cepa de levadura en 5 ml de medio YPD líquido y se incubó a 28 °C en rotación a 40 rpm durante 8-12 horas. El cultivo se centrifugó durante 5 minutos a 3000 g, a una temperatura de 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1 ml de acetato de litio (LiAc) 100 mM. La suspensión resultante se incubó durante 5 minutos a 28 °C, se centrifugó durante 30 segundos a 15000

g y el sedimento celular obtenido se resuspendió en 240 µl de polietilenglicol (PEG3350) al 50% (w/v), 36 µl de LiAc 1M, 50 µl de DNA de cadena simple de esperma de salmón (ssDNA) 2 mg/ml, 5 µl de DNA plasmídico (200-500 ng) y 29 µl de agua Milli-Q® estéril (placa control, conteniendo únicamente el plásmido vacío) o de producto de PCR del ORF de interés en el caso del clonaje *in vivo* (ver Apartado M4.2.1), completando así un volumen final de 360µl (Tabla M5). La suspensión celular se agitó fuertemente en un agitador tipo vórtex durante 1 minuto, incubándose posteriormente a 42 °C durante 60-120 minutos. Tras centrifugar durante 30 segundos a 15000 g, el sedimento celular se resuspendió en 200 µl de agua Milli-Q® estéril y se sembró en una placa de Petri con medio sólido SC-Ura (Tabla M4), incubándose a 28 °C durante 3 o 4 días, hasta que se visualizaron colonias. Las colonias positivas se comprobaron realizando PCR de colonias o bien de minipreparaciones de DNA plasmídico, tanto con los oligos internos del ORF en cuestión como con oligos del vector (Tabla M19). En la placa control se observaron algunas colonias, pero muchas menos que en el resto de placas.

Table M5. Yeast transformation mix.

COMPONENT	VOLUME
Polyethylene glycol (PEG3350) 50% w/v	240 µl
LiAc 1.0 M	36 µl
Single-stranded DNA (ssDNA) 2 mg/ml	50 µl
Plasmid DNA (0.2-0.5 µg) + H ₂ O (or PCR product)	34 µl

M1.3. MATERIAL VEGETAL

M1.3.1. Plantas de tomate utilizadas

Para los estudios de clonaje, transformación genética, fenotipado de tolerancia a estrés salino y localización tisular de la expresión de los genes que codifican a los transportadores de interés, se utilizaron dos líneas casi isogénicas (NILs, *Near-Isogenic Lines*) de tomate, desarrolladas originalmente a partir de una población de RILs (*Recombinant Inbred Lines*) obtenida de una progenie F6, cuyo parental femenino correspondía a *S. lycopersicum* cv. Cerasiforme, y el masculino a *S. cheesmaniae*, (L. Riley) Fosberg, una especie silvestre halotolerante (Villalta *et al.*, 2007, 2008). Las semillas de estas NILs fueron suministradas por la Dra. María José Asíns, del Grupo de Genética Vegetal del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), que además fue la responsable de todo el trabajo de investigación genética realizado en dichas NILs en relación al locus *HKT1*. Puesto que dicha información está íntimamente ligada a la información molecular del locus *HKT1*, objetivo esencial de esta memoria, en la sección correspondiente de Resultados se incluirán algunos aspectos genéticos de dicho locus en relación con estas NILs. A continuación, se describen algunos detalles de su obtención (Asins *et al.*, 2013). Brevemente, se seleccionó una línea recombinante F6 (RIL B157) segregante heterocigota para el locus *HKT1* (RIL B157), que por autofecundación dio lugar a dos NILs de *S. lycopersicum* cv. Cerasiforme, homocigotas para el locus *HKT1*,

denominadas NIL157-14 (NIL14) y NIL157-17 (NIL17). Los genotipos de la pareja de NILs se diferencian únicamente en el origen de las variantes alélicas determinantes del grupo de QTLs localizados en una región del cromosoma 7, relacionados con la concentración de Na⁺ y K⁺ de la parte aérea. De este modo, la línea NIL14 porta un fragmento de cromosoma con las variantes alélicas de *ScHKT1;1* y *ScHKT1;2* de *S. cheesmaniae* introgresadas en homocigosis en la especie cultivada, presentando como característica fisiológica más importante o rasgo genético asociado (QTL, *Quantitative trait locus*), una mayor acumulación de Na⁺ y menor de K⁺ en la parte aérea cuando se cultiva bajo condiciones salinas; mientras que la línea NIL17 porta las variantes alélicas en homocigosis de *SlHKT1;1* y *SlHKT1;2* propias de la especie cultivada *S. lycopersicum*, presentando como rasgo genético una menor acumulación de Na⁺ y mayor de K⁺ en la parte aérea (Asins *et al.*, 2013).

En cuanto a otros genes implicados en la homeostasis de Na⁺, ambas NILs tienen el mismo alelo para *SOS1*, *SOS2*, *NHX2* y *NHX4*. Las NILs son homocigóticas para el alelo de *S. cheesmaniae* en los loci *SOS1* y *NHX4* (*ScSOS1*, *ScNHX4*) y para el alelo de *S. lycopersicum* en el locus *NHX2* (*SlNHX2*) (Jaime-Pérez *et al* 2017)..

Asimismo, estas NILs fueron utilizadas para el silenciamiento génico estable mediante RNA de interferencia (RNAi) (ver Apartado M.5). De esta forma, se generaron varias líneas silenciadas diploides de cada una de las variantes alélicas (*lycopersicum* o *cheesmaniae*) de *HKT1;1* y *HKT1;2*, constituyendo un total de 20 líneas (Tabla M6), a partir de las cuales se seleccionaron las más idóneas (escogiéndose una única línea silenciada de cada tipo), para continuar con los estudios de fenotipado previamente mencionados. Para realizar esta selección, se llevaron a cabo estudios de genotipado y expresión (ver Apartado M5.4). También se generaron los “Testigos Internos” (TI NIL 14 y TI NIL17, denominados posteriormente NIL14C y NIL17C para abreviar), que son plantas que sufrieron el proceso completo de transformación, pero que no portaban la construcción de silenciamiento (líneas azigóticas). Dichas plantas presentaban el fenotipo silvestre y por tanto, fueron utilizadas como plantas control en nuestros ensayos. En la tabla M7 se pueden ver todas las líneas seleccionadas, así como los nombres que recibirán a partir de ahora en esta memoria.

Table M6. Silenced lines initially generated from the NILs. *RNAi*, RNA interference; IC, internal control; *Sc*, *Solanum cheesmaniae*; *Sl*, *Solanum lycopersicum*.

LÍNE	SILENCED GENE	NIL
1.1 (2n) 1.2 (2n) 3.1 (2n) 3.2 (2n) 3.3 (2n)	<i>ScHKT1;1</i>	NIL157-14
13.1 (2n) 14.1 (2n) 30.1 (2n)	<i>SlHKT1;1</i>	NIL157-17
45.1 (2n) 45.2 (2n) 47.1 (2n) 47.3 (2n)	<i>ScHKT1;2</i>	NIL157-14
34.1 (2n) 34.2 (2n) 34.3 (2n) 36.1 (2n) 36.2 (2n) 37.1 (2n)	<i>SlHKT1;2</i>	NIL157-17
TI NIL 14 (2n)	None	NIL157-14
TI NIL 17 (2n)	None	NIL157-17

Table M7. Silenced lines selected by genotyping and expression analysis. *RNAi*, RNA interference; IC, internal control; *Sc*, *Solanum cheesmaniae*; *Sl*, *Solanum lycopersicum*.

LINE	SILENCED GENE	DESIGNATION
1.2 (2n)	<i>ScHKT1;1</i>	<i>ScHKT1;1-RNAi</i>
14.1 (2n)	<i>SlHKT1;1</i>	<i>SlHKT1;1-RNAi</i>
47.1 (2n)	<i>ScHKT1;2</i>	<i>ScHKT1;2-RNAi</i>
34.1 (2n)	<i>SlHKT1;2</i>	<i>SlHKT1;2-RNAi</i>
TI NIL 14 (2n)	None	NIL14 C
TI NIL 17 (2n)	None	NIL17 C

Germinación de semillas y cultivo de tomate

La evaluación fenotípica de las plantas de tomate empleadas en este trabajo, tanto de las silvestres como de las silenciadas, se llevó a cabo en dos tipos de condiciones: condiciones de transpiración (cultivo en macetas y en sistema hidropónico) y condiciones de no transpiración (cultivo en placas de Petri). Además, se ha empleado el cultivo *in vitro* para la obtención de explantos de cotiledones, así como para la germinación, selección y propagación de las líneas transformantes de tomate.

Esterilización de semillas de tomate

Para la esterilización de semillas, previa al cultivo de tomate, se ha seguido el método de esterilización en medio líquido, según el cual las semillas se sumergen en una solución de etanol al 70% (v/v) durante dos minutos (de esta forma se despegan la capa gelatinosa que cubre las semillas). Transcurrido este tiempo, se eliminó el etanol y se lavaron las semillas con agua destilada estéril. Posteriormente, se sumergen en una solución de lejía (hipoclorito sódico comercial) diluida al 50% (v/v) durante 20 minutos. Pasado este tiempo, las semillas se lavaron cuatro veces en agua destilada estéril (aproximadamente 5 minutos por lavado). Después del último lavado, se dejaron en agua durante 18-24 horas a una temperatura de 25 °C. Todos estos pasos se realizaron en agitación suave y constante. Finalmente, las semillas se almacenaron a 4 °C durante 24 horas. Este último paso se realizó para estimular una germinación homogénea. Tras la esterilización, se procedió a la siembra de las semillas, que fue realizada de diferente manera, dependiendo del sistema empleado y las necesidades específicas de cada tipo de ensayo.

Cultivo de plantas de tomate en maceta

Las semillas de tomate previamente esterilizadas se sembraron en semilleros alveolos con fibra de coco (sustrato inerte), a razón de una semilla por alveolo y se mantuvieron en una cámara de cultivo a 25 °C, en oscuridad e irrigadas con agua hasta la emergencia del hipocotilo y los cotiledones de la plántula (aproximadamente unos 5-7 días). Después de este tiempo, las plántulas junto con el sustrato que rodeaba a las raíces, se transfirieron a macetas de 0.75 litros de capacidad que contenían fibra de coco. Las macetas se cultivaron en un invernadero irradiado con luz natural, con un valor medio de irradiación luminosa de 890 mmol m⁻² s⁻¹, entre Septiembre y Mayo, suplementado con luz artificial de 122 μmol m⁻² s⁻¹, con un fotoperiodo, temperatura y humedad de 16/8 horas, 24°C/18 °C y 40/55%, día/noche, respectivamente (Fig. M1A) y se regaron 2-3 veces por semana con una dilución 1/4 de solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) (Tabla M8). Cuando las plantas alcanzaron un estadio vegetativo de 6 hojas se aplicó un tratamiento salino durante 15 días, añadiendo 100 mM de NaCl a la solución de riego Hoagland 1/4x (Fig. M1B). Se cultivaron al menos 6 macetas por línea (con una sola planta por recipiente), tres de las cuales recibieron el tratamiento salino y las otras tres, únicamente la solución nutritiva (Fig. M2). Los estudios de crecimiento de las plantas se realizaron determinando el peso fresco y peso seco de la parte aérea, tanto en tallos como en hojas (ver Apartado M7.1).



Figure M1. Experiment of tomato plants growing in 0.75 liter pots with cocopeat as inert substrate. A) Tomato plants in a greenhouse with natural light irradiation supplemented with artificial light of $122 \mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, with a photoperiod, temperature and humidity of 16/8 h, 24/18 °C and 40/55%, day/night, respectively. **B)** Tomato plants grown in pots after applying a saline treatment (0 mM or 100 mM NaCl) for 15 days.

Table M8. Hoagland standard solution for potted tomato irrigation.

COMPOSITION	FINAL CONC. (1X)	NOTES
Macronutrients $(\text{NO}_3)_2\text{Ca} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ KNO_3 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	5.0 mM 6.0 mM 1.1 mM 2.5 mM	Stock solutions were prepared for each of the macro- and micronutrients, and autoclaved and stored at 4° C to avoid contamination.
Micronutrients H_3BO_3 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	60 μM 20 μM 2 μM 1 μM	
Fe-EDTA Ferric Ethilenediaminetetraacetate	59.6 μM	

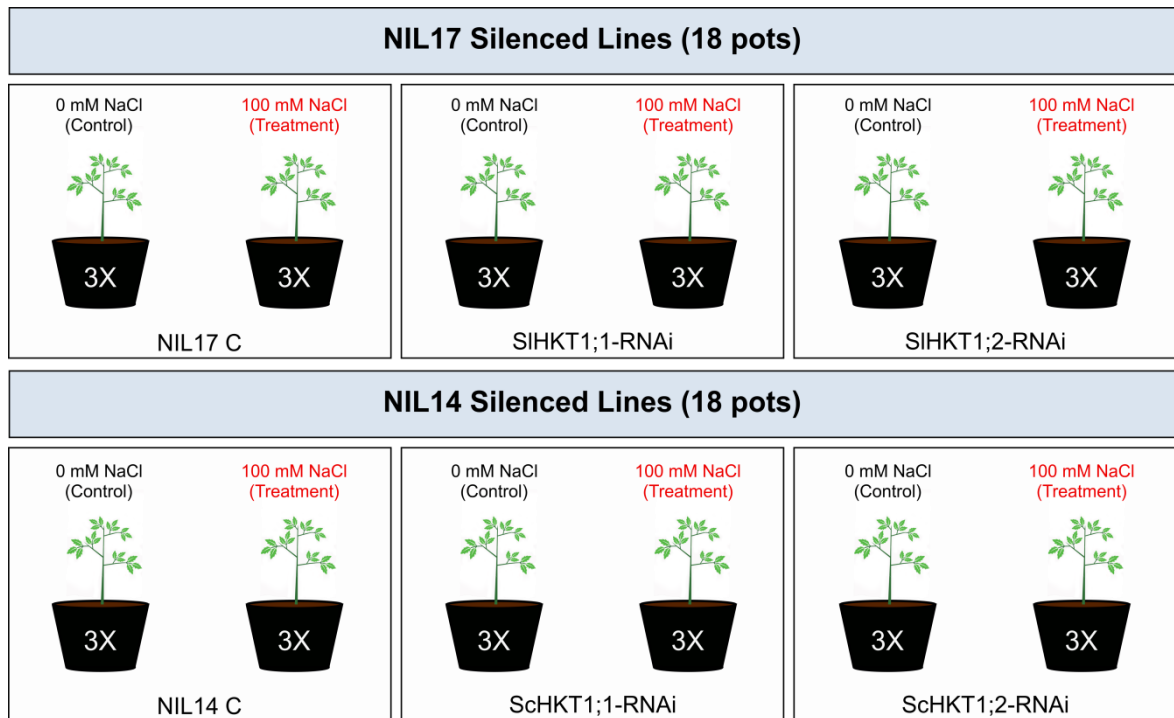


Figure M2. Experimental design of tomato plants grown in 0.75-liter pots with cocopeat. Lines under study, presence or absence of saline treatment (100 mM NaCl), minimum number of replications per treatment (3X) and the total number of pots used in a complete experiment are shown (18 pots from NIL17 + 18 Pots from NIL14 = 36 total pots).

Cultivo de plantas de tomate en sistema hidropónico

Un sistema hidropónico es una técnica de cultivo de plantas que utiliza un sustrato líquido con soluciones de sales minerales en lugar de un sustrato sólido. En este tipo de sistema, las raíces de las plantas se encuentran suspendidas en una solución nutritiva estática o sometida a aireación continua, de forma que es posible controlar más fácilmente los nutrientes y los distintos tratamientos aplicados, así como el pH y la conductividad eléctrica del medio (Jones, 2005; Sonneveld y Voogt, 2009). Es por tanto un sistema idóneo para estudiar el ambiente de la raíz, ya que ésta queda más fácilmente accesible y manipulable que con la mayoría de los sustratos sólidos (Hershey, 1994).

Para llevar a cabo el fenotipado de plantas de tomate en este sistema de cultivo, las semillas previamente esterilizadas se sembraron en cajas de plástico con arena de cuarzo estéril (soporte inerte), durante 5-7 días en oscuridad, a 24 °C y se regaron con agua desionizada. Una vez germinadas, se cultivaron en una cámara de cultivo bajo unas condiciones de temperatura de 24°C/18°C, día/noche, un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, una irradiación de 140 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y una humedad relativa del 40-50 % (Fig. M3A). Las plántulas se regaron durante una semana con una dilución 1/10 de una solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) modificada para el cultivo hidropónico (Tabla M9) y durante una semana adicional con una dilución 1/4 de la misma solución nutritiva, hasta que las plantas alcanzaron un tamaño adecuado para el cultivo hidropónico (estadio vegetativo de 4 hojas). A continuación, las plántulas se transfirieron a cubetas de 2.5 l, a razón de tres plántulas por cubeta, y se cultivaron

durante 15 días en un sistema hidropónico provisto de aireación (Fig. M3B), utilizando como medio líquido una dilución 1/4 de solución nutritiva Hoagland modificada para hidropónico (Tabla M9), que se renovó cada tres días a fin de evitar contaminaciones. Durante este tiempo, las plantas se mantuvieron en un invernadero, en las mismas condiciones indicadas previamente para el cultivo de tomate en maceta y se cubrieron con vasos de plástico para mantener el 100% de humedad, que se mantuvieron hasta que la propia planta los levantó con su crecimiento (Fig. M3C). A los diez días del inicio del cultivo en sistema hidropónico se aplicó un tratamiento salino, añadiendo a nueva solución nutritiva 1/4x, 0 y 100 mM de NaCl (50 mM inicialmente, y otros 50 mM después de tres horas para evitar un choque osmótico), manteniendo estas condiciones durante 6 días adicionales (Fig. M3D). Se utilizaron al menos 6 cubetas (con tres plantas cada una) por línea, tres de las cuales recibieron el tratamiento salino y las otras tres, sólo la solución nutritiva (tratamiento control) (Fig M4). Los estudios de crecimiento de las plantas se realizaron determinando el peso fresco y el peso seco, tanto de la parte aérea (tallos y hojas) como de las raíces (Apartado M7.1).

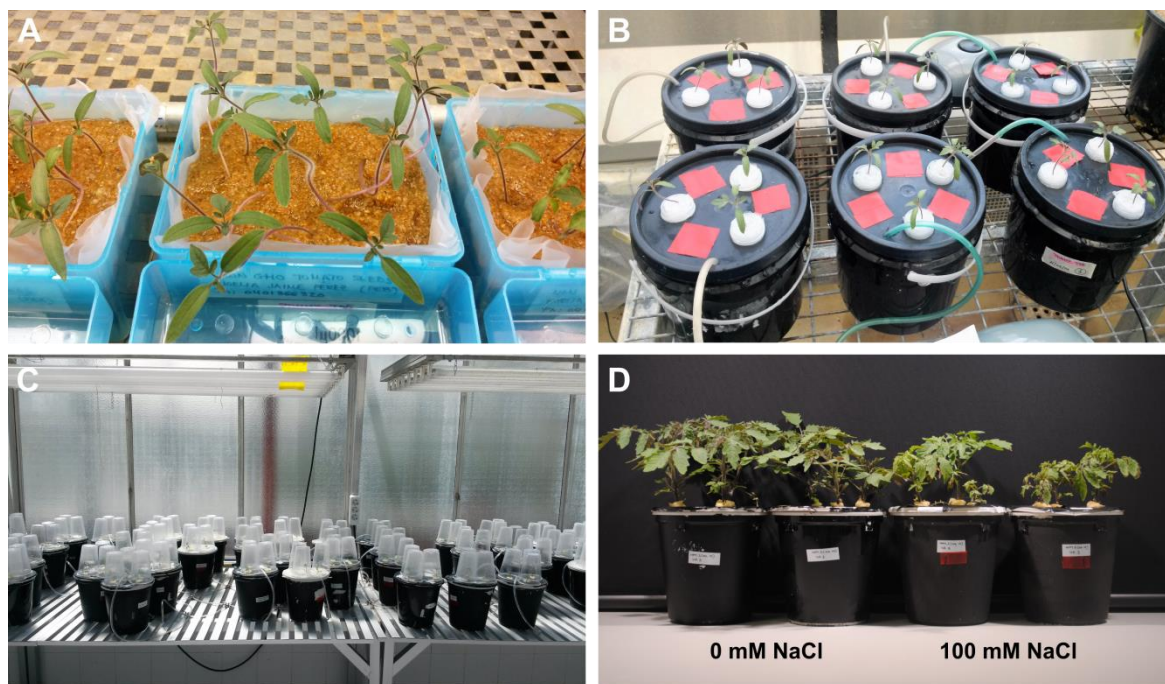


Figure M3. Experiment of tomato plants growing in hydroponic system. **A)** Tomato seedlings growing in plastic boxes containing sterile quartz sand (inert support), in a growth chamber, at 24/18 °C, day/night, in a 16-h light/8-h dark cycle with irradiation of $140 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 40–50% relative humidity. **B)** Plants transferred to 2.5 liter buckets (three plants per bucket) with a 1/4 dilution of a Hoagland solution modified for hydroponic cultivation of tomato plants (Table M9). **C)** Experiment of hydroponics growing in a greenhouse under the same conditions indicated for pots, covered with plastic cups to maintain 100% humidity. **D)** Tomato plants in hydroponic system after applying a saline treatment (0 mM or 100 mM NaCl) for 6 days.

Table M9. Modified Hoagland nutrient solution for tomato plants cultivated in hydroponic system.

COMPOSITION	FINAL CONC. (1X)	NOTES
Macronutrients KH ₂ PO ₄ Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O MgSO ₄ · 7H ₂ O Mg(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O KNO ₃	1.0 mM 4.0 mM 1.1 mM 1.1 mM 5.2 mM	Stock solutions were prepared for each of the macro- and micronutrients, autoclaved and stored at 4° C to avoid contamination.
Micronutrients H ₃ BO ₃ Mn SO ₄ · H ₂ O Cu SO ₄ · 5H ₂ O (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O ZnSO ₄ · 7H ₂ O	46.2 µM 9.10 µM 0.79 µM 0.05 µM 3.10 µM	
Fe-EDTA Ferric Ethilenediaminetetraacetate	89.6 µM	

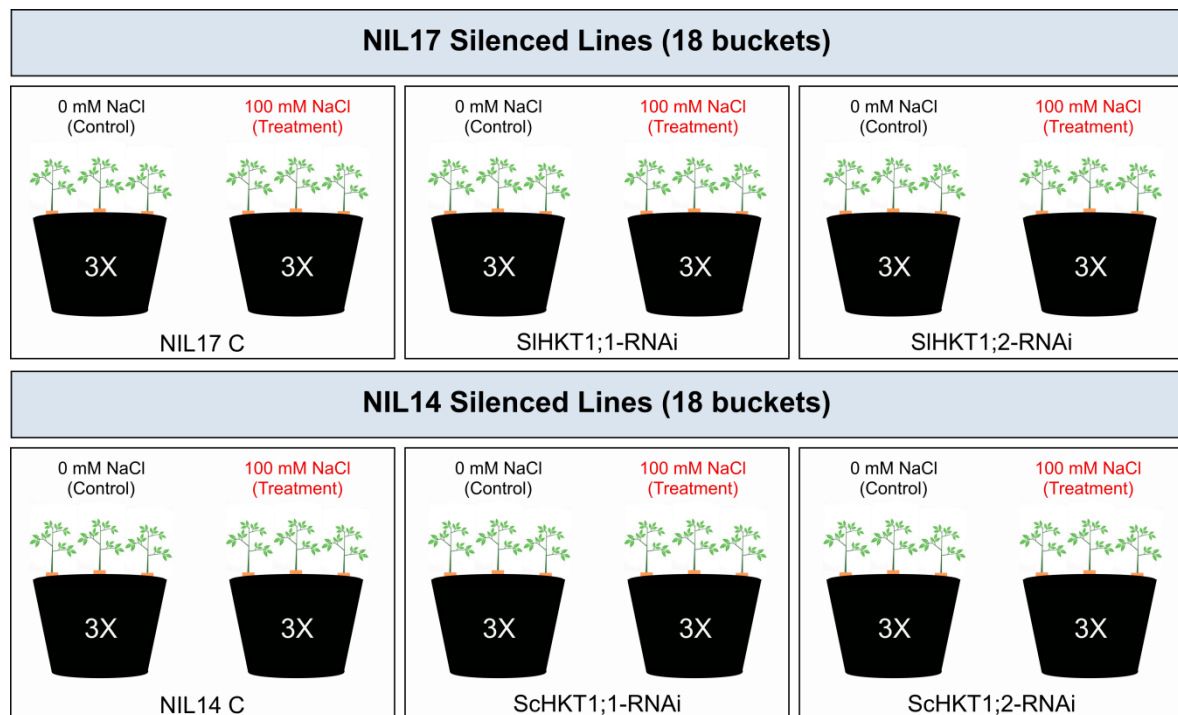


Figure M4. Experimental design of tomato plants grown in 2.5 liters buckets with 1/4x Hoagland solution modified for hydroponic system. Lines under study, presence or absence of saline treatment (100 mM NaCl), minimum number of replications per treatment (3X) and the total number of buckets used in a complete experiment are shown (18 buckets from NIL17 + 18 buckets from NIL14 = 36 total buckets).

Para realizar los análisis de expresión génica mediante RT-qPCR se cultivaron plantas de tomate en sistema hidopónico como se ha descrito previamente en este mismo apartado. Se utilizaron tres cubetas con tres plantas por línea y tratamiento, y se les aplicó un tratamiento salino, que se llevó a cabo añadiendo 100 mM NaCl (50 mM inicialmente y

otros 50 mM después de tres horas). Las plantas se mantuvieron en estas condiciones durante tres días, tras los cuales se recogieron muestras de tejido (hojas, tallos y raíces) que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso (ver Apartado M3.1.2).

Por último, para llevar a cabo la localización tisular de la expresión de los genes que codifican a los transportadores SIHKT1;1 y SIHKT1;2 también se utilizó el sistema hidropónico. En este caso, se utilizaron plantas no transformadas de NIL14 y NIL17 (NIL14 C y NIL17 C), que se cultivaron en las mismas condiciones anteriormente descritas. Se les aplicó un tratamiento salino de 100 mM de NaCl (50 mM inicialmente y otros 50 mM después de tres horas) para promover la expresión génica de los transportadores de Na⁺ (Olías *et al.*, 2009a). Después del tratamiento, se recogieron muestras de hojas y raíces, que se incluyeron en agarosa, siguiendo el protocolo previamente descrito por Athman *et al.* (2014), que se describirá con más detalle en el apartado M8.1.

Cultivo de plántulas de tomate en placa de Petri

Las semillas de tomate previamente esterilizadas se sembraron bajo condiciones estériles (utilizando una cámara de flujo laminar *Microflow* modelo Horizontal 480) en placas de Petri cuadradas de 12x12 cm, que contenían medio 1/4x de Hoagland con agar al 0.8% (w/v), ajustándose el pH a 6.2 con KOH. Las placas se mantuvieron en posición vertical en oscuridad, a 24°C durante 3-5 días, hasta que emergió el hipocotilo. Después de este tiempo se trasladaron a una cámara de cultivo, con unas condiciones controladas de 24°C/18°C (día/noche), un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (día largo), una iluminación de 140 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y una humedad relativa del 40-50 %. Las plántulas se mantuvieron en estas condiciones durante 3-5 días, después de los cuales se transfirieron en condiciones estériles a placas de Petri cuadradas más grandes (24x24 cm), que contenían medio 1/4x de Hoagland (control) o bien medio 1/4x de Hoagland suplementado con 175 mM NaCl (tratamiento salino) (Fig M5A). Se colocaron tres plántulas diferentes de cada una de las líneas en una misma placa, dando lugar a 4 tipos de placas diferentes (dos por cada NIL, una placa control y otra con el tratamiento salino), de las cuales a su vez se realizaron tres réplicas (6 placas por NIL), constituyendo así un total de 12 placas (Fig. M6). Estas placas se trasladaron nuevamente a una cámara de cultivo (con las mismas condiciones anteriormente descritas en este mismo apartado) y se mantuvieron allí durante otros 7 días en posición vertical (Fig. M5B). Tras este tiempo se determinó el peso fresco y peso seco, tanto de la parte aérea como de las raíces (Apartado M7.1).

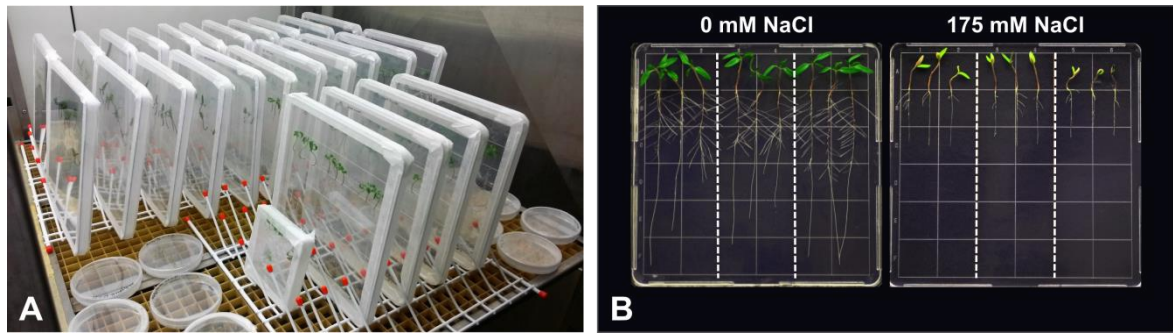


Figure M5. Experiment of tomato plants growing in Petri dishes (24x24 cm) with 1/4x Hoagland solution. A) Tomato plants growing in Petri dishes with 1/4x Hoagland solution (Table M9) in a growth chamber at 24/18°C d/night and a 16-h light/8-h dark cycle with irradiation of 140 $\mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$. B) Plants after 7 days of being transferred in sterile conditions to new plates containing 1/4 Hoagland medium supplemented with 0mM and 175 mM NaCl.

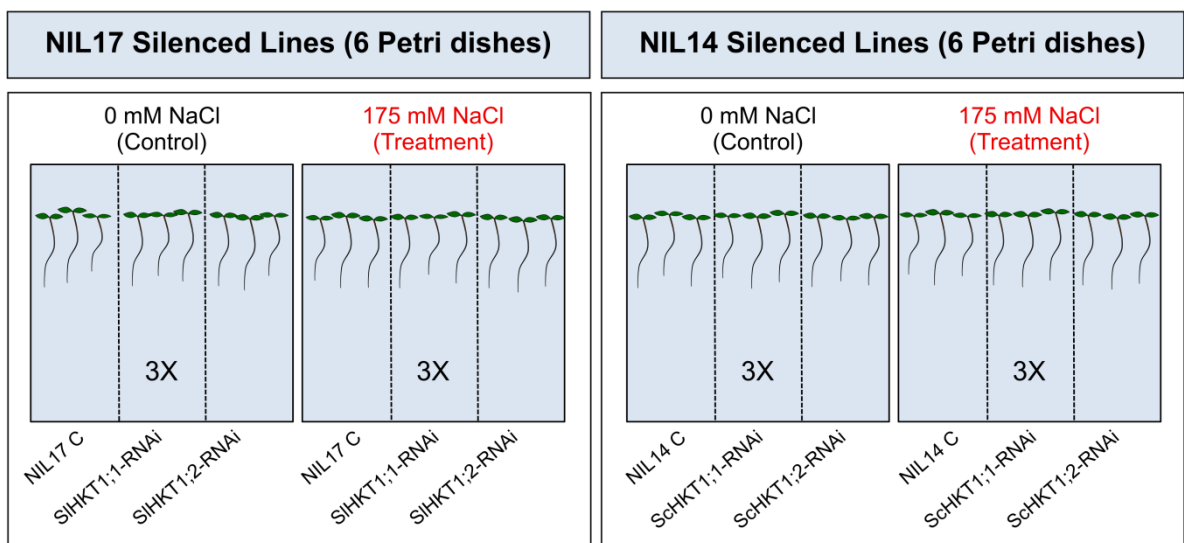


Figure M6. Experimental design of tomato plants grown in large Petri dishes (24x24 cm) with 1/4x Hoagland solution. Lines under study, presence or absence of saline treatment (175 mM NaCl), minimum number of replications per treatment (3X) and the total number of Petri dishes used in a complete experiment are shown (6 Petri dishes from NIL17 + 6 Petri dishes from NIL14 = 12 total Petri dishes).

Cultivo “in vitro” de tomate

Este tipo de cultivo se llevó a cabo para la obtención de explantos de cotiledones de tomate para su transformación con *Agrobacterium*, así como para la regeneración de plantas a partir de dichos cotiledones. También se utilizó para la selección y propagación de los transformantes primarios de las líneas silenciadas de tomate.

Para la obtención de explantos de cotiledones de tomate, se esterilizaron semillas procedentes de las líneas transformantes de tomate y se transfirieron a tubos de ensayo que contenían medio de germinación (GM) compuesto por los macro y micronutrientes del medio MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa al 1% (w/v) y agar al 0.8% (w/v), ajustándose el pH a 6.2 con KOH. Después de 2-4 días en oscuridad a 26 °C, los tubos con las semillas germinadas se transfirieron a una cámara de cultivo, donde se incubaron a 24

°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad, humedad relativa del 40-50% e iluminación de 140 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Las plántulas se mantuvieron en estas condiciones durante aproximadamente dos semanas, hasta que el primer par de hojas se encontraba expandido. En ese momento se aislaron los cotiledones, que se utilizaron para los experimentos de transformación (Apartado M5.2). En dichos experimentos, el medio selectivo de las líneas transformantes de tomate incluyó kanamicina a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$, en un medio de germinación MS con agar al 0.8% (w/v), que se esterilizó y enfrió a unos 50 °C antes de añadir dicho antibiótico.

Para la regeneración de plantas de tomate a partir de cotiledones transformados se utilizaron botes de cultivo y se procedió tal y como se indica en el Apartado M5.3. Para la selección de transformantes de tomate también se utilizaron botes de cultivo que contenían medio GM suplementado con el antibiótico de selección (en nuestro caso Kanamicina) tal y como se indica en el Apartado M5.4.

Por último, para la propagación de los transformantes primarios de tomate, se sacó con unas pinzas una planta regenerada a partir de cotiledones transformados de tomate de un bote de cultivo (Fig. M7) y se colocó sobre un rectángulo de papel de filtro estéril (Fig. M8A). Con ayuda de un escalpelo, se realizaron cortes en dos entrenudos de la planta, dejando un nudo (con sus correspondientes hojas) entre ambos cortes (Fig. M8B). Se cortaron las hojas presentes en dicho nudo (Fig. M8C) y utilizando nuevamente las pinzas, se colocó el fragmento de planta resultante (propágulo) en un nuevo bote de cultivo con unos 50 ml de medio de enraizamiento (RM) (Tabla M25) no selectivo, solidificado con agar al 0.8 % (w/v). Es importante respetar la orientación que tenía el propágulo en el bote de cultivo inicial para que el enraizamiento sea exitoso (Fig. M8D).



Figure M7. Primary transformants of tomato plants growing in *in vitro* culture vessels with RM medium (Table M25), in a growth chamber under the same conditions indicated for Petri dishes.

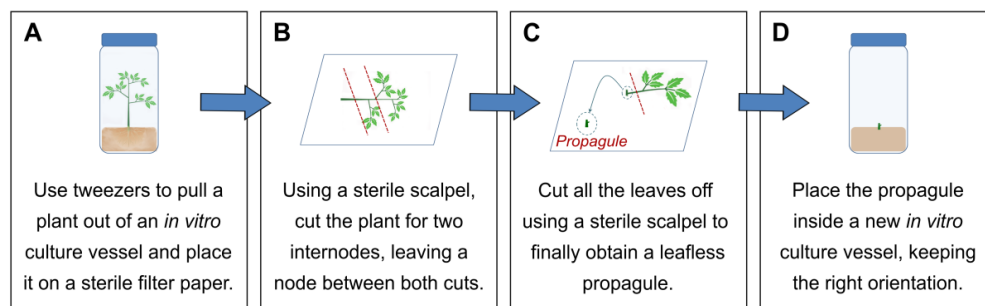


Figure M8. Escheme for the propagation of tomato primary transformants.

En todos los casos, la manipulación del tejido vegetal en condiciones estériles se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal (*Microflow* modelo Horizontal 480). Los medios y algunos materiales, como los botes de cultivo, se esterilizaron mediante autoclave a 121 °C y 1.8 atmósferas de presión durante 20 minutos. El resto de material utilizado se esterilizó por calor en un horno a 180 °C durante 4 horas, o bien por inmersión en etanol absoluto y posterior flameado en la llama del mechero Bunsen (pinzas y escalpelos).

M1.3.2. Plantas de *Arabidopsis* utilizadas

Se utilizaron también plantas de *Arabidopsis thaliana* para realizar estudios comparativos de tolerancia a estrés salino entre las líneas silenciadas para *HKT1* de tomate y mutantes insercionales nulos (*athkt1;1*) para el gen *AtHKT1;1* (*At4g10310.1*). Inicialmente, se utilizaron semillas de diez líneas diferentes (Tabla M10), correspondientes a dos mutantes *AtHKT1;1* distintos, producidas mediante inserciones de T-DNA en el plásmido pAC161 en un fondo genético Columbia (Col-0). Uno de los mutantes era concretamente GK-386D05 y el otro, GK-795G10, ambos de la colección GABI-Kat (<https://www.gabi-kat.de/>). Dichas semillas fueron proporcionadas por el NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Center*). De estas líneas, tras realizar estudios de genotipado y segregación, se seleccionaron cinco en homocigosis (ver Apartado M6.2 y Tabla M11) para extraer sus semillas y utilizarlas en ensayos de expresión y fenotipado de tolerancia a la salinidad. Tres de las líneas seleccionadas correspondían al mutante GK-386D05 y las otras dos, al GK-795G10.

Table M10. *Arabidopsis thaliana* mutant lines initially used.

LINE	MUTANT OF ORIGIN	T-DNA INSERTION
GK3-L1 GK3-L2 GK3-L3 GK3-L4 GK3-L5	GK-386D05	
GK7-L1 GK7-L2 GK7-L3 GK7-L4 GK7-L5	GK-795G10	

Table M11. *Arabidopsis thaliana* mutant lines selected by genotyping and segregation analysis.

LINE	MUTANT OF ORIGIN
GK3-L1 GK3-L4 GK3-L5	GK-386D05
GK7-L3 GK7-L5	GK-795G10

Germinación de semillas y cultivo de Arabidopsis

Al igual que en tomate, la evaluación fenotípica de las plantas de *Arabidopsis* se llevó a cabo tanto en condiciones de transpiración (cultivo en semilleros alveolares) como en condiciones de no transpiración (cultivo en placas de Petri cuadradas con medio mínimo descrito por Mäser *et al.* 2002). En ambos casos se utilizaron semillas de la T₃ (ver Apartado M6.2). Además, se ha empleado el cultivo en placa de Petri redonda con medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con Sulfadiazina (5.25 mg/l) para la germinación y selección de semillas, así como para realizar los estudios de segregación de las líneas T₂ de los mutantes insercionales *athkt1;1*.

Esterilización de semillas de Arabidopsis

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* (aproximadamente 0.1 g) se esterilizaron añadiendo 1 ml de etanol al 70% (v/v) en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml e incubándolas en agitación durante un minuto. Pasado este tiempo, se eliminó el etanol y se adicionó 1 ml de una solución de hipoclorito sódico al 3.5% (v/v) y Tween-20 al 2.5% (v/v) y se mantuvo en agitación durante 5 minutos. Seguidamente, las semillas se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se sembraron en placas de Petri redondas de 9 cm de diámetro a razón de 30-50 semillas por placa. Las placas contenían medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con Sulfadiazina (5.25 mg/l) y agar al 0.7% (w/v). Una vez sembradas las semillas, se vernalizaron a 4 °C en oscuridad durante 48 horas y se trasladaron a una cámara de cultivo (con las mismas condiciones descritas previamente en el Apartado M1.3.1), donde se mantuvieron otros 4-5 días, hasta que alcanzaron el porte adecuado para ser trasplantadas.

Cultivo de plantas de Arabidopsis en semilleros

Cuando las plántulas de *Arabidopsis* alcanzaron el porte adecuado para ser trasplantadas, se pasaron a semilleros alveolos que contenían una mezcla de turba:vermiculita en proporción 1:1, a razón de una planta por semillero (Fig. M9). Se trasplantaron al menos 8 plántulas de cada una de las líneas que habían sido previamente seleccionadas (ver Apartado M1.3.2) y se cultivaron nuevamente en una cámara de cultivo durante tres semanas, regando 2-3 veces por semana con solución nutritiva de riego de *Arabidopsis* (Tabla M12). Después de este tiempo, la mitad de las plantas recibieron tratamiento salino (100 mM de NaCl) y la otra mitad se mantuvieron en condiciones control durante una semana. Los semilleros se cultivaron en una cámara de cultivo, en las mismas condiciones previamente descritas y se regaron 2-3 veces por semana con una solución nutritiva para riego de *Arabidopsis* (tratamiento control) o con la misma solución suplementada con 100 mM de NaCl (tratamiento salino). Tras el tratamiento se realizó un estudio del crecimiento de las plantas, determinando el peso fresco y el peso seco de la parte aérea completa (ver Apartado M7.1).



Figure M9. Sulfadiazine (5.25 g/l) resistant *Arabidopsis* plants moved to seedbeds containing vermiculite: peat-moss (1:1) at the rate of one plant per seedbed.

Table M12. Standard nutrient solution for irrigation of *Arabidopsis thaliana*.

COMPOSITION	FINAL CONC. (1X)	NOTES
Macronutrients		Stock solutions were prepared for each of the macro- and micronutrients, autoclaved and stored at 4° C to avoid contamination.
KNO ₃	5.0 mM	
KH ₂ PO ₄	2.5 mM	
MgSO ₄	2.0 mM	
Ca(NO ₃) ₂	2.0 mM	
Micronutrients		
H ₃ BO ₃	70 µM	
MnCl ₂	14 µM	
CuSO ₄	0.5 µM	
ZnSO ₄	1.0 µM	
Na ₂ MoO ₄	0.2 µM	
NaCl	10 µM	
CoCl ₂	0.01 µM	
Fe-EDTA		
Ferric Ethylenediaminetetraacetate	1.2 mM	

Cultivo de plantas de *Arabidopsis* en placas de Petri

Las semillas de *Arabidopsis* previamente esterilizadas se sembraron en placas de Petri redondas de 9 cm de diámetro, que contenían un medio mínimo descrito por Mäser *et al.* (2002) y se mantuvieron en estas condiciones 3-5 días (Fig. M10A), tras los cuales, las plántulas germinadas se transfirieron a placas cuadradas de 12x12 cm, que contenían este mismo medio, o bien dicho medio suplementado con 75 mM de NaCl (Fig. M10B y Tabla M13). Se transfirieron al menos 10 plántulas de cada una de las líneas previamente seleccionadas (Tabla M11) por placa, junto con otras 10 de la variedad silvestre (Col. 0) para poder comparar entre ambas, dando un total de 10 placas diferentes (5 líneas x 2 tratamientos), de las cuales se hicieron a su vez tres réplicas. De esta forma, obtuvimos un total de 30 placas (Fig. M11), que se trasladaron nuevamente a una cámara de cultivo y se mantuvieron allí durante 40 días, cambiando el medio semanalmente en condiciones de esterilidad para evitar contaminaciones. Pasado este tiempo, se determinó el peso fresco y peso seco, tanto de la parte aérea como de las raíces, tal y como se describe en el Apartado M7.1.

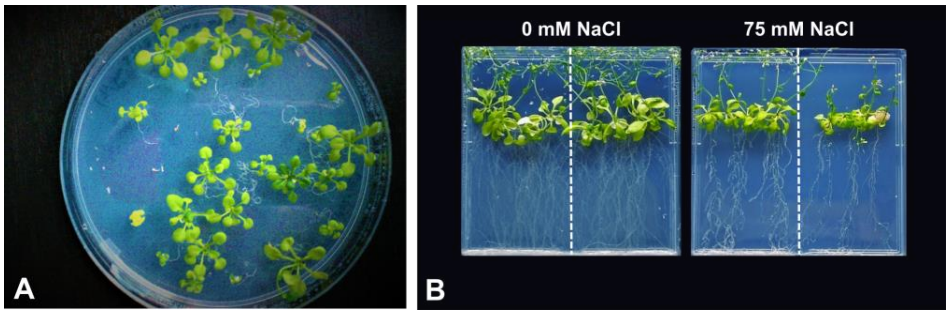


Figure M10. *Arabidopsis* plants growing under non-transpiring conditions. A) *Arabidopsis* growing in round Petri dishes of 9 cm diameter with minimal medium (Mäser *et al.*, 2002). B) Growth of wild type (col 0) and GK3-L1 *Arabidopsis* mutant in square Petri dishes (12x 12 cm) with minimal medium subjected to 0 mM and 100 mM salt treatment for 40 days.

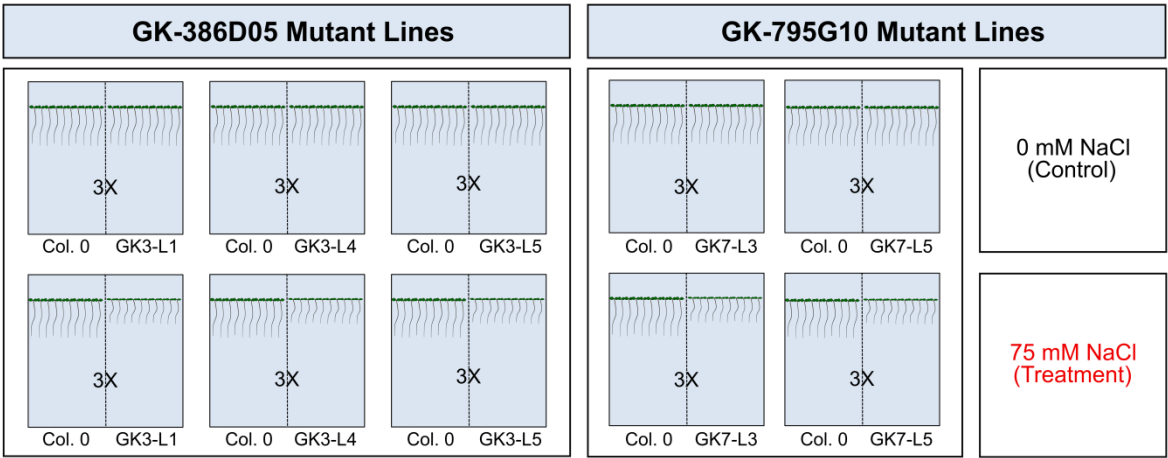


Figure M11. Experimental design of *Arabidopsis* lines grown in Petri dishes (12x12 cm) with a basic (“minimal”) medium (Mäser *et al.*, 2002). Lines under study, presence or absence of saline treatment (75 mM NaCl), minimum number of replications per treatment (3X) and the total number of Petri dishes used in a complete experiment are shown (18 Petri dishes from GK-386D05 + 12 Petri dishes from GK-795G10 = 30 total Petri dishes).

Table M13. Basic (“minimal”) medium for the cultivation of *Arabidopsis* in Petri dishes (Mäser *et al.*, 2002).

COMPOSITION	FINAL CONC. (1x)	NOTES
KH ₂ PO ₄	0.5 mM	Stock solutions were prepared for each of the compounds, which were autoclaved and stored at 4° C to avoid contamination.
KNO ₃	1.25 mM	
MgSO ₄	0.5 mM	
Fe-EDTA	20 µM	
H ₃ BO ₃	7 µM	
MnSO ₄	1.4 µM	
KI	4.5 µM	
ZnSO ₄	1 µM	
CuSO ₄	0.1 µM	
Na ₂ MoO ₄	0.2 µM	
CoCl ₂	10 nM	

M2. MÉTODOS GENERALES DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

M2.1. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA MEDIANTE PCR

Los reactivos utilizados para la PCR (*Polymerase Chain Reaction* o Reacción en Cadena de la Polimerasa), las concentraciones de cada uno de ellos y la duración de las distintas etapas de la reacción, dependen del objetivo de la amplificación, de la naturaleza de los oligonucleótidos cebadores utilizados o de la enzima DNA polimerasa usada, entre otros factores (ver Apartados M2.1.1 y M2.1.2). De forma general, para cada reacción de PCR se utilizaron los componentes que aparecen en la tabla M14, además de agua Milli-Q® estéril hasta un volumen total de 25µl. Las condiciones generales para la amplificación por PCR empleadas en este trabajo se resumen en la tabla M15.

Table M14. PCR master mix.

COMPONENT	FINAL CONCENTRATION (1X)
dNTP's	0.2 mM of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)
Forward primer	0.5 µM
Reverse primer	0.5 µM
Reaction buffer	1x
MgCl ₂	1.5 mM
DNA polymerase	0.02 U/µl
DNA template	20-200 ng

Table M15. General conditions for PCR amplification.

STEP	CYCLES	TEMP. (°C)	TIME (min)
INITIAL DENATURATION	1	94	3
AMPLIFICATION	25-35	-	-
a) Denaturation	a	94	0.5
b) Annealing	b	50-60	0.5
c) Extension	c	72	1/Kb
FINAL EXTENSION	1	72	5
HOLD	-	4-10	Undefined (∞)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador *Mastercycler personal* (Eppendorf). Las temperaturas de hibridación se variaron de acuerdo a la temperatura de fusión (*T_m*) de las parejas de cebadores utilizadas (aproximadamente 3-7 °C por debajo de la *T_m*), calculadas por la empresa suministradora de oligos (ver Apartado M2.1.1). Para el tiempo de extensión se siguió la regla de 1 minuto por Kb, excepto en los casos de DNA polimerasas de mayor fidelidad, en los que se siguieron las recomendaciones del fabricante. El número de ciclos fue variable (25-35) en función del objetivo de la amplificación (rutina, clonaje, RT-qPCR, PCR *in situ*...).

M2.1.1. Oligonucleótidos cebadores

Todos los cebadores utilizados en este trabajo fueron sintetizados y purificados por filtración en gel por la compañía TIB-MOL. BIOL, Berlín, subsidiaria de *Roche Diagnostics S.L. Applied Science*. En las Tablas M16-20 se recogen las secuencias de los oligonucleótidos utilizados como cebadores en los diferentes tipos de uso (clonaje de rutina, clonaje *in vivo*, PCR diagnóstica, RT-qPCR, PCR *in situ*, etc).

Table M16. Primers used for cloning and sequencing. F, Forward; R, Reverse. Restriction sites in primer sequences are underlined.

<i>SIHKT1;1</i> GENE PRIMERS	DIRECTION/ RESTRICTION SITE	PLASMID/ PURPOSE	SEQUENCE 5'-3'
FHKT1.1Xba	F, <i>XbaI</i>	PGEM-T/pYPGE15/ ORF cloning	GCTCTAGATACACAATGAGT AGCTTATCTTAT
RHKT1.1Kpn	R, <i>KpnI</i>	pGEM-T/pYPGE15/ ORF cloning	GGGGTACCTTACAAGAGCTTC CATGC
PrFHKT1ina	F	pGEM-T/ promoter cloning	CAAGGAGAGTGGATATAAGA TAGAGC
ProRHKT1	R	pGEM-T/ promoter cloning	ATGTCTCGGGTTCAAGTTTCT GAG
FHKT1in	F	pGEM-T/ internal oligo	ACATTGTTGTTTTACCTGATTC
RDHKT1in	R	pGEM-T/ internal oligo	TATTAGTCCATTGAGACCAT T
FHKT1intr1	F	pGEM-T/ intron 1 cloning	TTGTGCTTTGGAGTGGAACTC T
RHKT1intr1	R	pGEM-T/ intron 1 cloning	TATTCTCCGTGTCTCTTCAA CA
FHKT1intr2	F	pGEM-T/ intron 2 cloning	CAACTTTGTTACCTATCCTTGT TC
RHKT1intr2	R	pGEM-T/ intron 2 cloning	ACAACCTTGGTCTCCATTTAT CAT
<i>SIHKT1;2</i> GENE PRIMERS	DIRECTION/ RESTRICTION SITE	PLASMID/ PURPOSE	SEQUENCE 5'-3'
FHKT1.2Xba	F, <i>XbaI</i>	pGEM-T/pYPGE15/ ORF cloning	GCTCTAGATACACAATGAGTC ATCACTTTCA
RHKT1.2Kpn	R, <i>KpnI</i>	pGEM-T/pYPGE15/ ORF cloning	GGGGTACCTTATAATACTTTC CAAGC
PrFHKT2in	F	pGEM-T/ promoter cloning	TTTTCTCTTGACAACCCTCT CC
ProRHKT2	R	pGEM-T / promoter cloning	GGACGAAAAGACGGTAGGGT TCTA
FHKT2in	F	pGEM-T/ internal oligo	ATCCCTAGCGCCAAACAAAT C
RDHKT2in	R	pGEM-T/ internal oligo	AAATACAGATAGACCAGCAT GCC
FHKT2intr1	F	pGEM-T/ intron 1 cloning	TTGTTTATTGGAGTGGAAATC TGAA
RHKT2intr1	R	pGEM-T / intron 1 cloning	TGACCATCTGGATTATTTGC CTT
FHKT2intr2	F	pGEM-T / intron 2 cloning	AAAATGAAGAAGAGAAAGG GAAGAA
RHKT2intr2	R	pGEM-T / intron 2 cloning	TGACCATCTGGATTATTTGC CTT

VECTOR PRIMERS	DIRECTION/ RESTRICTION SITE	PLASMID/ PURPOSE	SEQUENCE 5'-3'
M13	F	pGEM-T sequencing	GTAAAACGACGGCCAGT
M13	R	pGEM-T sequencing	AACAGCTATGACCATG
FYPG5	F	pYPGE15 sequencing	GTAGTTTTTCAAGTTCTTAG A
RYPG3	R	pYPGE15 sequencing	TTTCCTTCTTCAACCCACCA AA

Table M17. Primers used for cloning RNAi fragments and diagnostic PCRs to detect the presence of RNAi constructions. F, Forward; R, Reverse. Restriction sites in primer sequences are underlined.

<i>SIHKT1;1</i> GENE PRIMERS	DIRECTION/ RESTRICTION SITE	PLASMID/ PURPOSE	SEQUENCE 5'-3'
FHKT1-BXi	F, <i>Bam</i> HI, <i>Xho</i> I	pGEM-T/ pKANNIBAL Cloning RNAi Fragment	<u>GGATCCTCGAG</u> ACATTGTTG TTTACCTGATTC
RHKT1-HKi	R, <i>Hind</i> III, <i>Kpn</i> I	pGEM-T/ pKANNIBAL Cloning RNAi Fragment	<u>AAGCTTGGTAC</u> TATTTAGT CCATTGAGACCATT
<i>SIHKT1;2</i> GENE PRIMERS	DIRECTION/ RESTRICTION SITE	PLASMID/ PURPOSE	SEQUENCE 5'-3'
FHKT2-BXi	F, <i>Bam</i> HI, <i>Xho</i> I	pGEM-T/ pKANNIBAL Cloning RNAi Fragment	<u>GGATCCTCGAG</u> ATCCCTAGC GCCAAACAAATC
RHKT2-HKi	R, <i>Hind</i> III, <i>Kpn</i> I	pGEM-T/ pKANNIBAL Cloning RNAi Fragment	<u>AAGCTTGGTAC</u> CAAATACA GATAGACCAGCATGCC
VECTOR PRIMERS	DIRECTION/ RESTRICTION SITE	PLASMID/ PURPOSE	SEQUENCE 5'-3'
FNPTII	F	pKANNIBAL/Marker Gene NPTII (KanR)	CCGCAACTTCTTTACCTATTT CC
RNPTII	R	pKANNIBAL/Marker Gene NPTII (KanR)	GAATCGTCAAGAAGGCCGA TA
FpKB35S	F	pKANNIBAL/Flanking Sense cDNA fragment	GTTCAATTCATTGGAGA
RpKBintr	R	pKANNIBAL/Flanking Sense cDNA fragment	CGTCTTACACATCACTTG

Table M18. Primers used for genotyping *Arabidopsis thaliana* lines with a T-DNA insertion in the gene coding for *AtHKT1;1*, from the GABI-Kat collection. F, Forward; R, Reverse.

<i>AtHKT1;1</i> GENE PRIMERS	DIRECTION/ RESTRICTION SITE	PLASMID/ PURPOSE	SEQUENCE 5'-3'
FGK1-hkt1	F	GK-386D05 Mutant/ Genotyping of <i>AtHKT1;1</i>	AAAACAGGAATCGCTATC ATCAGT
RGK1-hkt1	R	GK-386D05 Mutant/ Genotyping of <i>AtHKT1;1</i>	AACCAACTTCTCGTACGAA CTCAT
FGK2-hkt1	F	GK-795G10 Mutant/ Genotyping of <i>AtHKT1;1</i>	ATGCACACATAGGTGCAGT TTTAC
RGK2-hkt1	R	GK-795G10 Mutant/ Genotyping of <i>AtHKT1;1</i>	CCACTACATTGAAGGGACA TTTT

VECTOR PRIMERS	DIRECTION/ RESTRICTION SITE	PLASMID/ PURPOSE	SEQUENCE 5'-3'
pAC8409	-	T-DNA from pAC161 Vector	ATATTGACCATCATACTCA TTGC
pAC3144	-	T-DNA from pAC161 Vector	GTGGATTGATGTGATATCTC C

Table M19. Primers used for *in vivo* cloning in yeast, diagnostic PCRs to detect the constructions and for sequencing. F, Forward; R, Reverse. In capital letters, sequences corresponding to the vector to carry out homologous recombination.

<i>SIHKT1;1</i> GENE PRIMERS	DIRECTION/ RESTRICTION SITE	PLASMID/ PURPOSE	SEQUENCE 5'-3'
FHKT1OC	F	pDR196/ Cloning HKT1;1 ORF	ACTTTAAGAAGGAGCCCTT CACCACGTGatgagtagcttatctt atttgg
RHKT1OC	R	pDR196/ Cloning HKT1;1 ORF	CAAGAAAGCTGGGTCTGGCG CGCCACCCCTTttacaagagcttcc aagctt
<i>SIHKT1;2</i> GENE PRIMERS	DIRECTION/ RESTRICTION SITE	PLASMID/ PURPOSE	SEQUENCE 5'-3'
FHKT2OC	F	pDR196/ Cloning HKT1;2 ORF	ACTTTAAGAAGGAGCCCTT CACCACGTGatgaagtcacattt caattt
FHKT2OCNUT	F	pDR196/Cloning HKT1;2 ORF without 5'UTR	TAACTTTAAGAAGGAGCC CTTCACCACGTGatgagcttagg gtaaagc
RHKT2OC	R	pDR196/ Cloning HKT1;2 ORF	AAGAAAGCTGGGTCTGGCGC GCCACCCCTTttataactttccaag cctt
VECTOR PRIMERS	DIRECTION/ RESTRICTION SITE	PLASMID/ PURPOSE	SEQUENCE 5'-3'
FpDRMCS	F	Detection of MCS fragment	TTGTTTAACTTTAAGAAGGA GCC
RpDRMCS	R	Detection of MCS fragment	ACCACTTTGTACAAGAAAG CTGG

Table M20. Primers used for RT-qPCR and *in situ* PCR. F, Forward; R, Reverse.

PRIMERS	SECUENCE 5'-3'	REFERENCE
SIHKT1.1 F	TCTAGCCCAAGAACTCAAAT	Asins <i>et al.</i> (2013)
SIHKT1.1 R	CTAATGTTACAACCTCCAAGGAATT	
SIHKT1.2 F	TGAGCTAGGGAATGTAATAAACG	Asins <i>et al.</i> (2013)
SIHKT1.2 R	AGAGAGAAACTAACGATGAACC	
SISOS1 F	TCGAGTGATGATTCTGGTGG'	Asins <i>et al.</i> (2013)
SISOS1 R	ATCACAGTGTGGAAAGGCT'	
LeNHX2 F	CCTTTGAGGGGAACAATGG'	Huertas <i>et al.</i> (2012)
LeNHX2 R	CATCTTCATCTTCGCTCTCC'	
LeNHX4 F	TGGTGGGCAGGTTTGATGAGAG	Huertas <i>et al.</i> (2012)
LeNHX4 R	TGTGGTGGCAGCAGGAGACTTA	
LeEF1 α F	GACAGGCGTTCAGGTAAGGA	Asins <i>et al.</i> (2013)
LeEF1 α R	GGGTATTCAGCAAAGGTCTC	
AtHKT1.1 F	ACTTTCCCCAGCTATCTTGGTACTC	Mason <i>et al.</i> (2010)
AtHKT1.1 R	CATCATCTCCTCCTTCTTTCTCTATCG	
Tubulin-3 F	TGGTGGAGCCTTACAACGCTACTT	Mason <i>et al.</i> (2010)
Tubulin-3 R	TTCACAGCAAGCTTACGGAGGTCA	
Actin-2 F	TGAGCAAAGAAATCACAGCACT	Mason <i>et al.</i> (2010)
Actin-2 R	CCTGGACCTGCCTCATCATAC	

M2.1.2. DNA polimerasas

Para amplificaciones por PCR de rutina se utilizaron DNA polimerasas termoestables de diferentes casas comerciales (Sigma-Aldrich Química, España; MBL, Dominion; Biotaq, Bioline, etc) procedentes de la bacetria termófila *Thermus aquaticus* (*Taq*). Estas enzimas presentan una baja fidelidad o alta tasa de mutación debido a la ausencia de actividad correctora exonucleasa 3'-5' (*Proof-reading*) y poseen una actividad 3'-desoxiadenosina transferasa terminal, por la que añaden una molécula de dATP al extremo 3' de la hebra recién sintetizada, permitiendo la ligación de fragmentos de DNA por extremos cohesivos en vectores con extremos de T en 5' (*TA cloning*) como es el caso del vector *pGEM-T Easy* (Promega). Para aplicaciones de clonaje que requerían de una mayor fidelidad, ORFs y fragmentos genómicos conteniendo intrones y regiones promotoras de las diferentes variantes alélicas de los genes de interés, se utilizaron DNA polimerasas procedentes de la bacteria *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*), que presentan una tasa de mutación hasta 50 veces menor que las *Taq*s convencionales, al presentar una actividad correctora exonucleasa 3'-5' o *Proof-reading*. Esta enzima tiene el inconveniente de no presentar actividad 3' desoxiadenosina, dando lugar a fragmentos romos, inservibles para el clonaje por *TA cloning* en vectores con extremos de T en 5', como el mencionado *pGEM-*

T Easy (Promega). En este caso, los extremos cohesivos con extensiones de A en 3' para *TA cloning* se consiguieron, una vez acabada la reacción normal de PCR, añadiendo a la mezcla 2.5 U de alguna de las *Taq*s mencionadas previamente y 200 μ M de dATP, dejando proceder la reacción durante 30 minutos adicionales a 72 °C.

Las DNA polimerasas de tipo *Pfu* suelen tener un bajo rendimiento (o incluso nulo) para amplificaciones de más de 2Kb. En estos casos se recurrió a la utilización de mezclas comerciales de ADN polimerasas, como *JumpStart™ Accutag LA DNA polymerase mix* (Sigma-Aldrich Química, España), *Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System, dNTPack* (Roche, España), o *PfuUltra II Fusion HotStart DNA Polymerase* (Agilent Technology, España) compuestas de una *Taq* convencional, con cierta cantidad de enzima *Pfu*, ambas inactivadas a baja temperatura mediante interacción de un anticuerpo específico. A temperaturas por encima de la temperatura de extensión, dicho anticuerpo es liberado, recuperando su actividad polimerasa, lo que permite una reacción de tipo *hot-start*, dando una amplificación más específica y de mayor rendimiento para fragmentos mayores de 2 Kb, así como una fidelidad hasta 6.5 veces mayor que las *Taq*s convencionales. Para este tipo de polimerasa se siguieron las indicaciones de tiempos y temperaturas dadas por los fabricantes. Estas mezclas conservan la actividad 3' desoxiadenosina transferasa terminal, lo que permite la ligación de fragmentos de DNA por extremos cohesivos (*TA cloning*).

M2.2. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA

La separación de fragmentos de DNA mediante electroforesis en geles de agarosa se realizó según se describe en Sambrook *et al.* (1989). Tanto el DNA plasmídico, como el procedente de digestiones con enzimas o el procedente de reacciones de PCR se analizaron en geles horizontales de agarosa, preparados en una solución tampón SB 1x (*Sodium Borate Buffer* 1x: hidróxido de sodio 10 mM, borato de sodio 38 mM, llevado a pH 8.0) conteniendo bromuro de etidio (0.4 μ g/ml) para visualizar las bandas a la luz ultravioleta (UV). En los casos en los que se requirió la extracción de fragmentos de DNA para su procesamiento posterior (clonaje, secuenciación, etc) se utilizó tampón TAE 1x (Tris/acetato 40 mM, EDTA 0.1 mM pH 8), ya que el borato y las altas concentraciones de EDTA pueden inhibir reacciones enzimáticas posteriores.

La concentración de agarosa en los geles fue del 0.7 al 1% (w/v), dependiendo del tamaño del DNA a separar. Las muestras se prepararon en tampón de carga 1x, añadiendo 2 μ l de tampón de carga 6x (*Loading Buffer* 6x: sacarosa al 50% -w/v-, azul de Bromofenol 0.25%, EDTA 0.1M) por cada 10 μ l de preparación de DNA. La separación electroforética se realizó en el mismo tampón utilizado para la preparación del gel, a un voltaje de 80-100 V. El tamaño de los fragmentos de interés se estimó por comparación visual al UV, en un analizador de imagen *Gel Doc 2000* (Bio-Rad, *Molecular Imagen System*) con el marcador de peso molecular de DNA *1 Kb DNA Ladder Molecular Weight Marker* (Genecraft), o bien con el marcador *Low Range Plus DNA Ladder* (Fisher Bioreagents) para fragmentos inferiores a 2000 bp.

M2.2.1. Extracción y purificación de DNA en geles de agarosa

Para la recuperación de fragmentos de DNA de geles de agarosa se utilizó el kit comercial *GenElute™ Gel Extraction Kit* (Sigma®), que permite extraer el DNA del gel tras cortar la banda de interés y solubilizarla, depositándola en un dispositivo de filtración provisto de una membrana de sílice. Esta membrana retiene el DNA, de forma que éste se puede eluir posteriormente en una solución de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) o en agua Milli-Q®, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

M2.2.2. Ligación y subclonado del producto de PCR

En la mayoría de los casos, los productos de PCR se purificaron en geles de agarosa tal y como se describe en el apartado anterior. A continuación, se ligaron al vector plasmídico *pGEM®-T Easy* por extremos cohesivos de Adenina en 3', como se describe en las instrucciones del fabricante (Promega). Para ello se utilizó una razón inserto:vector ($n=i/v$), generalmente entre 1:1 y 3:1, siguiendo la fórmula empleada por Sambrook *et al.* (1989):

$$\frac{25 \text{ ng of vector} \times \text{size of insert (Kb)}}{\text{size of vector (Kb)}} \times n = \text{ng of insert required}$$

Equation M1. Calculation of ng of insert in a ligation reaction.

Brevemente, una cantidad adecuada en nanogramos de un fragmento purificado se mezcló con 0.5 µl de vector pGEM-T (25 ng), 1x de tampón T4 DNA ligasa y 1 U de T4 DNA ligasa (1U/µl), en un volumen total de 10 µl, transcurriendo la reacción durante 1 hora a 22 °C o 24 horas a 4 °C. Un volumen variable de ligación (1-10 µl) se utilizó para transformar células competentes de *E. coli*, como se describe en el apartado M1.1.4. de transformación de *E. coli*.

En unos pocos casos, los productos amplificados por PCR con cebadores diseñados con sitios de restricción en su secuencia (Tablas M16 y M17), fueron ligados directamente a los vectores de expresión de levaduras o plantas, previa digestión, tanto del producto de PCR como del plásmido destino, con los enzimas de restricción adecuados, como se describe a continuación en los apartados M2.2.3 y M2.2.4.

M2.2.3. Digestión de DNA con enzimas de restricción

Las digestiones con enzimas de restricción, bien de fragmentos de DNA o de plásmidos, se han llevado a cabo siguiendo las recomendaciones dadas por el fabricante con respecto al tipo de tampón y temperatura de reacción (Roche Diagnostics). Una reacción de digestión tipo incluía 1-5 µg de plásmido o 100-500 ng de fragmento de DNA, 1x de tampón específico de cada enzima y 1-5 U de enzima (1 U es definida como la cantidad de enzima que digiere 1 µg de DNA en 1 hora en las condiciones óptimas de reacción) en un volumen total de 10-20 µl, incubándose la reacción durante 1-2 horas a las condiciones óptimas de temperatura específica para cada enzima, generalmente 37 °C.

En la mayoría de los casos se utilizaron dobles digestiones con enzimas diferentes, lo que permitía el subclonado unidireccional del inserto en el vector plasmídico. Siempre que fue posible se eligieron sitios de restricción cuyos enzimas presentaran condiciones óptimas similares o compatibles de reacción (tipo de tampón, temperatura...), de acuerdo con el esquema de compatibilidades suministradas por el fabricante (Roche Diagnostics). En caso de incompatibilidad de las condiciones de reacción de los enzimas se llevó a cabo una digestión secuencial, primero con un enzima y su tampón específico, en un volumen pequeño de reacción (10 µl). Tras dos horas de incubación se diluyó 2-3 veces el volumen total, después de añadir una segunda enzima de restricción y su tampón específico a una concentración 1x, procediendo la reacción durante 2 horas adicionales. Alternativamente, en unos pocos casos, tras la digestión con el primer enzima, el DNA se precipitó con acetato sódico 3 M y 2-3 volúmenes de etanol al 95% (v/v), incubando a -20 °C durante 30 minutos. Después de una centrifugación de 10 minutos a 16000 g, el sedimento se lavó con etanol al 70% (v/v), se secó y se resuspendió en un volumen adecuado de tampón TE o agua Milli-Q®, tras lo cual se digirió con el segundo enzima.

M2.2.4. Subclonado en vectores de expresión de levaduras y plantas

La ligación de los fragmentos de DNA, directamente digeridos o liberados tras la digestión sobre plásmido pGEM-T, se llevó a cabo utilizando el kit comercial *Rapid DNA ligation kit* (Roche Diagnostic), siguiendo las instrucciones del fabricante, que fueron muy similares a las indicadas en el apartado M2.2.2. De forma resumida, cantidades adecuadas de inserto y de vector, calculadas por la ecuación M1 (Apartado M2.2.2) se diluyeron en un volumen total de 20 µl, que contenía tampón de dilución de DNA 1x, tampón de ligasa 1x y 5 U de bacteriófago T4 DNA ligasa. Un volumen variable de esta ligación (1-10 µl) se utilizó para transformar células competentes de *E. coli*, como se describió previamente en el Apartado M1.1.4.

M2.3. SECUENCIACIÓN DEL DNA Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

M2.3.1. Secuenciación del DNA

La identificación positiva, así como la obtención de la secuencia y comprobación de la fidelidad de la misma de cada uno de los clones que contenían los insertos parciales y/o los ORFs de los genes objeto de estudio se hicieron en un secuenciador Sanger (capilar) *ABI-PRISM 3130xl Genetic Analyzer* de 16 capilares de 80 cm, en el Servicio de Secuenciación de DNA de la Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada o bien utilizando el kit de secuenciación *ABI PRISM Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (PE Applied Biosystems), en el Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos y secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, CSIC, Granada. Ambos servicios son capaces de obtener secuencias de unas 700-1000 bp.

Las muestras se prepararon para su envío a dichos servicios en un volumen final de 12 µl de agua Milli-Q® esterilizada, calidad PCR, conteniendo 500 ng de DNA plasmídico o 30-90 ng de fragmento de PCR purificado y 3.2 picomoles de cada uno de los

cebadores, *forward* y *reverse*, para la secuenciación en ambos sentidos de las bases que flanquean la zona o cebadores específicos del fragmento clonado (Tablas M16- M20).

M2.3.2. Análisis bioinformático de las secuencias

El ensamblaje de las secuencias se llevó a cabo mediante el programa *Sequencher*™ 4.1.4 (*Gen Code Corporation*). La búsqueda de secuencias homólogas se llevó a cabo mediante los programas BLAST (Altschul *et al.*, 1997) o FASTA (Pearson y Lipman, 1988), consultando las bases de datos de bancos genéticos generales, principalmente *GenBank*, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) EMBL, (<http://www.ebi.ac.uk/Databases/>) y DDBJ, (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/searches-e.html>), ARAMENNON *Plant Membrane Protein Database* (<http://crombec.botanic.unikoeln.de/>), *Bio-Analytic Resource (BAR) of University of Toronto* Winter *et al.* (2007), (<http://bar.utoronto.ca/efp/egibin/efpWeb.egi>), las bases de datos específicas de tomate, como *The International Tomato Genome Sequencing Project* (<https://solgenomics.net/>); *DFCI Tomato Gene Index*, <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=tomato>; *Kasuga DNA Research Institute*, *MiBASE Micro-Tom Database* (<http://www.kazusa.or.jp/sol/microtom/indexj.html>), o las bases de datos específicas de *Arabidopsis thaliana*, como *The Arabidopsis Information Resource (TAIR)* (<https://www.arabidopsis.org/>).

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas se llevó a cabo utilizando el programa *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1994), junto a otras herramientas bioinformáticas de uso libre disponibles en internet (*BCM Search Launcher*, <http://dot.imgen.bcm.tmc.edu/>; *Expasy*, <http://www.expasy.org/tools/>) o utilizando diferentes programas en paquetes integrados (*Vector NTI Advance 10.0*, *Informax*; *DNAMAN 6.0*, *Lynnon Corporation*; *ApE*, M. Wayne Davis).

Los archivos obtenidos en el alineamiento múltiple fueron usados para la creación de árboles filogenéticos con el software *MEGA4* (Tamura *et al.*, 2007) mediante el test *Neighbor-Joining* con 10000 repeticiones y comparación por pares (*pairwise comparison*). Los archivos obtenidos en *Clustal W* fueron transformados en archivos compatibles con el software *MEGA4* y una vez obtenido este archivo se procedió a la obtención de los árboles filogenéticos. Para llevar a cabo el análisis *in silico* de las secuencias de los promotores (elementos reguladores en *cis* -*cis-regulatory elements*-) de las diferentes variantes alélicas *HKT1;1* y *HKT1;2* de tomate se han utilizado las bases de datos *PLACE* (<http://www.dna.affrc.go.jp/P/>) (Higo *et al.*, 1999), *PlantCARE* (<http://bioinformatics.ps.b.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) (Lescot *et al.*, 2002) y *NSITE-PL* (<http://linux1.softberry.com>). La presencia de islas CpG se comprobó con una herramienta web denominada *CpG Islands Searcher*, usando los parámetros establecidos por defecto (Takai y Jones, 2003).

M2.4. PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA PLASMÍDICO

M2.4.1. Minipreparaciones de DNA plasmídico

Las preparaciones de plásmidos amplificados en *E. coli* se llevaron a cabo picando con un palillo de madera estéril de 15 a 24 colonias independientes de una placa de Petri e introduciendo a continuación dicho palillo en un tubo de ensayo con 2-3 ml de medio LB líquido, suplementado con el antibiótico de resistencia del plásmido en cuestión. Los tubos se incubaron durante 12-16 horas en agitación a 37 °C y después de este tiempo, se recogió parte del cultivo de cada uno de los tubos de ensayo en tubos de microcentrífuga y se centrifugó a 12000 g para recoger las células. A continuación se utilizó el kit comercial *Gen Elute™ Plasmid Miniprep kit* (Sigma-Aldrich Química, España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

M2.4.2. Cuantificación de DNA plasmídico

La concentración de DNA en las soluciones se estimó mediante espectrofotometría utilizando un *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* (NanoDrop Technologies). Las relaciones DO_{260}/DO_{280} y DO_{260}/DO_{230} se usaron para estimar la contaminación de la preparación por proteínas y polisacáridos, respectivamente. Alternativamente, la concentración de DNA se estimó por comparación visual de las bandas de DNA separadas por electroforesis en gel de agarosa (como se describe en el apartado M2.2) al UV, en un analizador de imagen Bio-Rad, con una cantidad conocida de fago λ digerido con *EcoRI-HindIII* (*Molecular Weight Marker III*, Roche Diagnostic).

M2.4.3. Plásmidos utilizados

En la siguiente tabla se muestran los plásmidos utilizados en este trabajo, no construidos durante la realización del mismo.

Table M21. Vector systems used in this work.

VECTORS	PURPOSE / CHARACTERISTICS	REFERENCES
pGEM-T easy	Vector used for the routine cloning of PCR products, with Ampicillin resistance (Amp ^R).	Promega
pYPGE15	Yeast expression vector of <i>Sl/ScHKT1</i> under the control of the <i>PGK1</i> promoter, with URA3 marker and Amp ^R .	Brunelli y Pall, 1993
pDR196 ccdB	Yeast expression vector of <i>Sl/ScHKT1</i> under the control of the <i>PMA1</i> promoter, with URA3 marker and Amp ^R .	Rentsch <i>et al.</i> (1995)
pKANNIBAL	Vector used to produce a hairpin <i>RNAi</i> construct for <i>Sl/ScHKT1</i> (<i>ihpRNA</i>) to carry out stable gene silencing via transformation with <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , with Kanamycin resistance (Kan ^R).	Wesley <i>et al.</i> (2001)
pART27	Binary vector system for use in <i>Agrobacterium</i> -mediated plant transformation, with resistance to Spectinomycin and Streptomycin (Spec/Strep ^R).	Gleave (1992)

M3. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE PLANTAS

M3.1. PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE ADN Y ARN DE PLANTAS

M3.1.1. Extracción de DNA genómico

Para la extracción de DNA genómico de plantas se utilizaron 75-100 mg de hojas de plantas jóvenes de tomate (aproximadamente 1 o 2 hojas) y se homogeneizaron con mortero y pistilo en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. A continuación se utilizó el kit comercial *GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich Química, España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Alternativamente, para la detección genotípica de las plantas azigotas de la progenie T_1 de las líneas silenciadas en ensayos de fenotipado, se utilizó un procedimiento rápido de preparación de DNA genómico (Kasajima *et al.*, 2004). Para ello se tomaron discos de hojas con la punta de una pipeta de un 1 ml de las distintas líneas silenciadas de tomate y se introdujeron en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml que contenía 200 μL de “solución de Edwards” (200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, and 0.5% -p/v- SDS), diluida 1/10 en buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8 y 1 mM EDTA). Una vez trituradas las muestras con un émbolo de plástico, se centrifugaron a 16000 g durante 1 o 2 minutos. El sobrenadante se recogió en un tubo de microcentrífuga nuevo, almacenándose a 4 °C o -20°C para su uso posterior.

M3.1.2. Purificación y análisis de RNA

Extracción de RNA total de plantas

Todo el material utilizado para la extracción de RNA fue tratado de forma adecuada para la eliminación de toda fuente de contaminación por RNAsas, tal y como se describe en Sambrook *et al.* (1989). El material de vidrio y de porcelana se trató durante 4 horas a 170 °C y el material de plástico utilizado, como puntas de pipeta o tubos de microcentrífuga, fue de calidad libre de RNAsas. El agua y las soluciones utilizadas se trataron con 0.1 % (v/v) de DEPC (dietil pirocarbonato) durante al menos 12 horas, en agitación continua, tras las cuales se autoclavaron para inactivar el DEPC, manteniéndose posteriormente en agitación durante otras 12 horas adicionales, de forma que se disiparan los productos de desecho de dicho compuesto. Además, tanto la superficie de trabajo, así como los utensilios que pudieran estar en contacto directo con el RNA de las muestras (morteros, pistilos, cubetas de electroforesis, moldes, peines...) fueron incubados durante 15 minutos en una solución desnaturalizante (SDS 3%, 10 mM NaOH) y posteriormente lavados con *RNaseZap™* (Sigma-Aldrich).

Previamente, se recogieron muestras de tejido (hojas, tallos y raíces) de plantas, que se lavaron 4 veces en agua destilada y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, almacenándose a -80 °C. A continuación se homogeneizaron con mortero y pistilo en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Para la extracción del RNA total de este tejido pulverizado se utilizó un protocolo modificado, obtenido a partir de varios

protocolos distintos, que se describe a continuación: el polvo fino procedente de la homogenización de las muestras con nitrógeno líquido se puso en tubos de microcentrífuga de 2 ml, hasta llenar aproximadamente la mitad de cada tubo. Se añadieron entonces 800 µl de tampón de extracción CTAB caliente (Tabla M22) a cada uno de los tubos y se agitaron enérgicamente en un vórtex durante 30 segundos. A continuación, se colocaron los tubos en un baño a 65 °C durante 5 minutos, agitándose en el vórtex una o dos veces, para asegurarnos de que el contenido de los tubos quedase bien mezclado. Se añadieron entonces 800 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1, v/v), se agitaron los tubos con fuerza en el vórtex durante 30 segundos y posteriormente se centrifugaron durante 25 minutos a 16000 g a 4 °C para separar las fases. Tras esta centrifugación, se recuperó la fase acuosa superior y se pasó a un tubo nuevo de microcentrífuga de 1.5 ml. Se añadieron 3/7 volúmenes de LiCl 10 M, se mezcló bien el contenido de los tubos por pipeteo y se dejaron incubando en hielo durante 2-3 horas. Tras este tiempo se centrifugaron nuevamente los tubos a 16000 g y 4 °C durante 25 minutos y se desechó el sobrenadante. A partir de este momento, para continuar con la extracción de RNA de las muestras, se utilizó el kit comercial *Aurum™ Total RNA mini Kit* (BIO-RAD). El precipitado resultante de la centrifugación anterior se resuspendió con 100 µl de agua Milli-Q® tratada con DEPC, adicionando posteriormente 350 µl de *Aurum Lysis Solution* y 250 µl de etanol absoluto, para dar un volumen total de 700 µl. Se mezcló bien el contenido de los tubos por pipeteo y/o inversión, pasando estos 700 µl de líquido por una columna del kit. Se centrifugaron los tubos durante 30 segundos a 16000 g y se desechó el líquido del tubo. Seguidamente, se lavó la columna con 700 µl de *Low Stringency Wash Solution*, centrifugando nuevamente a 16000 g durante 30 segundos. En este momento, la columna se trató con DNAsa *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega) para eliminar el DNA genómico contaminante. Para ello, a cada columna se le añadieron 5 µl de DNAsa, 8 µl de disolución tampón 10x y 67 µl de agua Milli-Q® tratada con DEPC (80 µl por muestra) y se incubaron a 37 °C durante al menos 30 minutos. Tras la incubación, las columnas se lavaron con 700 µl de *High stringency Wash Solution*, centrifugando a 16000 g durante 30 segundos y luego se lavaron nuevamente con 700 µl de *Low Stringency Wash Solution*, volviendo a centrifugar a 16000 g durante 30 segundos. Tras esta última centrifugación, se desechó la solución de lavado y se centrifugaron los tubos a 13000 g, esta vez durante 2 minutos, para secar completamente las columnas. Por último, para eluir el RNA se utilizaron 50-60 µl de *RNAsecure™ Resuspension Solution* (Ambion), incubando a 60 °C durante 10 minutos, para minimizar la degradación del RNA y maximizar la elución, centrifugando a continuación durante 1 minuto a 16000 g. El RNA obtenido se almacenó a -80 °C para su uso posterior. La calidad del RNA y la ausencia de degradación o de contaminación con DNA genómico se comprobaron mediante cuantificación espectrofotométrica en un *NanoDrop* y/o mediante la visualización al UV en un analizador de imagen de las bandas de RNA ribosómico en geles de SB 1x con bromuro de etidio, como se describe en el apartado M2.2.

Table M22. Composition of CTAB extraction buffer (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide).

COMPOSITION	CONCENTRATION	NOTES
Tris EDTA NaCl CTAB (Sigma)	100 mM 30 mM 2 M 3% (w/v)	Adjust pH to 8.0 units using HCl and autoclave.
PVP (PVP40, Sigma) PVPP (Sigma) 2-mercaptoethanol	2% (w/v) 2% (w/v) 4% (v/v)	Add just before using, heating for 5 minutes at 65 °C

Cuantificación del RNA

Para determinar las concentraciones de RNA se utilizó un espectrofotómetro *NanoDrop™ 1000 spectrophotometer* (Thermo Scientific), al igual que en el caso del DNA (Apartado M2.4.2). La determinación del grado de pureza de las muestras se realizó en función de las razones de absorbancia DO₂₆₀/DO₂₈₀ y DO₂₆₀/DO₂₃₀. Todas las preparaciones de RNA tuvieron una razón DO₂₆₀/DO₂₈₀ superior a 1.8 (un valor inferior a 1.8 para esta razón es indicativo de la presencia de proteínas u otros contaminantes que absorben en una longitud de onda próxima a 280 nm) y una razón DO₂₆₀/DO₂₃₀ superior a 2.0 (un valor inferior a 2.0 en esta razón nos indica la presencia de EDTA y polisacáridos, que tienen su nivel de absorbancia en una longitud de onda próxima a 230 nm).

Visualización del RNA

Además del uso del *NanoDrop*, para determinar la calidad de RNA extraído de los distintos tejidos de tomate también se llevó a cabo una separación electroforética de 1 µg de RNA en gel de agarosa al 1% (w/v) en tampón SB 1x (ver Apartado M2.2) conteniendo bromuro de etidio (0.4 µg/ml) para visualizar las bandas a la luz UV. Como ya se ha dicho anteriormente, para evitar la posible actividad de RNAsas que pudieran degradar nuestras muestras, la cubeta de electroforesis, así como el molde y el peine se incubaron durante 15 minutos en solución desnaturalizante (SDS 3%, 10 mM NaOH) y posteriormente, fueron lavados con *RNaseZap™* (Sigma-Aldrich). Para su carga en el gel se ajustó el volumen de las muestras de RNA a 10 µl con agua Milli-Q® DEPC y se añadieron 2 µl de tampón de carga 6x (*Loading Buffer* 6x). El RNA se separó electroforéticamente a un voltaje constante de 100 V y a continuación, se visualizó mediante exposición a la luz UV en un analizador de imagen *Gel Doc 2000* (Bio-Rad, *Molecular Imagen System*).

Transcripción Reversa del RNA (RT)

Esta técnica se basa en la síntesis de una hebra de DNA complementaria (cDNA) a partir del RNA mensajero (mRNA) contenido en el RNA total aislado del tejido, por medio de una reacción de retrotranscripción, RT (Sambrook *et al.*, 1989). La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1 µg de RNA, utilizando el kit comercial *iScript™ cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se ajustó el volumen de cada muestra de RNA a 15 µl con agua libre de nucleasas (*Nuclease-Free water*)

en un microtubo de 0.2 ml. Se añadieron 4 µl de 5x *iScript*TM Reaction Mix y 1 µl de *iScript*TM Reverse Transcriptase para dar un volumen total de 20 µl por muestra. Seguidamente, los microtubos fueron incubados a 25 °C durante 5 minutos. A continuación se mantuvieron a 42 °C durante 30 minutos y por último, a 85 °C durante 5 minutos en un termociclador *Mastercycler personal* (Eppendorf). Las muestras de cDNA se almacenaron a -20 °C hasta su posterior uso.

PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

Los niveles de expresión de *HKT1;1*, *HKT1;2*, *SOS1*, *NHX2* y *NHX4* en las líneas silenciadas de tomate y de *AtHKT1;1* en las líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* se determinaron mediante RT-qPCR utilizando los oligos específicos que aparecen en la tabla M20. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando *iQ*TM SyBr Green Supermix (Bio-Rad) en equipos *iQ*TM5 Multicolor Real-Time PCR Detection System o BioRad *iCycler MyiQ2* (Bio-Rad). Al igual que se había descrito previamente (Asins *et al.*, 2013; Huertas *et al.*, 2012), se utilizaron 0.65 µl de cDNA sin diluir, mezclados con 7.5 µl de *iQ*TM SyBr Green Supermix 2x (Bio-Rad) y 0.45 µM de los oligonucleótidos cebadores *forward* y *reverse* correspondientes, completando con agua Milli-Q® tratada con DEPC hasta un volumen final de 13 µl por cada reacción.

El programa de PCR consistió en una incubación inicial a 95 °C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y finalmente, 72 °C durante 30 segundos. La fluorescencia emitida por el SyBr Green se midió al final de la extensión de cada ciclo. Los datos de expresión relativa fueron calculados a partir de la diferencia en el ciclo umbral (Ct, del inglés *Threshold Cycle*) entre los genes estudiados y los del Factor de Elongación 1α (en el caso del tomate) o los de la Tubulina-3 y la Actina-2 (en el caso de *Arabidopsis thaliana*), que se utilizaron como genes constitutivos o *housekeeping*. Los niveles de expresión relativa se calcularon con la ayuda de la Ecuación M2 (Livak y Schmittgen, 2001), utilizando los niveles de expresión de cada gen en cada tejido y los de NIL17C (NIL 17 no silenciada y no tratada con sal) como muestra calibradora en el caso del tomate, o los de Col-0 (*Wild type* no tratada con sal) en el caso de *Arabidopsis thaliana*. Cada una de las determinaciones se llevó a cabo en tres muestras biológicas independientes (tres plantas diferentes) y tres replicas técnicas diferentes (tres reacciones de RT-qPCR).

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Equation M2. Calculation of relative gene expression from RT-qPCR data.

M4. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE TRANSPORTADORES HKT1 EN LEVADURAS

M4.1. MINIPREPARACIONES DE DNA PLASMÍDICO PARA LEVADURAS

Las preparaciones de plásmidos amplificados en levaduras se llevaron a cabo modificando el protocolo original del kit comercial *Gen Elute™ Plasmid Miniprep kit* (Sigma-Aldrich Química, España). Para ello, se picaron colonias de una placa de Petri con un palillo de madera estéril, inoculándolas en tubos Falcon® de 15 ml con 10 ml de medio YPD y se incubaron durante 16-24 horas en agitación a 28 °C. A continuación se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 3000 g y se resuspendieron las células precipitadas en 1 ml de agua destilada estéril. El líquido con las células en suspensión se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, donde se centrifugaron nuevamente durante 1 minuto a 12000 g y se desechó el agua. Las células se resuspendieron en 200 µl de *Resuspension Solution* y se adicionaron 100 µl de *Lyticase Solution* (1.2 M sorbitol; 0.1 M tampón NaPO₄, pH 7.5; 5 mg/ml de liticase procedente de *Arthrobacter luteus*). La mezcla se agitó fuertemente en un vórtex durante 30 segundos y se incubó a 37 °C durante al menos 30 minutos. Después de este tiempo se añadieron 300 µl de *Lysis Solution*, se agitó suavemente por inversión de 4 a 6 veces y se incubó a 22 °C durante 10 minutos. A continuación se añadieron 420 µl de *Neutralization Solution*, se agitó suavemente por inversión de 4 a 6 veces y se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos. Tras esta centrifugación, se pasó el sobrenadante a través de una columna del kit, centrifugando a 10000 g durante 30-60 segundos y se desechó el líquido del tubo. La columna se lavó añadiendo 500 µl de *Optional Wash Solution* y centrifugando nuevamente a 10000 g durante 30-60 segundos. A continuación se volvió a lavar la columna, añadiendo 700 µl de *Wash Solution* y centrifugando a 10000 g durante 30-60 segundos. Tras descartar el líquido del tubo, se volvió a colocar la columna en el mismo tubo y se centrifugó a 10000 g durante 2 minutos para secar por completo la columna. Por último, se colocó la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se añadieron 50 µl de *Elution Solution* previamente calentada a 65 °C. Tras 1 minuto de incubación, se centrifugó a 10000 g durante 30-60 segundos.

M4.2. CLONAJE EN LEVADURAS

Para llevar a cabo los ensayos de transporte en levaduras se utilizaron dos estrategias de clonaje diferentes: en la primera estrategia, los ORFs de *Sl/ScHKT1;1* y *Sl/ScHKT1;2* se clonaron como fragmentos de *XbaI-KpnI* amplificados por PCR usando los respectivos cebadores (Tabla M16) en el vector de expresión de levadura pYPGE15 bajo control del promotor *PGK1* (Asins *et al.*, 2013; Brunelli y Pall, 1993). Alternativamente, se utilizaron los vectores de tecnología GATEWAY®, pENTRY-MCS y pDR196 (ver Tabla M21), en este último caso para clonar dichos ORFs mediante la técnica de clonaje *in vivo*, usando los respectivos cebadores de la Tabla M20. Por su mayor complejidad, dicho procedimiento se describe con mayor detalle en el siguiente apartado. Como ya se ha indicado anteriormente, la cepa WΔ6 (Apartado M1.2.1), deficiente en los sistemas de

transporte de K⁺ endógenos TRK1 y TRK2, se utilizó para realizar la complementación funcional y los ensayos de transporte (Haro y Rodríguez-Navarro, 2003).

M4.2.1 Clonaje *in vivo*

El clonaje *in vivo* en levaduras es uno de los métodos más eficientes para realizar construcciones plasmídicas libres de errores, que permite clonar genes directamente en vectores de expresión de levaduras. Las levaduras ofrecen un sistema eficiente para clonar fragmentos de DNA, independientemente de la longitud y procedencia de éstos, mediante el proceso de recombinación homóloga (Kitazono, 2009, 2011).

Para realizar este tipo de clonaje se procedió como se ha descrito previamente (Aranda-Sicilia *et al.*, 2012; Fusco *et al.*, 1999): en primer lugar se realizó una reacción de recombinación entre los plásmidos pENTRY-MCS y pDR196 para construir un vector pDR196 con un sitio de multiclonación o MCS (*Multi-Cloning Site*), siguiendo las instrucciones de Gateway® LR Clonase® Enzyme Mix. De esta forma, introducimos en el vector pDR196 múltiples sitios de restricción (pDR196/MCS), lo cual facilitará la clonación de los distintos ORFs de interés. A continuación se realizó una PCR que amplificaba el fragmento/ORF de interés con los cebadores específicos que aparecen en la tabla M20 y cDNA procedente de líneas NIL14C o de NIL17C. Para ello se utilizó la enzima *PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase* (Agilent Technologies), siguiendo las instrucciones de uso del fabricante y las condiciones que aparecen en la Tabla M23.

Table M23. PCR amplification conditions for *in vivo* cloning.

STEP	CYCLES	TEMP. (°C)	TIME
INITIAL DENATURATION	1	94	2 min
AMPLIFICATION	30	-	-
a) Denaturation	a	94	20 seg
b) Annealing	b	50-56	30 seg
c) Extension	c	72	1min/Kb
FINAL EXTENSION	1	72	7 min
HOLD	-	4	Undefined (∞)

Se realizaron cuatro construcciones distintas (además del pDRØ o plásmido vacío, utilizado como control negativo), clonando los ORFs de *Sl/ScHKT1;1* y *Sl/ScHKT1;2* en el vector pDR196/MCS. Debido a que en el caso de la proteína HKT1;2, tanto *S. lycopersicum* como *S. cheesmaniae* tienen la misma secuencia codificante (ver Fig. R1), se utilizaron dos versiones diferentes de dicha proteína. Una de ellas era la versión completa o FL (*Full Length*) y la otra, denominada NUT (Non-5'-UTR), carecía de UTR en el extremo 5'. Dicho dominio se predecía en la secuencia genómica de *SlHKT1;2* anotada por el ITAG2.40 (<https://solgenomics.net/>). En la Tabla M24 aparecen las construcciones realizadas y sus denominaciones. A continuación se llevó a cabo la linearización del vector pDR196/MCS con la enzima *BbrpI*. Para ello se utilizaron 500 ng del vector y 0.5 µl de la enzima, completando hasta un volumen final de 10 µl y se incubó a 37 °C durante 2 horas. Tras la

digestión se incubó a 65 °C durante 5 minutos para inactivar la enzima. Por último, la mitad del volumen de la reacción de digestión (unos 5 µl) se mezcló con el producto de PCR obtenido en el paso anterior y la otra mitad se utilizó para transformar la cepa de levadura con el vector pDR vacío (sin inserto o pDRØ). A partir de este momento se llevó a cabo un protocolo típico de transformación de levaduras (ver Apartado M1.2.3). De esta forma, la propia levadura se encargaba de realizar el proceso de recombinación homóloga, directamente en el interior de la célula (la levadura utiliza su propia maquinaria celular para introducir el inserto en el vector y recircularizarlo *in vivo*, motivo por el cual esta técnica se denomina clonaje *in vivo*).

Table M24. Constructs used for *in vivo* cloning in yeast.

CONSTRUCTIONS CARRIED OUT	ORIGIN OF GENOMIC DNA	DESIGNATION
SIHKT1;1 ORF + pDR196/MCS	NIL17 C	WΔ6-SIHKT1;1
ScHKT1;1 ORF + pDR196/MCS	NIL14 C	WΔ6-ScHKT1;1
Sl/ScHKT1;2 ORF + pDR196/MCS	Indifferent (NIL14 C/NIL17 C)	WΔ6-Sc/SIHKT1;2 (FL)
HKT1;2 ORF without 5' UTR + pDR196/MCS	Indifferent (NIL14 C/NIL17 C)	WΔ6-Sc/SIHKT1;2 (NUT)
pDR196/ empty MCS (Negative Control)	Without genomic DNA	WΔ6-pDRØ

Si la transformación era exitosa, las colonias presentes en las placas de Petri se comprobaban mediante PCR diagnóstica de las minipreparaciones de DNA plasmídico (ver Apartado M2.3.1) con los oligonucleótidos internos del fragmento/ORF en cuestión (ver tabla M19) y si eran positivas, se enviaban al servicio de secuenciación para confirmar la presencia de la construcción.

M4.3. TEST DE COMPLEMENTACIÓN (DROP-TEST)

Las construcciones expresadas en la levadura se ensayaron en experimentos de *drop-test* (test de la gota), es decir, ensayos de complementación con los genes *HKT1* de tomate en la cepa de levadura *WΔ6* defectiva para transportadores de K⁺ (*Δtrk1*, *Δtrk2*) en medio AP (*Arginine Phosphate*) (Tabla M4) suplementado con diferentes concentraciones de KCl (Haro y Rodríguez-Navarro, 2003). Para ello, se hicieron precultivos líquidos de 3 ml en medio AP suplementados con 50 mM KCl y los aminoácidos requeridos, inoculando con una alícuota, a una DO de 0.04 medida a 660 nm (DO₆₆₀), de cada una de las diferentes versiones transformantes de la cepa *WΔ6*, previamente crecidas en medio sólido SC-Ura o YPD (Tabla M4), creciendo toda la noche a 30°C en agitación a 200rpm. Tras medir la DO₆₆₀ final, los cultivos se centrifugaron a 3000 g durante 5 min y se resuspendieron a una DO₆₆₀ de 1.0 con agua estéril. Para llevar a cabo los drop tests, se aplicaron 5 µL de cada una de las versiones transformantes diluidas seriadamente a 4 concentraciones (1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³) y se aplicaron sobre una placa en medio sólido AP suplementado con diferentes concentraciones de K⁺ (50 mM KCl, 5 mM KCl, 2.5 mM KCl,

1 mM KCl, 0.5 mM KCl, 0.25 mM KCl) y los aminoácidos requeridos. Se inocularon 3 placas de cada concentración con cada una de las versiones transformantes. Para preparar las diluciones seriadas de los cultivos se utilizaron placas de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (Fig. M12A) de 96 pocillos, que se rellenaron de la siguiente forma: con ayuda de una pipeta, se cargaron 200 μ l de agua MilliQ® en la primera columna de pocillos y 180 μ l en las columnas de pocillos 2, 3 y 4. A continuación, con ayuda de un asa de siembra o un palillo estéril se recogió parte del cultivo de las placas que contenían los precultivos de cada una de las versiones transformantes y se resuspendió en los 200 μ l de agua Milli-Q® de los pocillos de la primera columna. Esta columna tendría por tanto la concentración de KCl del cultivo original (50 mM KCl). A continuación se pipeteó varias veces para resuspender bien el cultivo y se transfirieron 20 μ l de cada pocillo de la primera columna al correspondiente pocillo de la segunda columna. Tras pipetear nuevamente varias veces, se transfirieron otros 20 μ l desde todos los pocillos de la segunda columna a los correspondientes pocillos de la tercera columna. Este paso se repitió, pasando otros 20 μ l desde todos los pocillos de la tercera columna a los correspondientes de la cuarta. Una vez preparadas las diluciones seriadas de los cultivos, se introdujo en los pocillos de la placa ELISA un replicador manual (Fig. M12B), esterilizado previamente con ayuda de etanol 100% y posterior flameado con el mechero Bunsen. Con el replicador impregnado con las diluciones de los cultivos se selló suavemente cada una de las placas que contenían medio sólido AP suplementado con las diferentes concentraciones de K⁺ anteriormente mencionadas (Fig. M12C), quedando dichas placas impregnadas con una gota de cada una de las diluciones de los cultivos. Se empezó con las placas de menor concentración de K⁺ para evitar así posibles contaminaciones. Tras la imprimación, las gotas de las placas se dejaron secar durante 2-3 minutos en la cabina de flujo laminar, tras los cuales se sellaron con Parafilm® y se incubaron durante 3-4 días a 30 °C. Después de este tiempo las placas se fotografiaron en un analizador de imagen *Gel Doc 2000* (Bio-Rad Molecular Imagen System).



Figure M12. System used for the application of serial dilutions of liquid yeast cultures in Petri dishes to measure growth (drop-test assay). **A)** 96 well ELISA plate. **B)** Floating-pin replicator, containing 48 pins of 3.18 mm diameter. **C)** Application of serial dilutions of liquid yeast cultures in a Petri dish with the floating-pin replicator.

M4.4. ENSAYOS DE TRANSPORTE DE CATIONES EN LEVADURAS

Los ensayos de transporte de Na⁺ y K⁺ en la cepa de levadura *WΔ6* transformada con las construcciones de *Sl/ScHKT1* se llevaron a cabo en el laboratorio del Prof. Alonso Rodríguez Navarro, en el Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), UPM-INIA, bajo la supervisión de la Dra. Rosario Haro, en dos estancias breves. La primera de

ellas fue financiada por el MINECO (EEBB-I-13-06904) y la segunda por los proyectos AGL2010-17090 y AGL2013-41733-R.

Se realizaron varios tipos de ensayos diferentes: inicialmente se utilizó el método de la depleción de cationes en el medio (Haro y Rodríguez-Navarro, 2002; Haro *et al.*, 2005), que normalmente se utiliza cuando los transportadores son de alta afinidad, es decir, capaces de transportar cationes a concentraciones inferiores a 50 μ M. En los casos en los que a concentraciones tan bajas de los cationes no se observara transporte, se utilizó el método de la filtración (Haro y Rodríguez-Navarro, 2002; Haro *et al.*, 2005).

M4.4.1. Método de la depleción

Este método se utilizó inicialmente para los ensayos de transporte de Na⁺ y K⁺ de las primeras versiones de *SIHKT1;1* y *SIHKT1;2* clonadas como fragmentos *XbaI-KpnI* en el vector de expresión de levadura pYPGE15. Con este procedimiento se determina la disminución con respecto al tiempo de la concentración de catión (Na⁺ o K⁺) que queda en el medio (depleción de Na⁺ o K⁺) en el que crecen las levaduras transformadas con ambas construcciones génicas tras la adición de 200 μ M de NaCl o de KCl. Para ello, las levaduras se inocularon en un matraz Erlenmeyer de 1 litro con 500 ml de medio AP suplementado con 50 mM de K⁺ y se incubaron durante 15-17 horas en agitación orbital (150 rpm) a 28 °C, hasta que el cultivo alcanzó una OD de 0.2-0.3 medida a 550 nm. El cultivo se pasó entonces a dos tubos de centrifuga de 250 ml y se centrifugó a 4500 g durante 5 minutos. Se desechó el medio y las células precipitadas en el fondo del tubo se resuspendieron en 250 ml de agua Milli-Q®. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones, repitiendo este lavado 2 veces. En este momento comenzaron las condiciones de ayuno de K⁺. Para ello, las células se resuspendieron en 150-170ml de medio AP sin K⁺, al que se le adicionó glucosa al 2% (w/v) y vitaminas a una concentración final de 1x, de forma que el cultivo alcanzase una OD de 0.7-0.9 medida a 550 nm. Se incubó entonces a 28 °C en agitación orbital (150 rpm) durante 4 horas. Tras este periodo de ayuno se determinó la OD del cultivo para poder ajustarla posteriormente a 2, centrifugando nuevamente el cultivo a 4500 g durante 5 minutos y resuspendiéndolo en MES-Ca 10 mM a pH 6.0 y glucosa al 2% (w/v). Se incubó durante 4 minutos a 28 °C en un baño con agitación y se añadieron las distintas concentraciones de sales (en nuestro caso, 200 μ M de NaCl o de KCl), poniendo un cronómetro en marcha. A continuación se recogió 1 ml de cada tipo de cultivo y condición en un tubo de microcentrífuga de 2 ml y se centrifugó durante 1 minuto a 16000 g, anotando el tiempo una vez que las muestras comenzaban a centrifugar. Se recogió entonces 0.5 ml de sobrenadante de cada una de las muestras y se depositó en un tubo Falcon® de 15 ml. Una vez acabada la toma de muestras, se añadió a cada tubo un volumen de agua Milli-Q® de 4.5 ml para diluir el sobrenadante 10 veces, completando un volumen final de 5 ml (0.5 ml de sobrenadante + 4.5 ml de agua Milli-Q®). Las muestras se agitaron fuertemente en un agitador tipo vórtex durante 1 minuto y se determinó la concentración de Na⁺ o de K⁺ en el medio mediante espectrofotometría de absorción atómica en cada una de las muestras. Los resultados se obtuvieron calculando la media de al menos 4 experimentos independientes.

M4.4.2. Método de la filtración

Este método se utilizó en los ensayos de transporte de Na⁺ llevados a cabo en las levaduras que contenían los ORFs de diferentes versiones alelicas de *Sl/ScHKT1;1* y *Sl/ScHKT1;2* clonados tanto como fragmentos *XbaI-KpnI* en el vector de expresión de levadura pYPGE15, como en el vector pDR196/MCS, este ultimo, mediante la técnica de clonaje *in vivo*. Con el método de la filtración se determina la cantidad de un determinado catión (Na⁺) que es absorbido por la levadura en el tiempo de incubación (Haro *et al.*, 2005; Bañuelos *et al.*, 2008). Para llevar a cabo este método, las levaduras se inocularon en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 150 ml de medio AP suplementado con 50 mM de K⁺ y se incubaron durante 15-17 horas en agitación orbital (150 rpm) a 28 °C, hasta que el cultivo alcanzó una OD de 0.2-0.3 medida a 550 nm. El cultivo se pasó entonces a dos tubos de centrífuga de 250 ml y se centrifugó a 4500 g durante 5 minutos. Se desechó el medio y las células precipitadas en el fondo del tubo se resuspendieron en 250 ml de agua Milli-Q®. Se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones, repitiendo este lavado 2 veces. En este momento comenzaron las condiciones de ayuno de K⁺. Para ello, las células se resuspendieron en 50-80 ml de medio AP sin K⁺ (calculando una OD de 0.5 medida a 550 nm), al que se le adicionó glucosa al 2% (w/v) y vitaminas a una concentración final de 1x. Los matraces con este medio se incubaron entonces a 28 °C en agitación orbital (150 rpm) durante 4 horas. Al finalizar el periodo de ayuno se determinó la OD a 550 nm, se centrifugó nuevamente y se resuspendió en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, añadiendo unos 50 ml de MES-Ca 10 mM a pH 6.0 y glucosa al 2% (w/v), dando una OD de 0.3-0.4 a 550 nm. Se utilizó un matraz para cada concentración de sustrato a determinar, siendo éstas de 1, 2, 5, 10, 15 y 20 mM de NaCl. Se añadió la primera de las concentraciones simultáneamente a todos los tipos de células diferentes de cada ensayo y se puso el cronómetro en marcha. De cada matraz se tomó un volumen de 5-10 ml y se pasó a través de filtros de membrana de nitrato de celulosa, de 0.8 µm de luz y 2.3 cm diametro (Millipore ref. AAWP14250). Los filtros se lavaron rápidamente con una solución de MgCl₂ 20 mM y se anotó el tiempo. Cada uno de los filtros conteniendo las células filtradas se colocó en un tubo Falcon® de 15 ml. Este proceso se repitió para todas las concentraciones de NaCl. Una vez acabada la toma de muestras, se añadieron 5 ml de solución de extracción, compuesta por 16.56 ml/l de HCl 30% Suprapur® (Merck Millipore) y 2 g/l de MgCl₂ en agua Milli-Q®, a cada uno de los tubos que contenían los filtros. Todos los tubos se agitaron fuertemente en un vórtex y se incubaron durante un mínimo de 5 horas, tras las cuales se determinaron las concentraciones de Na⁺ mediante espectrofotometría de absorción atómica. Cada experimento completo (con las seis condiciones de sustrato diferentes) se repitió al menos 4 veces para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

M5. GENÉTICA REVERSA MEDIANTE SILENCIAMIENTO GÉNICO ESTABLE DE *HKT1* EN TOMATE (*RNAi*)

Para evaluar el papel de *Sl/ScHKT1;1* y *Sl/ScHKT1;2* en el transporte de Na⁺ a larga distancia y en la tolerancia del tomate a la salinidad se han generado plantas transgénicas con reducción de función por silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, del inglés *Post-Transcriptional Gene Silencing*) utilizando la técnica descrita por (Chuang y

Meyerowitz, 2000). Esta técnica utiliza RNA de interferencia (RNAi) para silenciar la expresión de genes en diferentes especies de plantas, habiéndose utilizado con éxito en *Arabidopsis* y tomate (Xiong *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2002; Davuluri *et al.*, 2004; Praveen *et al.*, 2010). Para que el PTGS sea eficiente, la construcción génica empleada debe codificar un fragmento del gen en sentido y otro en antisentido, ambos separados por un intrón, dando lugar a una estructura del RNA en doble cadena complementaria de sí misma (estructura en horquilla o *hairpinRNA* -*ihpRNA*-), con *splicing* final del intrón durante el proceso del pre-mRNA (Waterhouse y Helliwell, 2003). En este trabajo, el PTGS se llevó a cabo mediante transformación con *Agrobacterium tumefaciens* (cepa LBA4404), utilizando el sistema de vectores pKANNIBAL/pART27 (Fig. M13) (Wesley *et al.*, 2001).

M5.1. CONSTRUCCIONES GÉNICAS *ihpRNA*

El sistema de vectores pKANNIBAL/pART27 se utilizó para producir una construcción *ihpRNA* para cada variante alélica *HKT1;1/HKT1;2* de *S.lycopersicum* y *S. cheesmaniae*, de forma similar a como se llevó a cabo para silenciar *SISOS1* (Olías *et al.* 2009a). La construcción para el silenciamiento se obtuvo mediante la clonación en pKANNIBAL de dos fragmentos de PCR de 597 y 477 bp, que codificaban 199 y 159 aminoácidos de *HKT1;1* y *HKT1;2* de tomate respectivamente. Dichos fragmentos se obtuvieron utilizando el cebador *forward* FHKT1-BXi (que contiene sitios de restricción *Bam*HI y *Xho*I) y el *reverse* RHKT1-HKi (que contiene sitios *Hind*III y *Kpn*I) (Tabla M17) en orientación sentido y antisentido (Figs. M13 y M14A). El clonado del producto de PCR en sentido se llevó a cabo unidireccionalmente por los sitios *Xho*I y *Kpn*I, previa digestión del fragmento y el plásmido con ambas enzimas y finalmente ligado al vector pKANNIBAL. La copia antisentido se introdujo posteriormente digiriendo el producto de PCR con *Hind*III y *Bam*HI y ligándolo a los sitios respectivos de pKANNIBAL. La construcción realizada en pKANNIBAL se subclonó como un fragmento *Not*I, que contenía todo el *cassette* de expresión, en el vector binario de expresión de plantas pART27 (Gleave, 1992), bajo el control del promotor constitutivo CAMV35S (Fig. M13), que incluía un gen de resistencia a Kanamicina dentro del T-DNA. Finalmente, el vector con la construcción de silenciamiento fue introducido en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* y se utilizó para transformar ambas NILs (NIL14C y NIL17C) de *S.lycopersicum* cv. Cerasiforme, tal y como se describe en Gisbert *et al.* (2000).

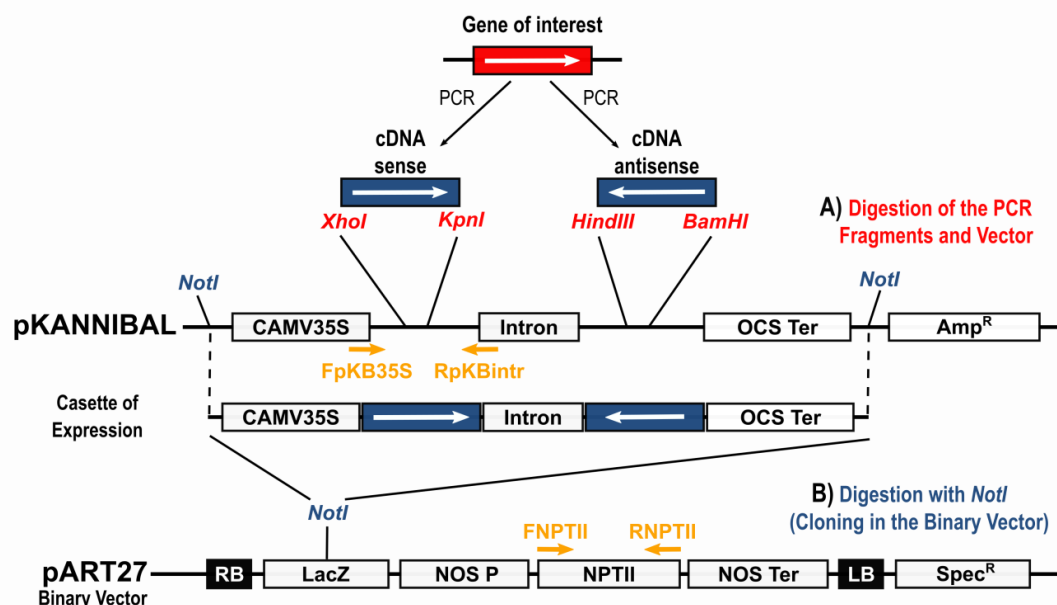


Figure M13. Constructs used to generate stable gene silencing of *Sl/ScHKT1;1* and *Sl/ScHKT1;2*. A) PCR fragments are inserted into pKANNIBAL vector using conventional restriction enzyme digestion and DNA ligation techniques, in the sense orientation into the *XhoI/KpnI* and in the antisense orientation into the *HindIII/BamHI*. B) After digestion with *NotI*, the fragment from pKANNIBAL containing the ihpRNA cassette can then be subcloned into the binary vector pART27. FpKB35S/RpKBintr and FNPTII/RNPTII are the primers used for the diagnostic PCRs to detect the presence of the RNAi constructions (see Table M17). Modified from Wesley *et al.* (2001).

Como se indica en apartado R2.2, las secuencias nucleotídicas de *SlHKT1;2* y *ScHKT1;2* fueron idénticas, mientras que la secuencia de *ScHKT1;1* en NIL 14 presentaba un polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP, del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) en la posición 658, apareciendo una C en lugar de una G (G658C). Este SNP causaba una sustitución en la secuencia aminoacídica correspondiente, cambiando una V por una L en la posición 222 (V222L) de la región hélice transmembrana M1_B en comparación con la de *SlHKT1;1* en NIL17 (Figs. M14A y R1). El alineamiento de los fragmentos de PCR de *HKT1;1* y *HKT1;2* de tomate elegidos para el silenciamiento mostró globalmente un 39.7% de nucleótidos idénticos y un 65% de identidad en la secuencia nucleotídica coincidente (Fig. M14B).

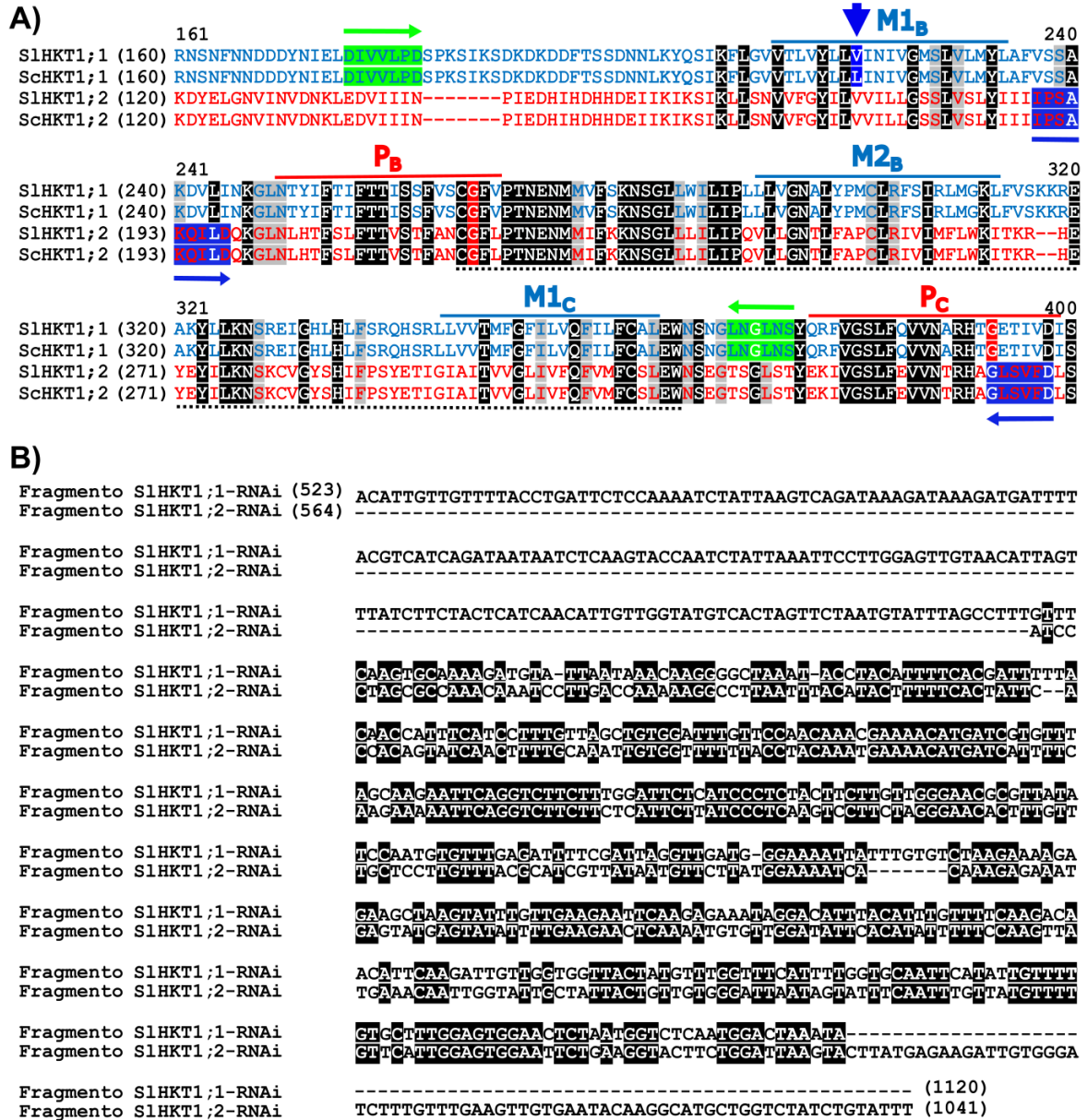


Figure M14. Sequence fragments used for generating RNAi constructs to silence by PTGS the respective allelic variants of *HKT1;1* and *HKT1;2* from *S. lycopersicum* and *S. cheesmaniae*. **A)** Section of the alignment of the amino acid sequence fragments of *Sl/ScHKT1;1* and *Sl/ScHKT1;2*, spanning the first and a part of the second M-P-M domain as previously described (see Fig. 1 in Asins *et al.* -2013-). Here, the *Arabidopsis* HKT1;1 sequence has been removed from that original Fig. 1, so that identical residues are highlighted in black and gray. Green and blue arrows indicate the amino acid sequences (also highlighted) to which forward and reverse primers were designed to obtain their corresponding PCR fragments used for RNAi constructs. **B)** Alignment of respective PCR fragments of *SlHKT1;1* and *SlHKT1;2* used in RNAi constructs. Identical residues are highlighted in black.

M5.2. TRANSFORMACIÓN DE COTILEDONES DE TOMATE

A pesar de la experiencia previa de nuestro laboratorio con los experimentos de transformación genética de variedades de tomate convencionales, Moneymaker (Olías *et al.*, 2009a) o Microtom (Huertas *et al.*, 2012), se llevaron a cabo numerosos ensayos de transformación genética con las construcciones génicas de silenciamiento de *HKT1* en las

líneas NILs de la var. Cerasiforme, que resultaron infructuosos, probablemente debido a la peculiaridad genética de los genotipos implicados (comunicación personal, Dr. Vicente Moreno). De ahí que se recurriera a la amplia experiencia del **Grupo de Cultivo *in vitro* y Mejora Vegetal del Instituto Universitario de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universidad Politécnica de Valencia-CSIC**, liderado por el **Prof. Vicente Moreno**, para llevar a cabo dichos ensayos en una estrecha colaboración científica con nuestro laboratorio. Dicho grupo llevó a cabo la generación de las líneas transformantes primarias T₀ con las construcciones de silenciamiento desarrolladas en este trabajo (Apartado M5.1). Una vez generadas dichas líneas, su mantenimiento, genotipado, propagación *in vitro* y obtención de las sucesivas generaciones, así como su fenotipado se llevaron a cabo en nuestro laboratorio, constituyendo un objetivo esencial de este trabajo de Tesis Doctoral.

Por tanto, aunque la transformación genética se llevara a cabo con éxito en el laboratorio del Dr. Vicente Moreno, a continuación se describe dicho procedimiento en detalle, siendo éste prácticamente idéntico al seguido en nuestro laboratorio. La inclusión de este procedimiento aquí se justifica por el intenso esfuerzo, aunque fallido, dedicado a este tipo de ensayos durante esta Tesis Doctoral. Para la transformación de cotiledones de tomate se siguió básicamente el método descrito por Ellul *et al.* (2003). Los cotiledones, obtenidos de las semillas germinadas *in vitro* (Apartado M1.3.1) (Fig. M15A), se separaron del resto de la plántula y se seccionaron transversalmente en tres segmentos (Fig. M15B) utilizando un bisturí. Los segmentos se incubaron en medio de precultivo (PCM) (Tabla M25), situando la parte adaxial del cotiledón en contacto con el medio, y a razón de 24 fragmentos por placa Petri de 9 cm (Fig. M15C). Después de dos días de precultivo en oscuridad, se llevó a cabo el cocultivo con la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* transformada con las construcciones para el silenciamiento de los genes *Sl/ScHKT1;1* y *Sl/ScHKT1;2* (Apartado M5.1).

El cultivo de los segmentos de cotiledones con *A. tumefaciens* (24 segmentos de cotiledón por cada 30 ml de cultivo bacteriano) se llevó cabo en medio CCM desprovisto de agar (Tabla M25 y Fig. M15D) y suplementado con 200 µM de acetosiringona, a fin de favorecer la infección de los cotiledones. El cocultivo se realizó durante 20 minutos, a 26 °C y en agitación orbital a 200 rpm. Trascurrido este tiempo, los cotiledones se recogieron por filtración y se secaron cuidadosamente entre láminas de papel de filtro estéril, con el fin de eliminar las bacterias que pudieran haber quedado adheridas a la superficie de los cotiledones. Los explantos se transfirieron entonces a placas Petri conteniendo CCM sólido (Tabla M25), donde se incubaron 2 días en oscuridad, a 26 °C. Tras esta incubación se llevó a cabo el lavado de los cotiledones en solución WM (Tabla M25), para eliminar las células de *A. tumefaciens*. Después de dos lavados de 15 minutos a temperatura ambiente, los fragmentos de cotiledones se filtraron, se secaron con papel de filtro estéril y se transfirieron primeramente a medio de caulogénesis (SIM-NS y SIM-K) y, posteriormente, a un medio de rizogénesis (RM-K) a fin de regenerar plantas completas (Tabla M25).

M5.3. REGENERACIÓN DE PLANTAS A PARTIR DE LOS COTILEDONES TRANSFORMADOS.

Para inducir la formación de tallos, los fragmentos de cotiledón cultivados con *A. tumefaciens* se incubaron en placas Petri conteniendo medio SIM no selectivo (SIM-NS) (Tabla M25) durante 48 horas, a 24 °C/18 °C, día/noche, iluminación de 140 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 16 horas de luz/ 8 horas de oscuridad y humedad relativa del 40-50 % y, posteriormente, en SIM selectivo (SIM-K) (Tabla M25 y Fig. M15E) en las mismas condiciones anteriores.

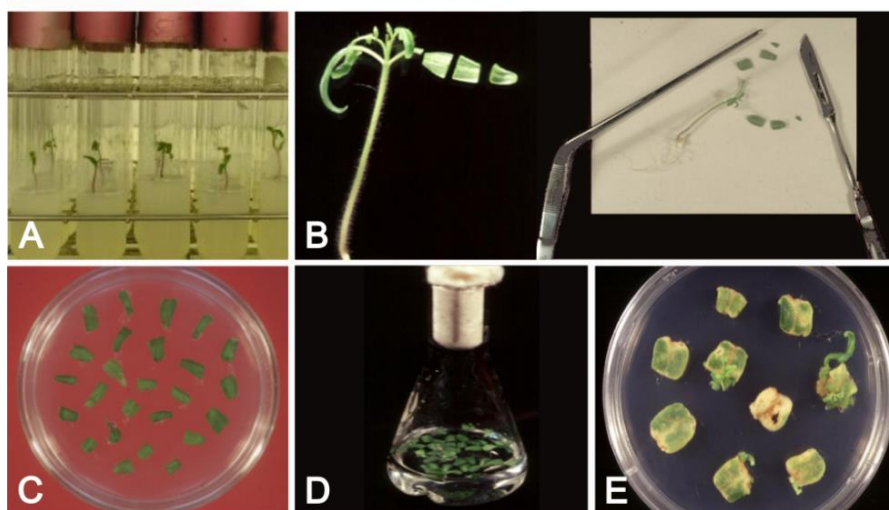


Figure M15. Transformation of tomato cotyledons. A) Tomato seedlings obtained from seeds germinated *in vitro* in GM medium. B) Sectioning cotyledons in three segments. C) Cultivation of segments of isolated cotyledons from seedlings grown *in vitro* in a Petri dish with PCM medium. D) Cocultivation of segments of cotyledons and *Agrobacterium* in CCM medium. E) Culture of transformed cotyledon segments in organogenesis medium and selection of transformants (SIM-K).

A partir de los cotiledones transformados, se observó la formación de callos verdes en la zona de corte del cotiledón después de aproximadamente 2 semanas de cultivo en medio de inducción de tallos (SIM-K) (Tabla M25 y Fig. M16A). Estos cotiledones con callos se subcultivaron en medio de inducción de tallos cada 3 semanas, detectándose la formación de tallos hasta tres meses después del inicio del cultivo en este medio (Figs. M16B y M16C). Se observó que por cada explanto se inducían de uno a tres tallos independientes.

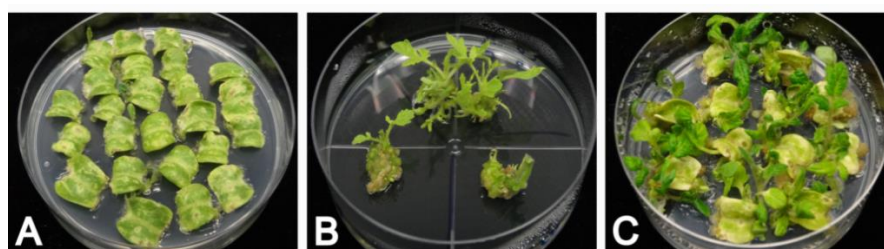


Figure M16. Regeneration of stems from transformed cotyledons of tomato in Petri dishes with SIM-K medium. A) Callus formation. B) Emergence of the first shoots. C) Elongation of the stems.

Transcurridas 8-9 semanas desde el inicio de la formación de los tallos (aproximadamente tres subcultivos en medio de inducción de tallos) y una vez iniciada la elongación de los mismos (Fig. M16C), éstos eran transferidos a botes de cultivo que contenían medio de enraizamiento RM-K (Tabla M25), previa separación del callo a partir del cual se originaron. La formación de las raíces comenzaba tras aproximadamente 20 días de cultivo en este medio (Fig. M17A). Después de aproximadamente 4 semanas, las raíces presentaban un desarrollo adecuado para permitir el crecimiento *ex vitro* de la plántula (Figs. M17B y M17C). En este momento, las plántulas se transferían a macetas de 0.75 litros que contenían fibra de coco, en las que quedaban protegidas por un vaso de plástico para mantener el 100% de humedad (Fig. M18A). Los vasos de plástico se mantuvieron hasta que la propia planta los levantó con su crecimiento, momento en el cual dichas plantas se transferían a macetas de 3 litros de capacidad con fibra de coco (Fig. M18B) y se cultivaban en un invernadero hasta la producción de frutos para la extracción de sus semillas (Fig. M18C).



Figure M17. Induction of *in vitro* rooting in culture vessels with RM-K medium. A) Formation of the first roots. B) Front view of a plant with developed roots, allowing the growth *ex vitro*. C) Side view of a plant with developed roots, allowing *ex vitro* growth.



Figure M18. Cultivation of tomato plants regenerated from transformed cotyledons in pots with cocopeat. A) Regenerated seedlings, transferred to 0.75 liter pots with cocopeat, covered with plastic cups to maintain 100% humidity B) Tomato plants transferred to 3 liter pots with cocopeat, growing in a greenhouse under the same conditions previously mentioned (Fig. M1). C) Tomato plants in stage of production and collected fruits to extract the seeds.

Table M25. Composition of the culture media used in the tomato transformation experiments.
The quantities are referred to one liter of medium.

	GM	PCM	CCM	WM	SIM-NS	SIM-K	RM-K
Macro and micronutrients (MS)	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
Sacarose (g)	10	30	30	20	30	30	20
Myo-inositol (mg)	-	100	100	100	100	100	100
SH Vitamins (ml)	-	10	10	-	10	10	-
IAA (mg)	-	4	4	-	4	4	0.1
Kinetin (mg)	-	4	4	-	4	4	-
Zeatin (mg)	-	-	-	-	1	1	-
Kanamycin (mg/ml)	-	-	-	-	-	100	100
Cefotaxime (mg)	-	-	-	600	400	300	-
Acetosyringone (μM)	-	-	200	-	-	-	-
Agar (g)	8	8	8	-	8	8	8

MS: (Murashige & Skoog, 1962)

GM: Germination Medium

PCM: Pre-Culture Medium

CCM: Co-Culture Medium

SH Vitamins: Vitamins from Shahin (1985)

WM: Washing Medium

SIM: Stems Induction Medium

NS: Non-Selective

K: Selective (Kanamycin 100 μg/ml)

RM: Rooting Medium

M5.4. SELECCIÓN DE LÍNEAS SILENCIADAS DE TOMATE (GENOTIPADO, SEGREGACIÓN Y OBTENCIÓN DE LÍNEAS HOMÓZIGOTAS)

Se generaron al menos 10 transformantes primarios independientes para cada construcción de *RNAi*, tanto de NIL14 como de NIL17 y su nivel de ploidía fue analizado por citometría de flujo por el grupo del Prof. Vicente Moreno (IBMCP) como se ha descrito previamente (Ellul *et al.* 2003). Para detectar la presencia de la construcción de *RNAi* se utilizaron únicamente las plantas diploides de tomate generadas en cada proceso de transformación independiente (T_0) (Tabla M6), que fueron analizadas por PCR, utilizando los oligos específicos de pKANNIBAL (flanqueando el fragmento de cDNA sentido), y los oligos específicos del gen *NPTII* (Tabla M17, Fig. M13 y Apartado R2.4.1) y DNA genómico obtenido a partir de hojas de las líneas transformantes de tomate (ver Apartado M3.1.1). Sólo las plantas que mostraban bandas de PCR para ambas parejas de oligos fueron consideradas como transgénicas positivas. Varias plantas T_0 positivas fueron seleccionadas para estudiar los patrones de expresión de *Sl/ScHKT1;1* y *Sl/ScHKT1;2* mediante RT-qPCR, utilizando parejas de oligos específicas de *HKT1;1* y *HKT1;2* de tomate (Tabla M20) y RNA total aislado de tres muestras biológicas diferentes (raíz y hoja de plantas generadas *in vitro*, así como hojas de plantas T_0 aclimatadas que se cultivaron

en macetas, utilizando fibra de coco como sustrato inerte). Estas líneas T₀, con una expresión reducida para cada variante alélica y sus respectivas semillas T₁ obtenidas mediante auto-polinización, fueron seleccionadas para realizar ensayos fenotípicos exhaustivos en condiciones salinas. Varias líneas T₁ independientes con una sola inserción de la construcción de *RNAi* para cada variante alélica de HKT1 fueron seleccionadas (Tabla M7) en base a su segregación por resistencia a Kanamicina (apartado M5.4.1), obedeciendo a un patrón de herencia monogénico y dominante, típico de esta estrategia de genética reversa (3*RNAi*-KanR:1Wt) (Wesley *et al.* 2001; Olías *et al.* 2009a), cuya progenie consiste en plantas 1/4 homocigotas, 2/4 hemizigotas (ambas portadoras de la construcción de *RNAi*) y 1/4 azigotas (Wt).

Por último, para la realización de los ensayos de fenotipado, las plantas azigotas de la progenie T₁ fueron eliminadas después de evaluar la presencia o ausencia de las construcciones de *RNAi*, mediante PCR diagnóstica, utilizando los oligos específicos FNPTII y RNPTII en plantas individuales, los cuales amplifican un fragmento de 800 bp de la secuencia codificante para el gen *NPTII*, que confiere resistencia a la Kanamicina (Tabla M18, Fig. M13 y Fig. R18). Como molde se utilizó DNA obtenido a partir de cotiledones de plántulas de tomate mediante un método de preparación rápida de DNA para análisis por PCR (Apartado M3.1.1) (Kasajima *et al.*, 2004).

M5.4.1. Test de segregación y obtención de líneas homocigotas

Las diferentes líneas T₀, genotipadas como en el apartado M5.4, cultivadas en macetas con fibra de coco se sometieron a autofecundación para producir la segunda generación de transformantes (progenie T₁). Para confirmar la existencia de un único lugar de inserción, las semillas se sembraron en botes de cultivo con medio GM que contenían el antibiótico de selección (en nuestro caso Kanamicina). Antes de ello, se determinó previamente la concentración adecuada de Kanamicina mediante ensayos de germinación en presencia de 50, 75 y 100 µg/ml de Kanamicina. Se comprobó que cuando se adicionaba al medio de germinación 50 y 75 µg/ml de Kanamicina, las semillas de plantas no transformadas germinaban y daban lugar a plántulas que crecían *in vitro*. Sin embargo, cuando el medio de germinación era suplementado con 100 µg/ml de Kanamicina, si bien algunas semillas germinaban, no se observaba la formación de hojas en ninguna de las plantas no transformadas (Fig. M19). Por ello, este test de segregación se realizó germinando semillas de la T₁ de cada línea en medio GM suplementado con 100 µg/ml de Kanamicina, utilizándose la prueba Chi-cuadrado (χ^2) con un margen de error del 5%. Los datos se procesaron a través del programa *Microsoft Excel*. Aquellas líneas que superaban el 75% de supervivencia en antibiótico indicaban que había más de un locus de inserción.

Puesto que cada progenie de la T₁ diploide con una sola inserción se compone de 1/4 homocigotas, 2/4 hemizigotas (ambas portadoras de la construcción de *RNAi*) y 1/4 azigotas (Wt), se cultivaron como mínimo 12 plantas de cada línea de la T₁, para así obtener al menos 3 plantas que pudieran dar lugar a una progenie homocigota en la

siguiente generación. Las plantas crecieron inicialmente en semilleros que contenían fibra de coco (Apartado M1.3.1) y posteriormente se transplantaron a macetas de 3 litros (Fig. M18B), manteniéndose en invernadero y regándose cada 2-3 días con solución nutritiva Hoagland 1/4x, siendo sometidas a autofecundación. En todos los casos se evitó la fecundación cruzada, separando unas macetas de otras, aproximadamente medio metro y favoreciendo la autofecundación mediante el depósito de polen de cada flor sobre los estigmas de la misma planta, con ayuda de un pincel. La progenie de cada planta fue sometida a un test de segregación en Kanamicina. Una proporción de 100% de semillas resistentes a kanamicina de la progenie T₂ de cada planta permitía conocer la condición homocigota de la planta de procedencia.

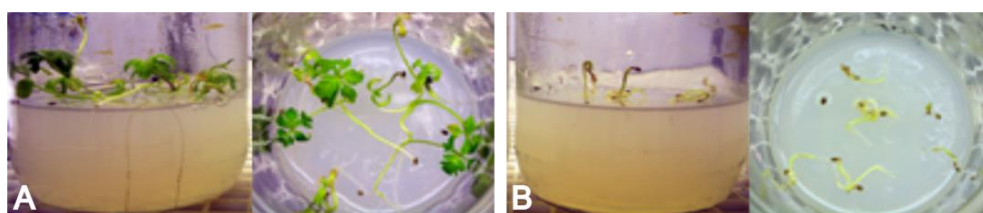


Figure M19. Germination of non-transformed tomato seeds (NIL17 C). A) Seeds germinated in GM medium supplemented with 50 µg/ml of Kanamycin. B) Seeds germinated in GM medium supplemented with 100 µg / ml of Kanamycin.

Al tiempo de la realización de los diferentes ensayos de este trabajo no fue posible trabajar con plantas T₂ homocigotas, dado que el tiempo requerido para obtenerlas superaba el tiempo necesario para llevar a cabo la presente tesis. De ahí, que se utilizaran plantas T₁ positivamente genotipadas para la inserción, tal y como se había descrito previamente en este mismo apartado.

M5.5. RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE SEMILLAS DE PLANTAS TRANSFORMADAS.

Se recolectaron los frutos maduros, que crecieron aproximadamente 3 meses después de la germinación de las semillas (Fig. M18C). Se separaron las semillas de la pulpa del tomate y se mantuvieron durante 1 hora en un vaso de cristal con una solución 1/10 de ácido clorhídrico comercial (sulfumán). Después de este tiempo se lavaron en agua destilada y se secaron entre láminas de papel de filtro durante dos días en oscuridad. A continuación, las semillas se transfirieron a tubos Falcon® de plástico de 10 ml que se almacenaron a 4 °C, en oscuridad y protegidas de la humedad hasta su uso.

M6. GENÉTICA REVERSA EN ARABIDOPSIS MEDIANTE MUTAGÉNESIS INSERCIONAL DE T-DNA EN EL GEN *AtHKT1*

Para realizar estudios funcionales comparativos de los genes *HKT1* de tomate y su homólogo de *Arabidopsis*, el gen *AtHKT1;1*, en relación al transporte de Na⁺ a larga distancia y en la tolerancia de *Arabidopsis* a la salinidad, se utilizaron semillas T₁ de dos mutantes insercionales *athkt1;1* distintos (GK-386D05 y GK-795G10), producidos mediante inserciones de T-DNA en el plásmido pAC161, en un fondo genético Columbia (Col.0).

Dichas semillas pertenecían a la colección GABI-Kat (<https://www.gabi-kat.de/>) y fueron proporcionadas por el NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Center*).

La mutagénesis insercional es un método utilizado para inducir la disrupción de la función génica que se basa en la inserción de DNA exógeno en el gen de interés. En el caso de *Arabidopsis*, este DNA puede ser un transposón (Sundaresan *et al.*, 1995; Radhamony *et al.*, 2005) o T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* (Krysan *et al.*, 1999). Una de las ventajas de usar T-DNA como mutágeno insercional en comparación con los transposones es que las inserciones de T-DNA no se desplazan en el genoma y son química y físicamente más estables a través de múltiples generaciones. Además, el T-DNA no sólo disminuye la expresión del gen en el que se inserta, sino que actúa como marcador para la identificación de la mutación.

M6.1. INSERCIONES DE T-DNA

La integración de T-DNA en el genoma de plantas como *Arabidopsis* resulta en mutaciones estables que pueden alterar la función génica. Desde que la secuencia del genoma de *Arabidopsis* se completó en el año 2000 (*The Arabidopsis Genome Initiative*, 2000) se han establecido varias colecciones de líneas de *A. thaliana* que contienen inserciones de T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* en su genoma. GABI-Kat es la segunda colección más grande de estas líneas mutantes de *Arabidopsis* en todo el mundo (Kleinboelting *et al.*, 2012b).

Una estrategia común para determinar la posición de una inserción de T-DNA en el genoma de una línea mutante es generar Marcadores de la Secuencia Flanqueante o FSTs (del inglés *Flanking Sequence Tags*). Utilizando métodos basados en la PCR, los fragmentos de DNA genómico que flanquean el T-DNA se amplifican, se secuencian y posteriormente se asignan al genoma (Kleinboelting *et al.*, 2015). De esta forma, en el caso de la colección GABI-Kat, los FSTs predichos para los sitios de inserción del T-DNA se confirman mediante PCR con los cebadores fronterizos y los cebadores específicos de predicción del sitio de inserción (Fig. M20A y Tabla M18).

Las líneas mutantes de *Arabidopsis* utilizadas en este trabajo se generaron mediante transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. El T-DNA de *Agrobacterium* está flanqueado por dos secuencias que tienen una longitud de 25 pares de bases y son similares entre sí. Estas secuencias fueron denominadas “Borde Izquierdo” (LB, *Left Border*) y “Borde Derecho” (RB, *Right Border*) (Figs. M20A y M20B). Actualmente se sabe que es posible sustituir toda la secuencia entre el LB y el RB sin que la habilidad del T-DNA de integrarse en el genoma de las plantas se vea afectada, característica que permite al T-DNA ser una herramienta molecular de gran utilidad (Wang *et al.*, 1984; Peralta y Ream, 1985). Estas líneas portan el vector binario pAC161, con número de acceso AJ537514 en GenBank®. Dicho vector contiene el ORF de *SUL1*, que confiere resistencia al herbicida Sulfadiazina (Fig. M20B), haciendo posible la selección de plantas transformantes (ver Apartado M6.2). Además, el vector pAC161 contiene el ORF *SUL^R*, aportado por el promotor 1'-2'. El promotor 35S o promotor del virus del mosaico de la

coliflor (35S Cauliflower Mosaic Virus -35SCaMV-), ubicado en el RB, puede actuar como un elemento de activación después de la integración de T-DNA. El T-DNA utilizado en la mayoría de las líneas GABI-Kat contiene 5799 pares de bases (Fig. M20).

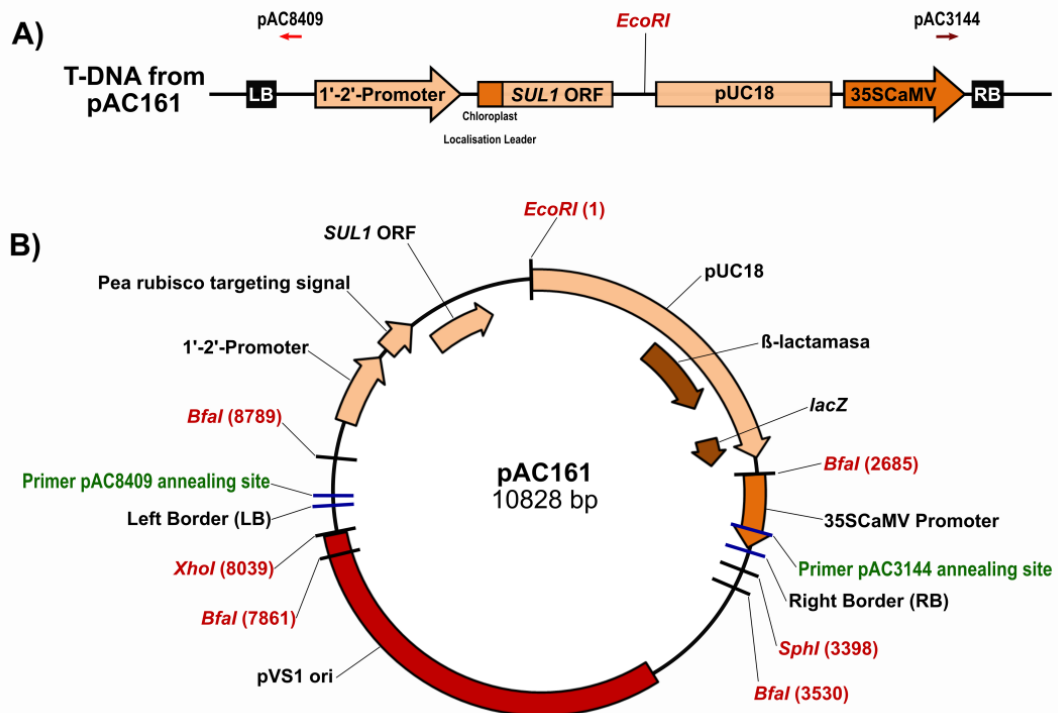


Figure M20. Binary transformation vector pAC161 (accession number AJ537514) containing the T-DNA used in the generation of the GABI-Kat lines. A) Insertion of T-DNA of plasmid pAC161 and primers used for its detection. B) Plasmid map of the binary vector pAC161 (10828 bp), containing the 5799 bp T-DNA used in the generation of the majority of GABI-Kat lines. Structural parts and relevant restriction sites of the vector are marked. Modified from Stracke *et al.* (2010).

M6.2. SELECCIÓN DE MUTANTES DE ARABIDOPSIS (GENOTIPADO, SEGREGACIÓN Y OBTENCIÓN DE LÍNEAS HOMOZIGOTAS)

La selección de las líneas mutantes de *Arabidopsis* utilizadas en este trabajo se llevó a cabo sembrando al menos 30 semillas (T₁) de cada una de las diez líneas mutantes iniciales (Tabla M10) en placas de Petri redondas con medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 5.25 mg/l de Sulfadiazina (Fig. M21). Además, se sembraron 30 semillas WT ecotipo Columbia (Col. 0) en una placa con medio MS con Sulfadiazina en la concentración indicada previamente (Fig. M22A, control negativo) y otras 30 en una placa con medio MS sin Sulfadiazina (Fig. M22B, control positivo).

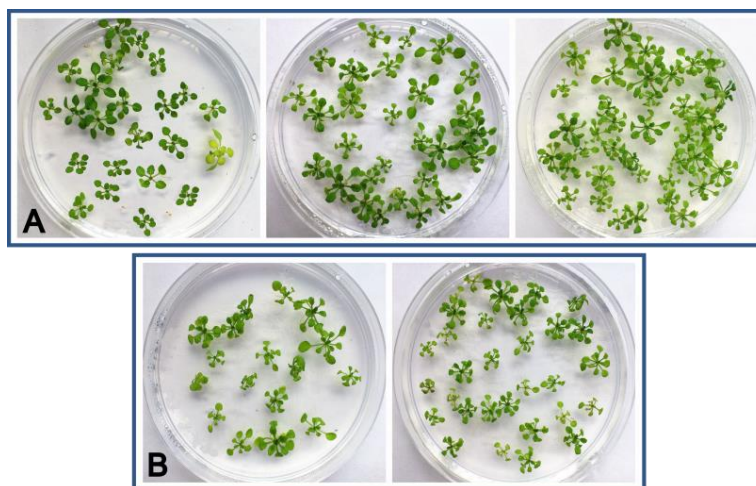


Figure M21. T₁ seedlings of *Arabidopsis* germinated in 9 cm diameter Petri dishes with MS medium supplemented with sulfadiazine (5.25 mg/l). **A)** Lines that belong to the mutant GK-386D05. From left to right, GK3-L1, GK3-L4 and GK3-L5. **B)** Lines belonging to the mutant GK-795G10. From left to right, GK7-L3 and GK7-L5.

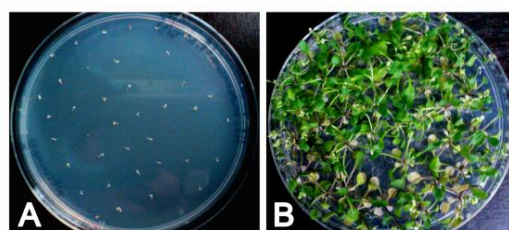


Figure M22. Germination of WT *Arabidopsis* seeds (Col.0) growing in 9 cm diameter Petri dishes with MS medium. **A)** Seeds germinated in MS medium supplemented with 5.25 mg/l of Sulfadiazine (negative control). **B)** Seedlings growing in MS medium without Sulfadiazine (positive control).

Tras 5-7 días se hicieron recuentos de plántulas sensibles y plantas resistentes a la Sulfadiazina, utilizando la prueba Chi-cuadrado (χ^2) con un margen de error del 5% para comprobar si la progenie se ajustaba a un patrón de herencia monogénico y dominante (3Sul^R:1Sul^S) (Wesley *et al.*, 2001). Las plántulas resistentes a Sulfadiazina se pasaron a semilleros con turba:vermiculita (1:1) y se esperó a que alcanzaran un porte adecuado para poder realizar una extracción de DNA sin causar daños irreversibles a las plantas (aproximadamente 7 días). A continuación se extrajo DNA genómico de una hoja de roseta de todas las plantas, siguiendo el protocolo de extracción rápida de DNA descrito por Kasajima *et al.* (2004). Para detectar la presencia de la inserción de T-DNA y comprobar si dicha inserción estaba presente en homocigosis o hemizigosis, las muestras de DNA de hoja de roseta se analizaron mediante PCR, utilizando el oligonucleótido específico del borde izquierdo del T-DNA (Left Border Primer -LBP-, pAC8409) combinado con los oligonucleótidos específicos del gen de interés (Gene Specific Primers -GSP-, FGK1/RGK1 y FGK2/RGK2), en nuestro caso *AtHKT1;1* (Tabla M18). Se realizaron tres reacciones de PCR diferentes: la primera de ellas, utilizando únicamente los oligonucleótidos específicos del gen, FGK1/RGK1 o FGK2/RGK2, dependiendo del mutante de procedencia (GSP Forward y Reverse). Esta PCR se utilizó como reacción

control, dando banda únicamente cuando alguna copia del gen estaba presente. En las plantas homocigóticas para la inserción de T-DNA no tendríamos banda, ya que el fragmento sería demasiado grande como para ser amplificado. La segunda reacción combinaba el GSP Reverse (RGK1 o RGK2) con el LBP (pAC8409) y la tercera, el GSP Forward (FGK1 o FGK2) con el LBP (pAC8409) (Fig. M23). Con estas reacciones sólo se obtendría banda en el caso de que el T-DNA estuviera presente y orientado con el LB hacia la izquierda. De esta forma, las líneas mutantes homocigóticas para la inserción de T-DNA se diferenciarían de las mutantes heterocigóticas en que las primeras no amplificarían con los oligos específicos del gen.

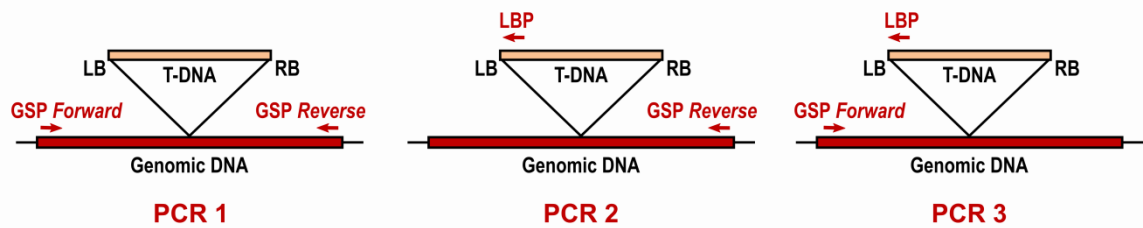


Figure M23. Genotyping of the T-DNA insertion mutant lines of *Arabidopsis thaliana*. PCR 1 (carried out using the primers FGK1/RGK1 or FGK2/RGK2, depending on the mutant line) was used as a control reaction, showing amplification in WT (Col. 0) and heterozygous lines, but not in homozygous lines. PCR 2 was carried out with the left border T-DNA primer pAC8409 and a reverse *AtHKT1* gene specific primer (RGK1 or RGK2) and PCR 3, using the left border T-DNA primer pAC8409 and a forward *AtHKT1* gene specific primer (FGK1 or FGK2).

Únicamente las plantas que presentaban un patrón de bandas característico de la inserción de T-DNA en homocigosis fueron consideradas mutantes positivas y se seleccionaron para extraer las semillas que se utilizaron en posteriores ensayos. Se recogieron semillas de al menos 5 plantas positivas de cada mutante. Con las semillas procedentes de dichas plantas (T₂), se realizó un estudio de segregación, sembrando nuevamente estas semillas en placas de Petri redondas con medio MS suplementado con sulfadiazina (5.25 mg/l) y comparando el número de semillas sembradas con el número de plántulas germinadas. Aquellas líneas que presentaban un porcentaje de germinación igual o superior al 75% de supervivencia tendrían más de un locus de inserción. Unas 12 plantas de cada línea T₂ resistente con inserción única se pasaron a turba:vermiculita (1:1) y fueron sometidas a autofecundación para dar lugar a la tercera generación (T₃). La proporción de semillas 100% resistentes a sulfadiazina en la T₃ nos permitió conocer la condición homocigota/heterocigota de la planta originaria. De esta forma, se seleccionaron 5 líneas homocigotas (Tabla M11) que se utilizaron para llevar a cabo los correspondientes ensayos de expresión (RT-qPCR) y de fenotipado de tolerancia a estrés salino.

M6.3. RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE SEMILLAS

Tras realizar los estudios de segregación de mutantes T₂ de *A. thaliana*, se procedió a la recolección de semillas para su utilización en posteriores ensayos. Para ello, las semillas procedentes de líneas homocigotas se sembraron directamente en semilleros que

contenían turba:vermiculita (1:1) y se vernalizaron durante tres días en oscuridad y a 4 °C. Transcurrido este tiempo, las semillas que habían germinado se dejaron crecer hasta que se produjo la fructificación, momento en el cual las plantas se separaron individualmente con bolsas de papel y se recolectaban las semillas. Para ello se utilizó un tamiz normalizado, con malla de acero inoxidable (ISO 3310/1) de 0.5 mm de luz. Las semillas recogidas se guardaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y se conservaron a 4 °C, en oscuridad y protegidas de la humedad hasta su próximo uso.

M7. EVALUACIÓN DE FENOTIPOS

M7.1. DETERMINACIÓN DEL PESO FRESCO Y PESO SECO

M7.1.1. Determinación del peso fresco y peso seco en plantas de tomate

En el caso de las plantas de tomate, se recolectaron muestras de tejido procedentes de hojas y tallos (cultivo en maceta y placa de Petri) y hojas, tallos y raíces (cultivo en hidropónico) de cada planta después de los tratamientos salinos. Inmediatamente después de su recolección, se pesaron en una balanza de precisión para determinar el peso fresco. A continuación, las muestras de tejido se lavaron cuatro veces consecutivas con agua destilada para eliminar la sal adherida a la superficie de los tejidos y posteriormente se escurrieron y se secaron con papel de filtro. Luego se secaron en un horno a 80 °C, metidas en sobres realizados con papel de filtro durante al menos 48 h para determinar el peso seco. Las muestras secas de tejido se trituraron con ayuda de un molinillo eléctrico o de un mortero y pistilo y se guardaron en tubos Falcon® de plástico de 10 ml. Parte de este material (0.1 g de cada muestra), se recogió en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se mandó a analizar su contenido iónico (ver Apartado M7.2).

M7.1.1. Determinación del peso fresco y peso seco en plantas de *Arabidopsis*

En el caso de las plantas de *Arabidopsis*, se recolectaron muestras de tejido procedentes de la parte aérea completa (cultivo en semilleros) y de plántulas completas (cultivo en placa de Petri) de todas las plantas después del tratamiento salino y se pesaron en una balanza de precisión para determinar el peso fresco. A continuación, las muestras se lavaron cuatro veces consecutivas con agua destilada y se secaron en papel de filtro. Al igual que ocurría en el caso del tomate, las muestras se secaron en la estufa a 80 °C metidas en sobres de papel de filtro y se pesaron nuevamente para determinar el peso seco. Las muestras secas de tejido se trituraron con ayuda de un mortero y un pistilo y se guardaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml para la posterior determinación del contenido iónico.

M7.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN SODIO Y POTASIO

Tanto en el caso de plantas de tomate como en el caso de plantas de *Arabidopsis* se recogieron muestras de 0.1 g de material vegetal previamente secado y triturado (en el caso de haber tejido suficiente), o bien de un peso inferior, que fueron digeridas en una solución de HNO₃:HClO₄ (2:1 v/v). El contenido en Na⁺ y K⁺ se determinó en el Servicio

de Instrumentación Científica (SIC) de la Estación Experimental de Zaidín (Granada), mediante espectrometría de emisión óptica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo, en un equipo *Varian ICP-720E* (ICP-OES, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*).

M8. LOCALIZACIÓN TISULAR DE LA EXPRESIÓN DE GENES *HKT1* DE TOMATE

M8.1. TÉCNICA DE PCR *IN SITU*

La PCR *in situ* es un método de localización celular semi-cuantitativo que se utiliza para detectar mRNA directamente en los tejidos de la planta, incorporando nucleótidos marcados que se detectan posteriormente mediante inmunohistoquímica (colorimetría o fluorescencia). Para aprender esta técnica se realizó una estancia breve (EEBB-I-2014-08682) financiada por el MINECO en el *Australian Centre for Plant Functional Genomics* de la **Universidad de Adelaida (Australia)**, bajo la supervisión del **Prof. Matthew Gilliam**.

La localización de los genes de tomate que codifican tanto a los transportadores HKT1;1, HKT1;2 y SOS1, así como a la proteína soluble Factor de Elongación 1 α (LeEF1- α), utilizada como control positivo, se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Athman *et al.* (2014), cuyos principales pasos se resumen en la Fig. M24 (en nuestro caso se siguieron únicamente los pasos para secciones normales). En resumen, se recogieron tejidos de hoja y raíz de NIL14 C y NIL17 C utilizando una microtijera recta y se colocaron en una placa de Petri estéril. Con ayuda de un bisturí, se cortaron las hojas en trozos cuadrados de 3 x 5 mm, asegurándonos de que los cortes incluían el nervio central (de esta forma las muestras fueron más consistentes y se evitaron posibles roturas del tejido en pasos sucesivos). Las raíces se cortaron en piezas de 5 mm de largo, haciendo cortes perpendiculares al eje de la raíz. Se cortaron aproximadamente unos 12 trozos de hoja y unas 32 piezas de raíz en cada cosecha de material (Fig. M24A).

Utilizando un pincel suave, se transfirieron las piezas de hojas y de raíces rápidamente a tubos de microcentrífuga de 2 ml que contenían 1.8 ml de fijador (etanol al 63% -v/v-; ácido acético al 5% -v/v- y formaldehído al 2% -v/v-), que se agitaron cuidadosamente tres veces por inversión para asegurarnos de que las muestras se encontraban completamente sumergidas en el fijador. A continuación, las muestras se sometieron a dos infiltraciones al vacío de 400 mm Hg durante 1.5 minutos, tras las cuales se incubaron en el fijador durante 3-4 horas en oscuridad y a 4 °C, cambiando el fijador cada hora en el caso de las hojas, o durante 12 horas en oscuridad y a 4 °C en el caso de las raíces (Fig. M24B).

Las muestras se lavaron tres veces durante 10 minutos en 1.8 ml de solución de lavado 1 (etanol al 63%/ácido acético al 5%) y otras tres veces durante 3 minutos en 1.8 ml de PBS 1x (*Phosphate Buffered Saline* -137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄ y KH₂PO₄, ajustado a pH 7.4 con HCl-) y a continuación se incluyeron en agarosa fundida al

5% en el caso de las hojas o en agarosa de bajo punto de fusión al 5% (w/v) en el caso de las raíces, utilizando una placa estéril de 12 pocillos. Para ello se rellenaron los pocillos hasta la mitad con la agarosa fundida y con ayuda de un pincel suave, se transfirieron las piezas de tejido al pocillo con agarosa, asegurándonos de que éstas quedasen completamente sumergidas. Se incluyeron unas 3 piezas por pocillo en el caso de las hojas y unas 8 piezas por pocillo en el caso de las raíces, preparando un total de 4 pocillos por cada tipo de muestra (Fig. M24C).

Las placas se sellaron utilizando parafilm y se almacenaron a 4 °C hasta que la agarosa solidificó por completo (como mínimo unas 3 horas). A continuación, con ayuda de un bisturí se cortó un pequeño bloque de agarosa de uno de los pocillos de la placa, con cuidado de no cortar el tejido incluído, y se pegó con un adhesivo de fraguado rápido (*Super Glue-3 Gel*, Loctite) en la placa magnética de un vibratomo VT1200 *Vibrating Blade Microtome* (Leica). Se realizaron secciones de 60-70 µm en las muestras de hoja o de 50 µm en las muestras de raíz y se recolectaron en tubos de PCR de 0.2 ml (un tubo por cada tipo de muestra, incluyendo los controles) que contenían 85µl de agua Milli-Q® estéril y 2.5 µl de *RNaseOUT* (Invitrogen) (Fig. M24D).

A continuación se realizó un tratamiento con DNasa, añadiendo 10 µl de 10x *Turbo DNA-free Buffer* (Ambion) y 2.5 µl de *DNase I* (Quiagen) a cada tubo para dar un volumen final de 100 µl. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 45 minutos en un termociclador *Mastercycler personal* (Eppendorf) (Fig. M24E). Con ayuda de una pipeta de 200 µl se extrajo cuidadosamente la solución de DNasa y se desechó, lavando dos veces durante 1 minuto con 150-200 µl de agua Milli-Q® estéril enfriada a 4 °C y eliminando posteriormente de los tubos la mayor cantidad de agua posible. A continuación se llevó a cabo una reacción de transcripción reversa (RT) en dos pasos, añadiendo en primer lugar 10 µl de agua Milli-Q® estéril, 2 µl de dNTPs 10 mM y 1 µl de oligonucleótido *reverse* en cada uno de los tubos, incubando esta mezcla durante 5 minutos a 65 °C y manteniendo a 4 °C durante al menos 1 min. Posteriormente se añadió a cada tubo 7 µl de una solución de reacción de RT previamente preparada, utilizando *Thermoscript RT Kit* (Invitrogen), tal y como aparece en la Tabla M26 (Fig. M24F).

Table M26. RT reaction solution.

COMPONENT	STOCK CONC.	FINAL CONC.	µl / TUBE (1X)
cDNA Synthesis Buffer (Kit)	5x	1x	4
DTT (Kit)	0.1 M	5 mM	1
RNase OUT (Kit)	40 U/µl	40 U	1
Thermoscript RT (Kit)	15 U/µl	15 U	1

Utilizando una pipeta de 200 µl se retiró cuidadosamente la reacción de RT de cada tubo, lavando las secciones dos veces durante 1 minuto en 150-200 µl de agua Milli-Q® estéril fría y eliminando posteriormente de los tubos la mayor cantidad de agua posible. Se añadieron entonces 46 µl de reacción de PCR a la que se añadió digoxigenina-11-dUTP 1 mM (*DIG-11-dUTP*; Roche) para marcar los nucleótidos (Tabla M27) y 2 µl de cada oligo 10 µM

específico de cada gen (*forward* y *reverse*) para dar un volumen de reacción final de 50 µl (Fig. M24G) y posteriormente se establecieron las condiciones de la PCR (tiempo y ciclos) de acuerdo a los oligos y DNA polimerasa empleados, siguiendo las reglas que aparecen en el Apartado M2.1.2.

Table M27. PCR reaction solution.

COMPONENT	STOCK CONC.	FINAL CONC.	µl / TUBE (1X)
NH4 Reaction Buffer	10x	1x	5
dNTP's	10 mM	0.2 mM	1
DIG-11-dUTP	1 mM	4 µM	0.2
BIOTAQ DNA Polymerase	5 U/µl	1 U	0.2
MgCl ₂	50 mM	3 mM	3
Milli-Q® Sterile Water	-	-	36.6

Se colocaron los tubos de PCR en hielo y con ayuda de una pipeta de 10 µl se eliminó la solución de PCR y se lavaron las secciones de tejido dos veces durante 5 minutos en 150-200 µl de PBS 1x. Se eliminó entonces la máxima cantidad de PBS posible y se añadieron 100 µl de solución de bloqueo 1x (BSA -*Bovine Serum Albumin*- al 1% -w/v- en PBS 1x). Las muestras se incubaron durante 30 minutos en hielo. Después de este tiempo, se eliminó la máxima cantidad de solución de bloqueo posible y se añadieron 50 µl de anticuerpo *Anti-Digoxigenin-AP* (Roche) diluido 1:500 en solución de bloqueo 1x a cada tubo. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora, tras la cual se eliminó la solución del anticuerpo con una pipeta de 200 µl y se lavaron las secciones dos veces durante 15 minutos a temperatura ambiente con solución de lavado 2 (0.1 M Tris-Cl y 0.15 M NaCl llevado a pH 9.5). Las secciones se mantuvieron en solución de lavado 2 después del segundo lavado (Fig. M24H).

Por último, para realizar la detección colorimétrica se utilizó un microscopio óptico equipado con una cámara. Utilizando un pincel suave (para las muestras de hoja) o una pipeta de 200 µl con la punta cortada (para las muestras de raíz), se transfirieron las secciones con solución de lavado 2 a un portaobjetos silanizado y con ayuda de una pipeta de 200 µl se eliminó la solución de lavado. Se añadieron entonces 50 µl del sustrato cromogénico *BM purple* (Roche) a cada muestra en el portaobjetos y se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente hasta que apareció la señal de color azul. El tiempo de tinción fue variable (entre 30 minutos y 1.5 horas) dependiendo de la abundancia de transcrito y la eficiencia de la PCR. Finalmente se realizaron dos lavados con solución de lavado 2 durante 5 minutos y otros dos lavados con agua Milli-Q®, se añadieron 2-3 gotas de glicerol al 40% (v/v) y se cubrieron las muestras con un cubreobjetos, sellando las esquinas con laca de uñas con cuidado de no dañar las secciones (Fig. M24I).

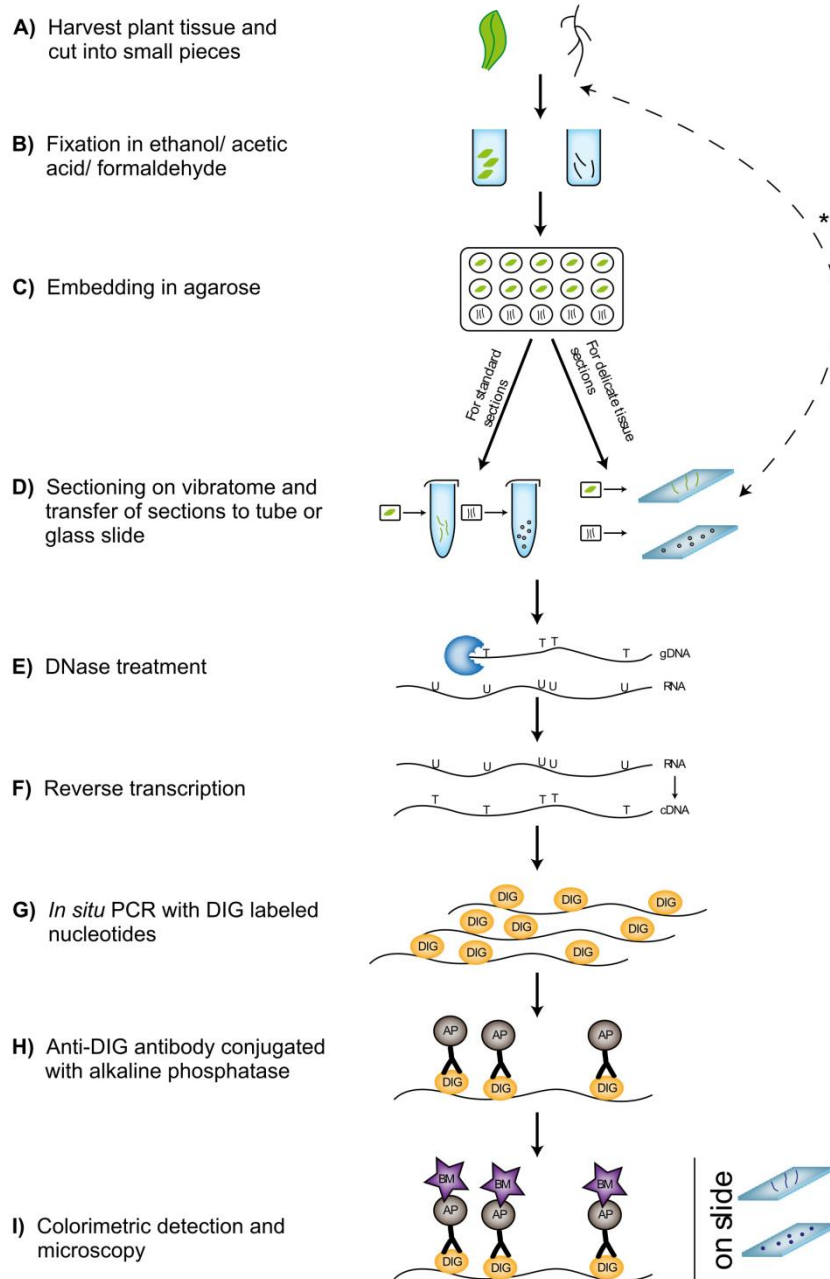


Figure M24. Schematic representation of the *in situ* PCR pipeline. Plant tissue is fixed in an ethanol/acetic acid/formaldehyde solution, followed by embedding in agarose and sectioning. Sections are collected into a microfuge tube in which DNase treatment, reverse transcription and *in situ* PCR are carried out using a thermocycler. During *in situ* PCR, DIG labeled nucleotides are incorporated into the PCR products. An anti-DIG antibody conjugated with alkaline phosphatase and an alkaline phosphatase substrate are used for the detection of the DIG labeled PCR products. These are visualized under a microscope. Thin fragile sections are placed onto a glass slide after sectioning, while *non-embedded, non-sectioned samples (i.e. epidermal peels) are placed directly onto slides for all processes from fixation to the final PCR step (dotted arrow). Taken from Athman *et al.* (2014).

V. RESULTADOS

V. RESULTS

R1. ANÁLISIS MOLECULAR DE *SIHKT1;1* Y *SIHKT1;2* Y EXPRESIÓN FUNCIONAL EN LEVADURAS

R1.1. AISLAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE cDNA DE *SIHKT1;1* Y *SIHKT1;2*

Previamente al inicio de este trabajo, con anterioridad a la liberación del genoma de tomate por *The Tomato Genome Consortium* (2012) (<https://solgenomics.net/>), se aislaron en nuestro laboratorio dos isoformas de HKT1 (*SIHKT1;1* y *SIHKT1;2*) de *S. lycopersicum* cv. MoneyMaker (J. Li, P. Alvarez de Morales y A. Belver, publicado posteriormente en Asins *et al.* -2013-). El procedimiento para su obtención se describe brevemente a continuación. Una secuencia de cDNA parcial de *SIHKT1;1* se obtuvo utilizando un clon de un marcador de secuencia expresada (EST, *Expressed Sequence Tag*) de patata (suministrado por BioAtlantech, *Canadian Potato Genomic Project*, <http://www.cpgp.ca>), siendo dicha secuencia altamente homóloga a la de *AtHKT1;1*. El clon EST de patata fue secuenciado nuevamente, y dada la alta conservación de las secuencias nucleotídicas de la familia Solanaceae, según la información disponible por entonces (Moore *et al.*, 2005), los oligos específicos diseñados en dicha secuencia permitieron el aislamiento de un fragmento de cDNA parcial mediante RT-PCR a partir de RNA total de tallo de tomate. El aislamiento de la versión completa del cDNA de *SIHKT*, (denominado posteriormente como *SIHKT1;1*), se realizó mediante la técnica de RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) 5'-3', utilizando el *SmartTM 5'-3' RACE cDNA Amplification Kit* (Clontech, BD Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuencia de cDNA de la segunda isoforma, denominada como *SIHKT1;2*, también se aisló utilizando un clon EST de *S. lycopersicum* cv. MicroTom, homólogo a *AtHKT1;1* (suministrado por el *Kazusa DNA Research Institute*, Chiba, Japón). Finalmente, las secuencias codificantes completas (*Open Reading Frames* - ORFs-) de *SIHKT1;1* (1668 bp, 556 aa) y *SIHKT1;2* (1512 bp, 504 aa) se obtuvieron mediante RT-PCR, utilizando oligos específicos del gen (Tabla M16) y RNA total procedente de *S. lycopersicum* cv. MoneyMaker, secuenciándose dichos ORFs por completo (Fig. R1). Este resultado previo constituye el punto de partida del presente trabajo de Tesis Doctoral, el cual se describe a continuación.

R1.2. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE cDNA DE *SIHKT1;1* Y *SIHKT1;2*

Las secuencias nucleotídica y aminoacídica codificantes de *SIHKT1;1* y *SIHKT1;2* fueron un 54.4% (no mostrada) y un 47% idénticas, respectivamente (Fig. R1 y Tabla R1). Para investigar las diferencias estructurales, las secuencias de aminoácidos deducidas de *SIHKT1;1* y *SIHKT1;2* de tomate se alinearon con la secuencia de *AtHKT1;1*, siendo ambas idénticas al 47% (Fig. R1 y Tabla R1). Las posiciones de los dominios transmembrana y del poro se predijeron de acuerdo con el modelo propuesto para la topología de *AtHKT1;1* (Durell y Guy, 1999; Kato *et al.*, 2001) basado en el modelo estructural de cuatro MPM (dominio transmembrana, poro, segmento transmembrana) (Fig. R1, recuadro inferior). La alineación de las dos isoformas de tomate HKT1 con otras secuencias de aminoácidos conocidas de HKT procedentes de plantas reveló que ambas son similares a las de *Mesembryanthemum*, *Suaeda*, *Eucalyptus*, *Arabidopsis*, *Vitis* y otros géneros, mostrando identidades de secuencias que varían del 62% al 34% (Tabla R1).

Todos estos transportadores pertenecen a la Clase I de transportadores HKT, típicos de plantas dicotiledóneas (Fig. R2), cuyos miembros se caracterizan por la presencia de una *Ser* en lugar de un *Gly* en la posición correspondiente a la primera región del bucle P o *P-loop* (P_A en la Fig. R1).

Para la secuencia de HKT1;2 de tomate, el ITAG 2.40 (<http://solgenomics.net/>) predijo la ubicación de un dominio 5' UTR (*UnTranslated*) putativo y un intrón putativo (Fig. R1). Ello condicionó en su momento a que se clonara una versión de *SIHKT1;2* sin dicho fragmento (*SIHKT1;2-NUT*), tal y como se describe en el apartado R2.2.2. Sin embargo, tras la liberación de la secuencia actualizada por el ITAG, versión 3.2, a fecha Junio de 2017, dicho 5' UTR ya no aparecía anotado (<https://solgenomics.net/>). Asimismo, el intrón putativo también parece haber sido predicho erróneamente en la anotación del ITAG 2.40, ya que codifica a una región de la secuencia de aminoácidos altamente homóloga a la de *SIHKT1;1* y *AtHKT1;1*, abarcando parte del poro B (P_B) y de los dominios transmembrana $M2_B$ y $M1_C$ (Durell y Guy, 1999; Kato *et al.*, 2001). Los datos de las secuencias aminoacídicas de HKT de tomate se pueden encontrar en las bases de datos del EMBL/GenBank, con los números de acceso CCJ09641 (*SIHKT1;1*) y CCJ09642 (*SIHKT1;2*).

Se han encontrado otras diferencias en la secuencia, tales como 22 aminoácidos adicionales en *SIHKT1;2*, entre los dominios transmembrana $M2_A$ y $M1_B$, que estaban ausentes en las secuencias de *SIHKT1;1* y *AtHKT1;1*. Sin embargo, su efecto sobre la estructura proteica y, por consiguiente, sobre la función y/o actividad de la proteína es probablemente limitado, debido a la pobre homología mostrada en esta región en comparación con las proteínas HKT1 de *S. lycopersicum* y otros transportadores de tipo HKT de plantas (Figs. R2 y R3).

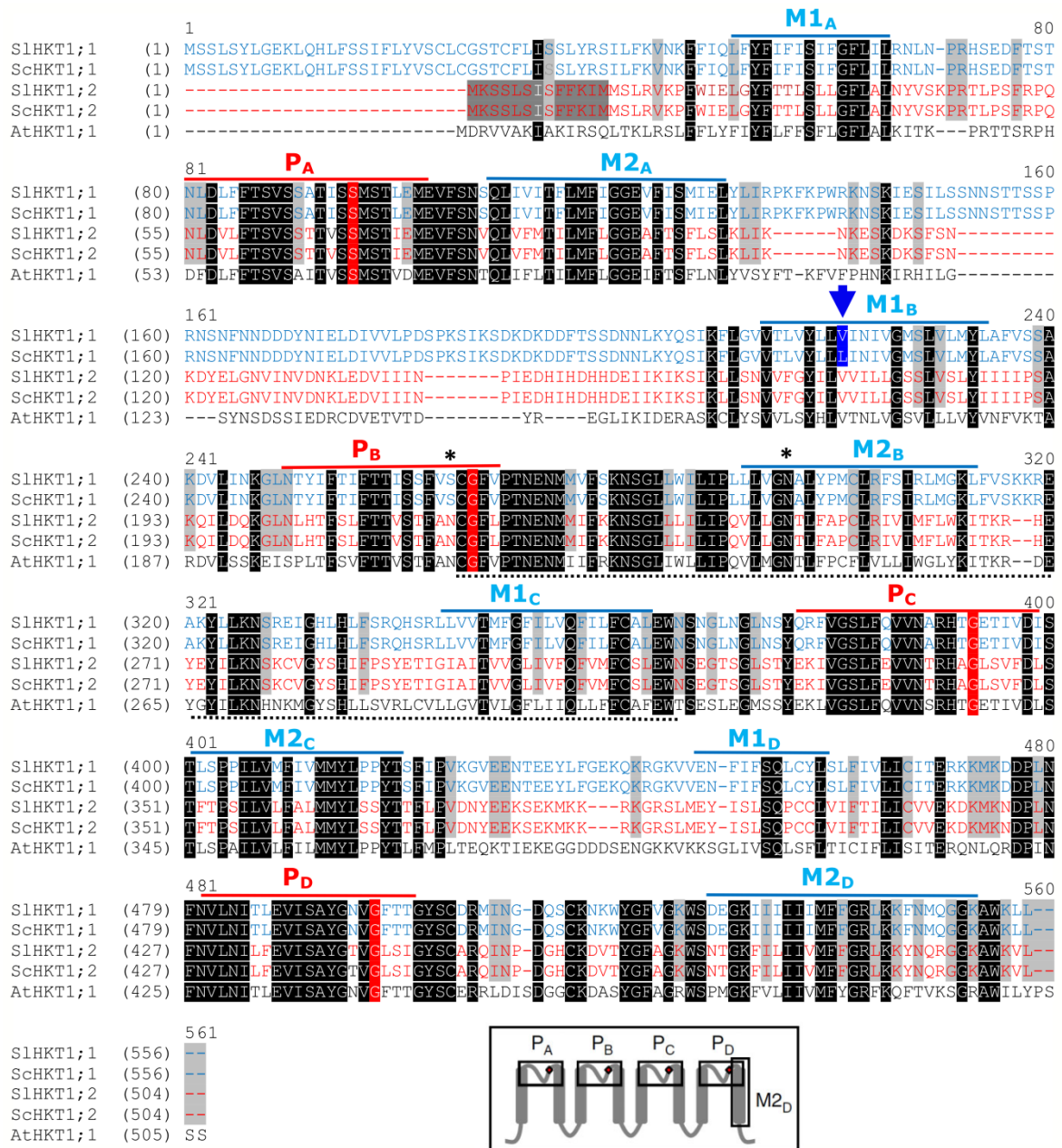


Figure R1. Alignment of SIHKT1;1 amino acid sequence with SIHKT1;2. Sequences were aligned using Clustal W program (Thompson *et al.*, 1994). Identical residues in all sequences are highlighted in black. Identical residues in tomato HKT sequences are highlighted in light grey. Blue arrowhead indicates the position of residue substitution of Val in the HKT1;1 sequence from the *S. lycopersicum* allele (NIL17) by Leu in the HKT1;1 allele introgressed from *S. cheesmaniae* (NIL14; both highlighted in blue). Amino acid sequence of SIHKT1;2 (NIL17) and ScHKT1;2 (NIL14) are identical. Positions of transmembrane and pore segments were predicted according to the model proposed for the topology of the AtHKT1 protein, based on the four-MPM structural model (transmembrane segment, pore, transmembrane segment inset). The conserved Gly residues in the K⁺ channel selectivity filter GYG of the P-loop-like domains (highlighted in red) determine the K⁺ selectivity of HKT transporters (Mäser *et al.*, 2002). The presence of Gly in the PA-loop is conserved in K⁺ permeable HKT transporters (class II), while the presence of Ser instead of Gly is conserved in Na⁺ permeable HKT transporters (class I) (Mäser *et al.* 2002; Platten *et al.* 2006). For tomato HKT1;2 sequences (Solyc07g014680.2), location of a putative 5'UTR is highlighted in dark gray and an additional putative intron is indicated by a dotted line underneath, both predicted by ITAG 2.40 (<http://solgenomics.net/>). Asterisks define positions of Asp residues (D) shown to be essential determinants for K⁺ transport activity in TsHKT1;2 (Ali *et al.*, 2012).

Table R1. Homology of tomato HKT1-like protein sequences with other plant HKT transporters.

% IDENTITY	AHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1	THHKT1:1				
AHKT1:1		80	78	42	46	45	44	40	39	40	39	39	36	36	36	44	51	48	47	51	51	50	47	46	46	46	52	47	48	49	45	VHKT1:2				
TSHKT1:1		76	76	44	46	43	44	38	38	38	38	38	35	36	36	43	49	48	46	49	49	49	46	46	45	53	46	47	48	45	VHKT1:2					
THHKT1:1		100	43	46	44	45	39	38	41	38	38	38	36	36	36	43	50	48	47	52	53	50	46	47	46	54	48	48	51	48	VHKT1:2					
TSHKT1:2		43	46	44	45	39	38	41	38	41	38	38	36	36	36	43	50	48	47	52	53	50	46	47	46	54	48	48	51	48	VHKT1:2					
OSHKT1:1		48	41	38	34	35	37	37	37	37	37	37	34	36	36	37	40	42	38	44	44	43	41	41	42	44	40	40	40	40	40	VHKT1:2				
OSHKT1:3		42	40	38	39	40	38	39	40	38	39	37	37	37	37	43	46	44	43	49	48	47	46	44	48	49	47	48	46	44	44	VHKT1:2				
HVHKT1:5		70	39	39	42	41	40	37	38	44	47	44	41	50	49	50	46	46	46	46	46	46	46	46	46	49	43	46	46	43	46	43	VHKT1:2			
OSHKT1:5		38	39	40	40	39	36	36	36	45	46	44	40	49	47	47	45	43	45	43	45	43	45	43	45	48	42	45	44	41	41	41	VHKT1:2			
HVHKT2:1		92	72	68	68	51	51	41	41	38	37	44	42	42	42	37	38	43	43	42	39	40	39	40	39	43	42	39	40	36	36	36	36	VHKT1:2		
TAHKT2:1		73	67	67	51	51	41	41	38	37	44	42	41	37	38	43	43	43	42	38	39	36	39	40	39	43	42	38	39	36	36	36	36	VHKT1:2		
PAHKT2:1		69	69	54	54	54	42	43	40	37	47	45	44	39	41	44	44	44	43	41	40	39	41	40	39	43	42	41	40	37	37	37	37	VHKT1:2		
OSHKT2:1		90	49	51	40	40	38	38	38	45	43	43	39	38	41	42	40	39	41	42	40	39	41	40	39	43	42	40	39	41	38	38	38	VHKT1:2		
OSHKT2:2		49	50	40	41	39	38	38	34	39	38	38	37	36	39	39	40	42	43	40	39	41	40	39	41	43	40	39	41	37	34	34	34	VHKT1:2		
OSHKT2:3		93	37	38	38	38	35	40	38	39	36	36	36	36	39	39	39	39	35	35	35	35	35	35	35	39	35	36	37	34	34	34	34	VHKT1:2		
OSHKT2:4		50	45	40	49	48	47	47	43	44	50	44	50	44	48	47	47	43	44	50	44	48	44	44	44	50	44	48	44	43	43	43	43	VHKT1:2		
ECHKT1:1		76	52	67	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	65	VHKT1:2		
ECHKT1:2		50	62	60	59	52	52	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	VHKT1:2		
SIHKT1:1		98	88	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	86	VHKT1:2		
VHKT1:6		51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	VHKT1:2		
VHKT1:7		52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	VHKT1:2		
VHKT1:8		53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	VHKT1:2		
McHKT1:2		54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	VHKT1:2	
SmHKT1:1		55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	VHKT1:2	
McHKT1:1		56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	VHKT1:2	
PHKT1:1		57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	VHKT1:2	
SIHKT1:2		58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	VHKT1:2
VHKT1:1		59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	VHKT1:2
VHKT1:2		60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	VHKT1:2

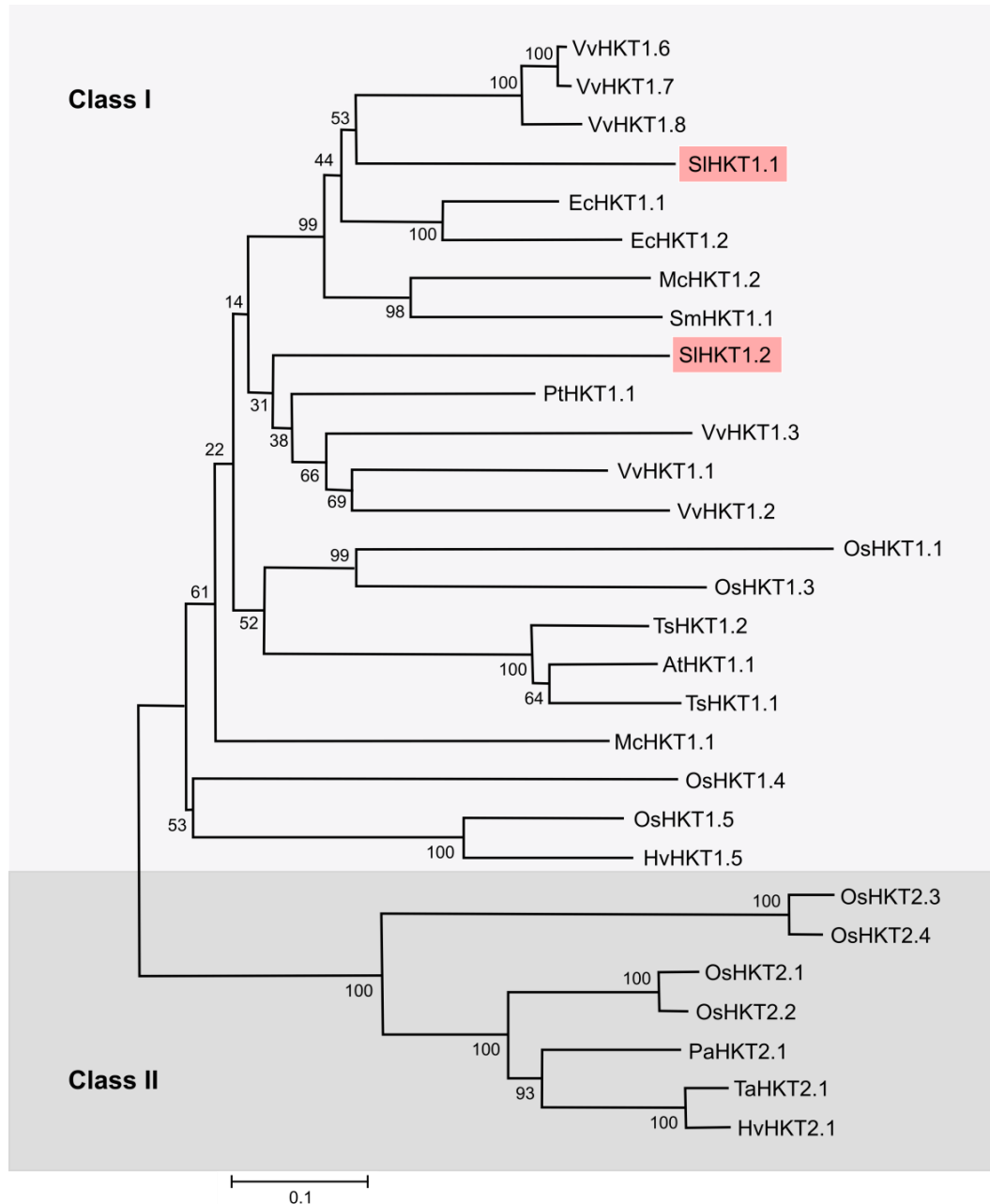


Figure R2. Phylogenetic relationship between *S. lycopersicum* HKT1-like proteins and other plant HKT transporters. Unrooted minimum-evolution phylogenetic tree was constructed using full polypeptide sequences aligned with Clustal W program (Thompson *et al.*, 1994) with 10 000 bootstrap replicates, using MEGA4 software (Tamura *et al.*, 2007). The scale bar corresponds to a distance of 0.1 substitutions per site. Bootstrap values are indicated adjacent to the corresponding node. The protein accession numbers as listed in the GeneBank database are: SIHKT1;1 CCJ09641; SIHKT1;2 CCJ09642; AtHKT1;1 NP_567354; EcHKT1;1 AAF97728; EcHKT1;2 AAD53890; HvHKT1;5 ABK58096; HvHKT2;1 CAJ01326; McHKT1;1 AAK52962; McHKT1;2 AAO73474; OsHKT1;1 CAD37183; OsHKT1;3 CAD37185; OsHKT1;4 CAD37197; OsHKT1;5 BAB93392; OsHKT2;1 BAB61789; OsHKT2;2 BAB61791; OsHKT2;3 CAD37187; OsHKT2;4 CAD37199; PaHKT2;1 BAE44385; PtHKT1;1 XP_002325229.1; SmHKT1;1 AAS20529.2; TaHKT2;1 AAA52749; TsHKT1;1 JQ063120; TsHKT1;2 BAJ34563; VvHKT1;1 CAO64083; VvHKT1;2 CAO64075; VvHKT1;3, CAO64081; VvHKT1;6 CAO64069; VvHKT1;7, CAO6407; VvHKT1;8, CAO64071. At, *Arabidopsis thaliana*; Ec, *Eucalyptus camaldulensis*; Hv, *Hordeum vulgare*; Mc, *Mesembryanthemum crystallinum*; Os, *Oryza sativa*; Pa, *Phragmites australis*; Pp, *Physcomitrella patens*; Pt, *Populus trichocarpa*; Sl, *Solanum lycopersicum*; Sm, *Suaeda maritima*; Ta, *Triticum aestivum*; Ts, *Thellungiella salsuginea* (or *Eutrema salsugineum*), Vv, *Vitis vinifera*.

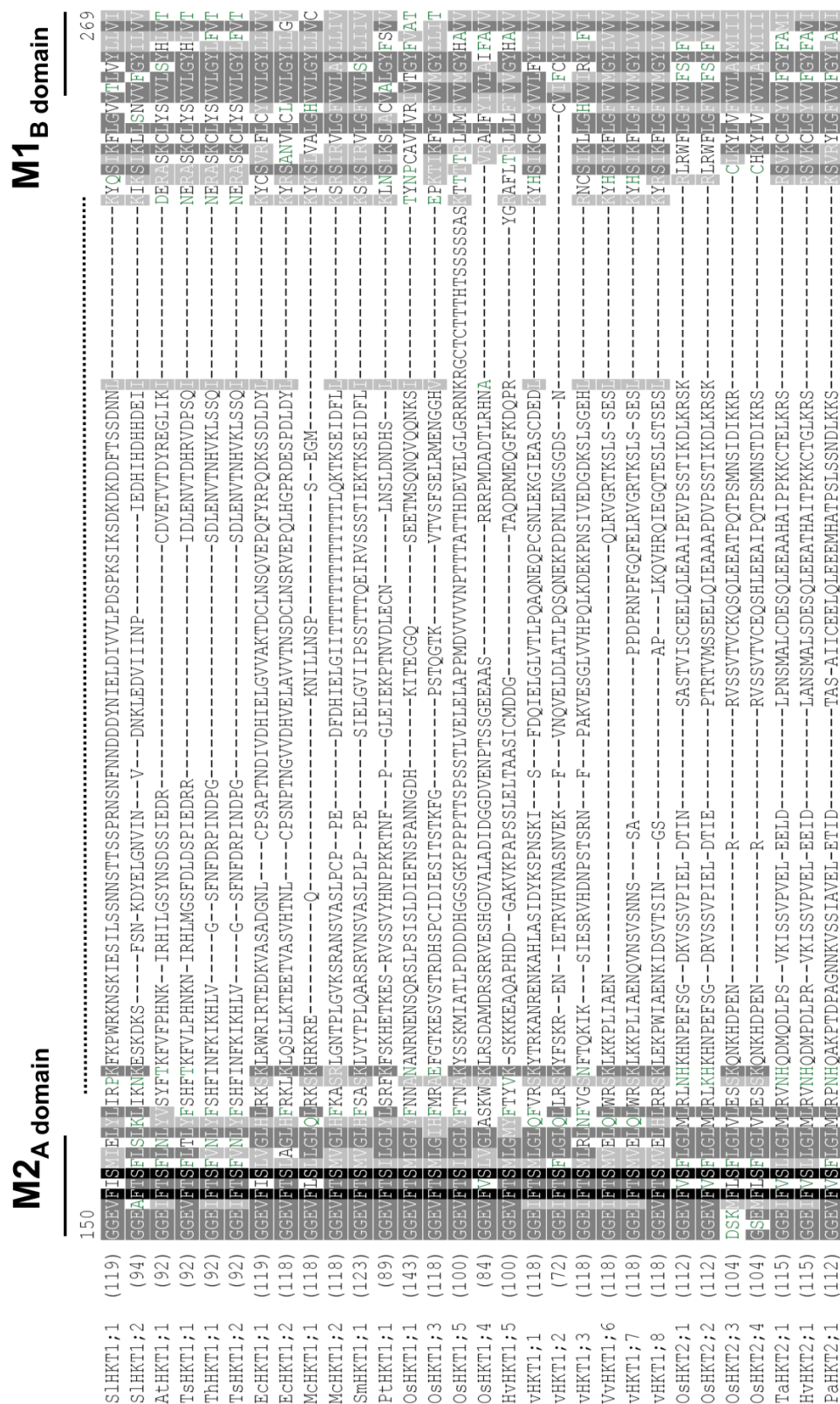


Figure R3. Detail of the multiple alignments of *S. lycopersicum* HKT-like proteins and other plant HKT transporters used to construct phylogenetic tree in Figure R2, showing the aminoacid sequence region between transmembrane domain M2_A and M1_B. Dotted line indicates region with 22 additional amino acids of SIHKT1;1 absent in either SIHKT1;2 or AtHKT1;1 as showed in Figure R1. Multiple alignment was done with Clustal W program (Thompson *et al.*, 1994) using a Blosom 62 matrix and default parameters.

R1.3. EXPRESIÓN GÉNICA DE *SIHKT1;1* y *SIHKT1;2* EN DIFERENTES TEJIDOS DE TOMATE

Un análisis preliminar de la expresión génica por RT-PCR convencional mostró que *SIHKT1;1* y *SIHKT1;2* se expresaban de forma ubícua en todos los tejidos analizados (hojas, tallos, raíces, flores y frutos) del tomate cultivado, *S. lycopersicum* cv. Moneymaker, en condiciones normales de cultivo (Fig. R4).

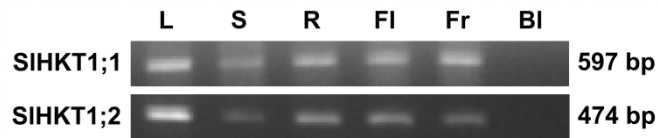


Figure R4. Gene expression of *SIHKT1;1* and *SIHKT1;2* in different tissues from tomato. Total RNA was purified from leaf (L), stem (S), root (R), flower (FI) and fruit (Fr) tissues from tomato *S. lycopersicum* cv. Moneymaker, grown under normal conditions (BI, blank). *SIHKT1* cDNA fragments were amplified by RT-PCR using gene specific primers indicated in Table M20.

R1.4. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS TRANSPORTADORES *SIHKT1;1* y *SIHKT1;2* EN LEVADURA

Con el fin de evaluar sus características cinéticas, especificidad iónica y modo de transporte de los transportadores *SIHKT1;1* y *SIHKT1;2*, éstos fueron clonados en el vector pYPGE15, bajo el control de un promotor de glucosa, *PMA1*, para prevenir de esta forma artefactos de expresión derivados de secuencias nucleotídicas del vector aguas arriba del codón de traducción (Haro *et al.*, 2005; Bañuelos *et al.*, 2008). Dichas construcciones se han expresado en la cepa de levadura *WΔ6*, defectivas en los transportadores de K⁺ endógenos mayoritarios (*Δtrk1* y *Δtrk2*) (Haro *et al.*, 2005; Bañuelos *et al.*, 2008). En experimentos de *drop-test* en levaduras, la expresión de ambas isoformas, *SIHKT1;1* y *SIHKT1;2*, fueron incapaces de complementar el crecimiento de la cepa mutante a baja concentración de K⁺ (Fig. R5). Sin embargo, las células de levadura que expresaban *SIHKT1;1* fueron capaces de reducir el Na⁺ del medio externo (método de depleción). Esta depleción de Na⁺ del medio no se vio afectada por la presencia de K⁺, lo que indicaba que *SIHKT1;1* era un transportador selectivo de Na⁺ (Fig. R6). No se detectó actividad de transporte para Na⁺ ni para K⁺ en el caso de *SIHKT1;2* (resultados no mostrados).

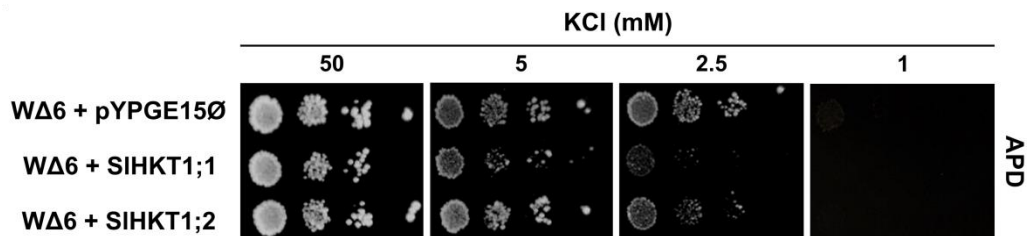


Figure R5. Phenotype complementation (drop-test analysis) of tomato *HKT1*-like genes in the *WΔ6* yeast strain, defective in K⁺ transporters (*Δtrk1*, *Δtrk2*). *WΔ6* cells transformed with empty vector (pYPGE15Ø) or with indicated *HKT1*-like genes were grown overnight in selective medium. Five microliters of serial dilutions (10⁻¹) were spotted onto plates containing AP glucose medium supplemented with the indicated concentrations of KCl. Plates were incubated at 30°C for 4-5 days.

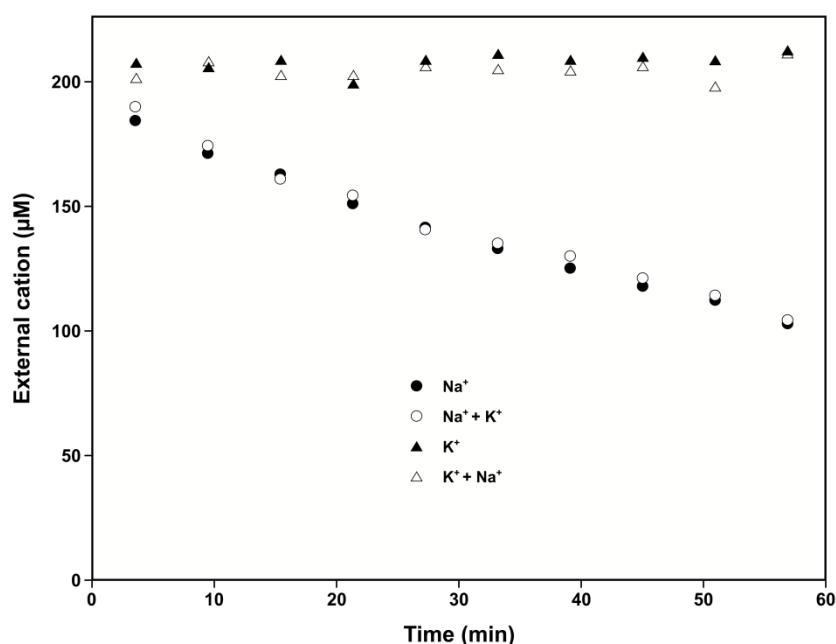


Figure R6. Time course of Na⁺ and K⁺ depletion in WΔ6 yeast cells expressing *SIHKT1;1*. K⁺-starved cells were suspended in testing buffer (10 mM MES-Ca²⁺, pH 6.0) supplemented by 2% (w/v) glucose and, after the addition of NaCl (200 mM) or KCl (200 mM), samples were taken at intervals. Depletion of K⁺ and Na⁺ was determined by atomic emission spectrophotometry. The changes in Na⁺ concentration (circles) in the absence (closed circles) or presence of K⁺ (open circles) and changes in K⁺ concentration in the absence (closed triangles) or presence of Na⁺ (open triangles) were recorded. All experiments were repeated several times.

R2. *HKT1;1/HKT1;2* COMO GENES CANDIDATOS RESPONSABLES DE UN QTL MAYORITARIO QUE DETERMINA LA CONCENTRACIÓN DE SODIO Y POTASIO EN LA PARTE AÉREA DE TOMATE

Un aspecto muy relevante de esta Tesis Doctoral ha derivado del establecimiento de la colaboración científica entre el grupo de investigación **Homeostasis Iónica y Transportadores de Membrana, EEZ**, en el que se ha desarrollado y el grupo de **Genética de la Dra. MJ Asíns (IVIA, Valencia)**. Gracias a esta colaboración se validaron los genes de tomate implicados en el control de la homeostasis de K⁺ y Na⁺, aislados en el laboratorio de la EEZ, como genes candidatos capaces de soportar funcionalmente QTLs de tolerancia a la salinidad en dos poblaciones de líneas recombinantes (RILs -*Recombinant Inbred Line*-), derivadas de dos especies halotolerantes: *S. pimpinellifolium* (población P) y de *S. cheesmaniae* (población C), respectivamente. Puesto que una buena parte de la información molecular del locus *HKT1*, objetivo esencial de esta memoria, está íntimamente relacionada con la información genética asociada a dicho locus (datos genéticos y material vegetal obtenidos por el grupo del IVIA), para entender esta información molecular es necesario conocer, al menos, los aspectos genéticos más relevantes. Por ello, en el siguiente apartado se explicarán algunos de los datos genéticos más importantes, cuya descripción y metodología se encuentran contenidas en Asíns *et al.* (2013). De ahí que estos datos sean referidos a esta cita, para diferenciarlos de aquellos datos exclusivamente obtenidos durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

R2.1. DATOS GENÉTICOS PREVIOS: LOCALIZACIÓN GENÉTICA DE *SlHKT1;1* Y *SlHKT1;2* EN EL CROMOSOMA 7 EN POBLACIONES DE *CHEESMANIAE* Y *PIMPINELLIFOLIUM*. ANÁLISIS DE QTLs

Brevemente, el grupo de Genética del IVIA había encontrado una agrupación de QTLs localizados en una región del cromosoma 7, que bajo condiciones salinas, determinan una mayor acumulación de Na⁺ y una menor de K⁺ en la parte aérea, en dos poblaciones de líneas RILs de la especie cultivada *S. lycopersicum* cv. Cerasiforme. Una de ellas porta una introgresión cromosómica de *S. cheesmaniae* (población C), y la otra, de *S. pimpinellifolium* (población P), en dicha región (Villalta *et al.*, 2007, 2008). Dicha agrupación incluye, entre otros, los QTLs, *lkc7.1* para el contenido de potasio en hoja (KH), *tn7.1* para Na⁺ transportado a la parte aérea y *lkn7.1* para la relación K⁺/Na⁺ en hoja (K/NaH), bajo condiciones salinas, siendo todos ellos QTLs mayoritarios, ya que explican hasta un 40% de la variación fenotípica obtenida. En estos QTLs, los alelos de *S. cheesmaniae* o de *S. pimpinellifolium* aumentan la concentración de Na⁺ y disminuyen la de K⁺ en hojas, mientras que el alelo de *S. lycopersicum* hace todo lo contrario (es decir, aumenta la concentración de K⁺ y disminuye la de Na⁺ en hojas).

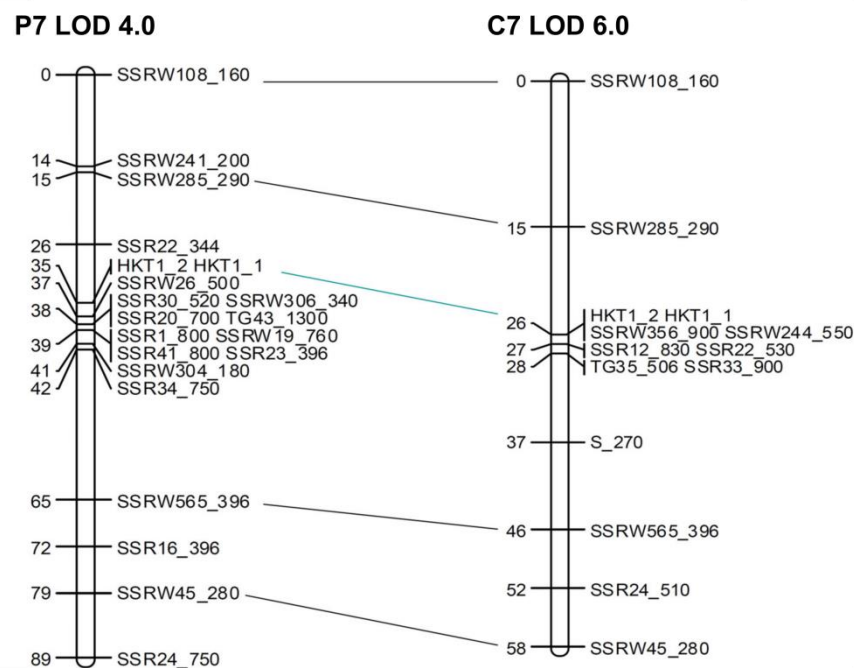


Figure R7. Linkage maps of chromosome 7 obtained from P and C populations of RILs. Tomato *HKT1;1* and *HKT1;2* markers located at chromosome 7 when using a total of 159 markers genotyped for the P population and 137 for the C population at LOD $\leq$ 4.0 and 6.0, respectively (Asins *et al.*, 2013).

Estos mismos rasgos cuantitativos, descritos previamente en Villalta *et al.* (2008), fueron sometidos a un análisis de QTL por el grupo de Genética del IVIA, generando un nuevo mapa de ligamiento para el cromosoma 7, después de genotipar las líneas RILs, P y C, utilizando las secuencias correspondientes a las dos isoformas de la familia HKT1 de tomate (*SlHKT1;1* y *SlHKT1;2*), descritas como marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) (Asins *et al.*, 2013). Precisamente en esta región genómica, estrechamente

asociada a dichos QTLs y especialmente a *lkc7.1*, subyacen, solos o con otros genes, ambos marcadores moleculares de *HKT1;1* y *HKT1;2*, no observándose recombinación entre ambos genes en ninguna de las poblaciones RIL (Fig. R7) (Asins *et al.*, 2013). Dicha posición es coincidente con la posición de máxima significación del valor LOD para varios QTLs en ambas poblaciones, concretamente para el de *lkc7.1* (Figs. R7, R8 y R9) (ver Tabla D1, Asins *et al.* -2013-), en un intervalo de 0.2-1.2 cM, rango de posición donde habitualmente se han encontrados los genes responsables de QTLs clonados hasta la fecha (Price, 2006).

Asimismo, para comprobar la proximidad física de *HKT1;1* y *HKT1;2* de tomate a la posición de máxima puntuación LOD de los QTLs mencionados, el grupo de Genética del IVIA generó además un nuevo mapa de ligamiento del cromosoma 7, basado en 278 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) del proyecto SolCAP (*Solanaceae Coordinated Agricultural Project*) para el análisis del QTL de los rasgos relacionados con Na⁺ y K⁺ (ver Tabla D2, Asins *et al.* -2013-). Solo tres SNPs fueron significativos y las máximas puntuaciones LOD se localizaron en *Solcap_snp_sl_57007* (Citocromo P450; 40.805 cM, 5056490 bp) para LNC y LKC, concentraciones de Na⁺ y K⁺ (mmol/g de peso seco) en hojas; LKN (K⁺/Na⁺ en hojas), SNC y SKC, concentraciones de Na⁺ y K⁺ en tallos (mmol/g de peso seco), TN (para Na⁺ transportado a la parte aérea) y la estimación de la sensibilidad a las hojas de sodio, NLS [porcentaje de reducción del área foliar (LA) (LAcontrol-LAsalina) × 100 / LAcontrol] (Villalta *et al.*, 2008)], todo ello bajo condiciones salinas, y finalmente, para LKN y SNC bajo condiciones control (Asins *et al.*, 2013). En condiciones control, LNC mostró un LOD máximo para los otros dos SNPs, co-localizados en 40.271 cM: *Solcap_snp_sl_57002* (factor de ribosilación del ADP, 5035786 bp) y *Solcap_snp_sl_56997* (isoamilasa 1, 4925909 bp). Las secuencias genómicas de *HKT1* de tomate están solo a 35 kb de *Solcap_snp_sl_57007*, ya que *HKT1;2* se localiza en la posición cromosómica de 5091851 bp, mientras que *HKT1;1* lo hace en la de 5103988 bp, denominadas Solyc07g014680.2.1 y Solyc07g014690.2.1 para SIHKT1;2 y SIHKT1;1 respectivamente, en el genoma secuenciado del cultivar “Heinz 1709” (ITAG2.40, International Tomato Annotation Group, <http://solgenomics.net/>, Tabla R2).

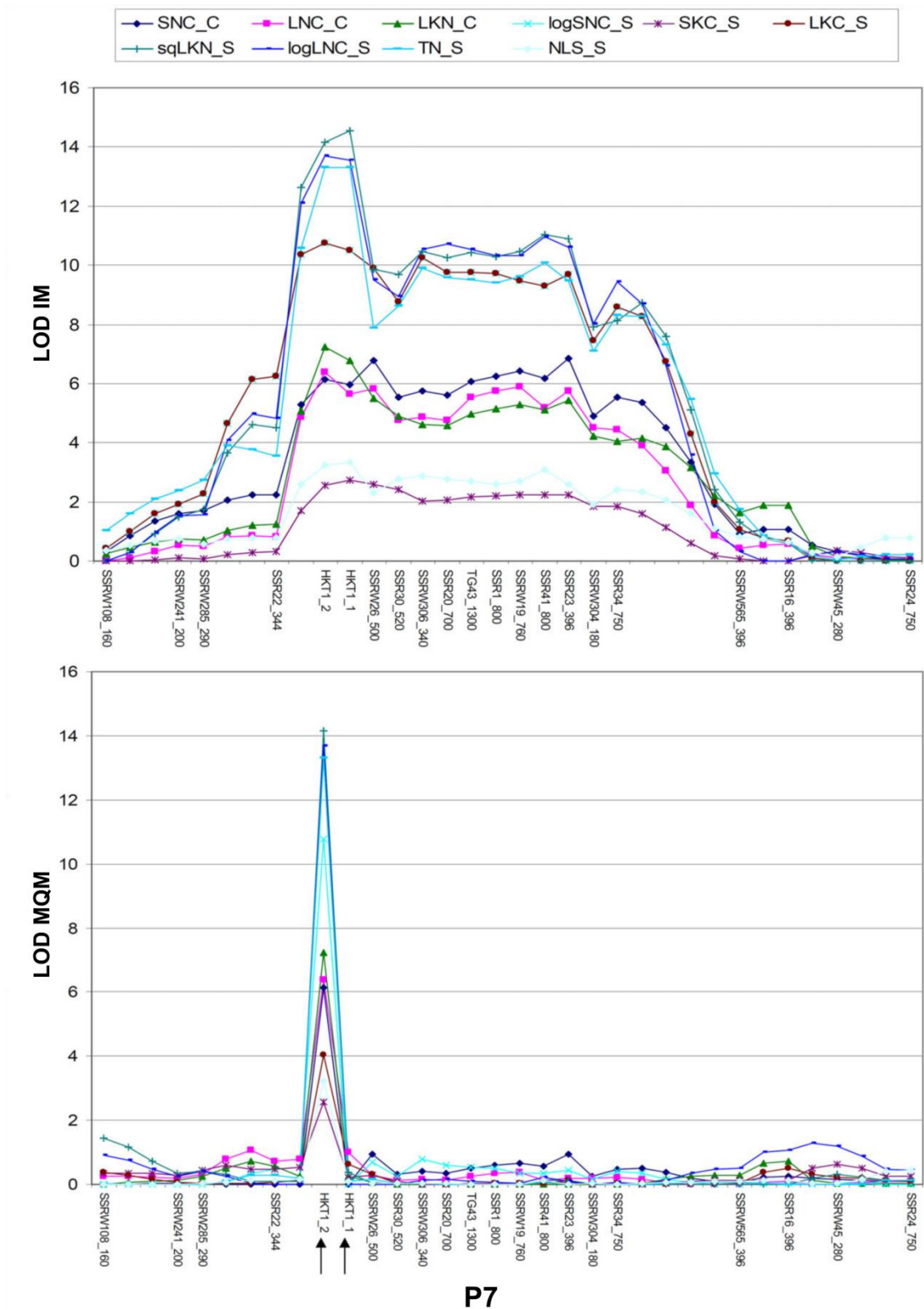


Figure R8. LOD function using Interval Mapping (IM) and Multiple QTL Mapping (MQM) for 10 characters showing significant QTLs ($\text{LOD} > 2$) on chromosome 7 in P population: the Na^+ and K^+ concentrations in leaves (LNC, LKC) and stems (logSNC, SKC), the K^+/Na^+ ratio in leaves (sqLKN), the transported Na^+ (TN) and Na^+ leaf sensitivity (NLS). Trait suffixes _C and _S stand for control and salinity conditions, respectively. *SIHKT1* markers are indicated with arrows (Asins *et al.*, 2013).

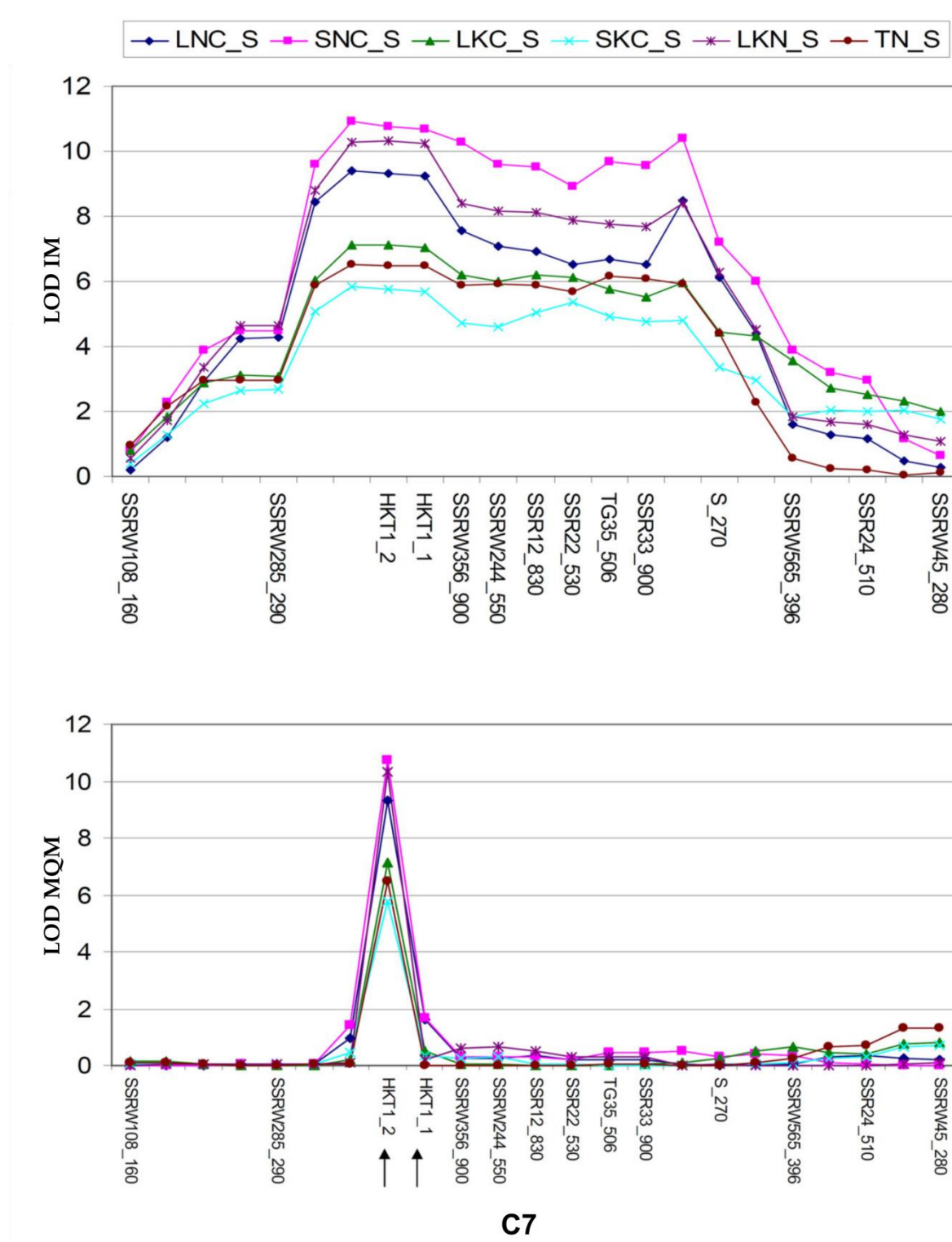


Figure R9. LOD function using Interval Mapping (IM) and Multiple QTL Mapping (MQM) for 6 characters showing significant QTLs ($\text{LOD} > 2$) on chromosome 7 in C population: the Na^+ and K^+ concentrations in leaves (LNC, LKC) and stems (SNC, SKC), the K^+/Na^+ ratio in leaves (LKN) and the transported Na^+ (TN). Trait suffixes _C and _S stand for control and salinity conditions, respectively. *HKT1* markers are indicated with arrows (Asins *et al.*, 2013).

Table R2. Genes encoding putative ion transporters in 10 Mbp-regions (SL2.40ch07:0..10003161) spanning *SIHKT1;1* and *SIHKT1;2* loci in chromosome 7 of *S. lycopersicum* cv. Heinz tomato as annotated by ITAG 2.40 (<http://solgenomics.net/>).

CHROMOSOME POSITION	TOMATO GENE	ANNOTATION / PREDICTED FUNCTION
SL2.40ch07-90358..92771	Solyc07g005040.2.1	H ⁺ -ATPase, ATPase-type plasma-membrane proton-efflux
SL2.40ch07-339058..340332	Solyc07g005440.1.1	CIPK, CBL-interacting protein kinase
SL2.40ch07-408207..409532	Solyc07g005520.1.1	Potassium channel tetramerization domain-containing protein
SL2.40ch07-481459..487527	Solyc07g005590.2.1	Cyclic nucleotide gated channel
SL2.40ch07-1194436..1196139	Solyc07g006370.1.1	Sodium calcium exchanger protein, homolog to AtCAX7
SL2.40ch07-1308919..1317697	Solyc07g006510.2.1	Cyclic nucleotide-gated ion channel, homolog to AtCNGC17
SL2.40ch07-2247006..2251786	Solyc07g007600.2.1	Pyrophosphate-energized proton pump, homolog to AtVHP1;1
SL2.40ch07-3079524..3097721	Solyc07g008320.2.1	Calcium-transportingATPase, homolog to AtACA10
SL2.40ch07-4107448..4119376	Solyc07g009130.2.1;	ATPase, P-type, heavy metal(Cd/Co/Hg/Pb/Zn) -translocating, homolog to ATHMA2
SL2.40ch07-5091851..5097815	Solyc07g014680.2.1	Potassium transporter, homolog to AtHKT1;1, identical to SIHKT1;2
SL2.40ch07-5103988..5106992	Solyc07g014690.2.1	Potassium transporter, homolog to AtHKT1;1, identical to SIHKT1;1
SL2.40ch07-5203700..5206540	Solyc07g014740.2.1	Homolog to Sodium Bile acid symporter family
SL2.40ch07-8095828..8102636	Solyc07g017780.2.1	ATPase P-type plasma-membrane proton-efflux, homolog to AtAHA2

R2.2. ANÁLISIS MOLECULAR DE *Sc/SIHKT1;1* Y *Sc/SIHKT1;2* Y EXPRESIÓN FUNCIONAL EN LEVADURAS

2.2.1. Análisis de las secuencias de las variantes alélicas de *Sl/ScHKT1;1* y *Sl/ScHKT1;2* en las líneas NILs de tomate

En el transcurso de esta Tesis Doctoral, que coincidió con el periodo previo a la liberación del proyecto **150 genomas de tomate**, en Octubre de 2013 (<https://solgenomics.net/>), las secuencias genómicas, incluyendo ORFs, intrones y regiones promotoras de las variantes alélicas de *HKT1;1* y *HKT1;2* aisladas de la línea NIL17 (homozigota para los alelos de *lycopersicum* -LL- en la región genómica que contiene *HKT1;1* y *HKT1;2*) y NIL14 (homozigota para los alelos de *cheesmaniae* -CC- en la misma región, conteniendo *HKT1;1* y *HKT1;2*) fueron clonadas de forma independiente en el vector *pGEM-T easy* (apartado M2.1.2), y secuenciadas (apartado M2.3).

Secuencias ORF

El análisis de la secuencia codificante (ORF, *Open Reading Frame*) reveló que las secuencias aminoácidas de SIHKT1;2 (NIL17) y ScHKT1;2 (NIL14) eran idénticas (Fig. R1). Por otro lado, el análisis de la secuencia nucleotídica de *ScHKT1;1* en NIL14 mostró un SNP (G658C) que causaba una única sustitución en la secuencia aminoácida predicha (V222L) en la región α -hélice M1_B en comparación con la secuencia de SIHKT1;1 en NIL17 (Fig. R1). Los datos de las secuencias nucleotídicas de *HKT* de tomate se liberaron en las bases de datos del EMBL/GenBank, con los números de acceso HE962483 (*SIHKT1;1*), HE962484 (*SIHKT1;2*), HE962485 (*ScHKT1;1*) y HE962486 (*ScHKT1;2*).

Secuencias de los intrones

Cada variante alélica de *HKT1;1* y *HKT1;2* contenía dos intrones, tal y como se había predicho para todos los transportadores de tipo HKT1 de plantas dicotiledóneas (Platten *et al.*, 2006a). El primer intrón de la secuencia genómica de *HKT1;1* de tomate es casi idéntico al segundo, teniendo ambos 626 y 691 bp respectivamente, mientras que la longitud del primer intrón de *HKT1;2* de tomate, de 3795 bp, fue mucho más larga que la del segundo, de 363 bp. Un intrón putativo adicional se predijo erróneamente por el ITAG 2.40 (<http://solgenomics.net/>) en la secuencia genómica de SIHKT1;2 (Soly07g014680.2.1; ver línea punteada debajo de la secuencia en Fig. R1). Los datos proporcionados por nuestro estudio demuestran que este intrón putativo codificaba una región altamente homóloga a la secuencia de aminoácidos de SIHKT1;1 y AtHKT1;1, abarcando parte del poro B (P_B) y de los dominios transmembrana M2_B y M1_C (Fig. R1) (Durell y Guy, 1999; Kato *et al.*, 2001). En *ScHKT1;1* (NIL14), la secuencia nucleotídica del intrón 1 fue 2 bp más corta que la de *SIHKT1;1* (NIL17) y presentaba tres SNPs en comparación con esta última, mientras que el intrón 2 presentaba un único SNP y tenía el mismo tamaño (Fig. R10). El intrón 2 de *HKT1;2* presentaba el mismo tamaño en todas las variantes alélicas y no mostraba polimorfismos (resultados no mostrados, ver ITAG 2.40 <http://solgenomics.net/>). No se pudo aislar el intrón más largo de *HKT1;2* (intrón 1), probablemente debido a dificultades en la amplificación por PCR.

Intron1-HKT1;1-NIL14	(250) ATCTATCCTTACTTTGATGGACGAGTTATC
Intron1-HKT1;1-NIL17	(251) ATCTATCCTTACTTTGCTGGACGAGTTATC
Intron1-HKT1;1-H	(250) ATCTATCCTTACTTTGCTGGACGAGTTATC
Intron1-HKT1;1-NIL14	(350) TGATCATCAAAAAAAAAAATTATACTGAAA
Intron1-HKT1;1-NIL17	(351) TGATCATCAAAAAAAAAAATTATACTGAAA
Intron1-HKT1;1-H	(350) TGATCATCAAAAAAAAAAATTATACTGAAA
Intron1-HKT1;1-NIL14	(600) GACATTAATTGTTTCACTTTTTTCAGG (627bp)
Intron1-HKT1;1-NIL17	(601) GACATTAATTGTTTCACTTTTTTCAGG (629bp)
Intron1-HKT1;1-H	(599) GACATTAATTGTTTCACTTTTTTCAGG (626bp)
Intron2-HKT1;1-NIL14	(390) ATAAACAATTG.....GTTTTTCTTGT (691bp)
Intron2-HKT1;1-NIL17	(390) ATAAATAATTG.....GTTTTTCTTGT (691bp)
Intron2-HKT1;1-H	(390) ATAAATAATTG.....GTTTTTCTTGT (691bp)

Figure R10. Sequence polymorphism in tomato HKT1;1 Intron 1 and 2 regions from genomic sequences of *S. lycopersicum*, cv Heinz (H), *S. lycopersicum* cv. Cerasiforme, NIL14 (CC) and NIL17(LL). Intron size is indicated at the respective end of each sequence (SNP are highlighted in red).

Secuencias de la región promotora

Por último, respecto a las secuencias no traducidas aguas arriba del codón de inicio, que contenían las regiones promotoras de las variantes alélicas de *HKT1;1* y *HKT1;2*, sólo los primeros 1319 kb de *HKT1;1* (Fig. R11) y 814 bp de *HKT1;2* (Fig. R11) de la secuencia aguas arriba del codón de inicio de la traducción de ambas NILs de tomate (NIL14 y NIL17) pudieron ser clonados y secuenciados. No se predijeron islas CpG en ninguno de los promotores de las variantes alélicas de *HKT1;1* y *HKT1;2*. Esto podría sugerir que el posible mecanismo de regulación de ambos genes no estaría asociado con una regulación epigenética.

PromScHKT1;1-NI14	(351)	CATATTGATTCAATTTAGTTATAAAATAGCGATAAATTATAAAAAA	AAA
PromSlHKT1;1-NIL17	(351)	CATATTGATTCAATTTAGTTATAAAATAGCGATAAATTATAAAAAA	AAA
PromSlHKT1;1-H	(351)	CATATTGATTCAATTTAGTTATAAAATAGCGATAAATTATAAAAAA	AAA
PromScHKT1;1-NI14	(501)	ATATTTTTTA	TTTGATTTTATTAACCTTTCGATAGTTAAACAAGAATCATT
PromSlHKT1;1-NIL17	(501)	ATATTTTTTA	CTTGATTTTATTAACCTTTCGATAGTTAAACAAGAATCATT
PromSlHKT1;1-H	(500)	ATATTTTTTA	TTTGATTTTATTAACCTTTCGATAGTTAAACAAGAATCATT
PromScHKT1;1-NI14	(551)	AAAACAGAAAAAAAC	AGTGGTTTATTATACTACAATTATTATCCTT
PromSlHKT1;1-NIL17	(551)	AAAACAGAAAAAAAC	AGTGGTTTATTATACTACAATTATTATCCTT
PromSlHKT1;1-H	(550)	AAAACAGAAAAAAAC	AGTGGTTTATTATACTACAATTATTATCCTT
PromScHKT1;1-NI14	(601)	GAATTTAATTTAACCAACAAGATCATGTTACAAGAGCA	TATATACATGT
PromSlHKT1;1-NIL17	(600)	GAATTTAATTTAACCAACAAGATCATGTTACAAGAGCA	TATATACATGT
PromSlHKT1;1-H	(598)	GAATTTAATTTAACCAACAAGATCATGTTACAAGAGCA	TATATACATGT
PromScHKT1;1-NI14	(801)	ATAATATATTTCCCTCCCTCTCATATTTGTTTCAAAAAA	AGAGA
PromSlHKT1;1-NIL17	(800)	ATAATATATTTCCCTCCCTCTCATATTTGTTTCAAAAAA	AGAGA
PromSlHKT1;1-H	(798)	ATAATATATTTCCCTCCCTCTCATATTTGTTTCAAAAAA	AGAGA
PromScHKT1;1-NI14	(951)	CGATAGACCTTCAGCTCAAGTAAATACAAATAAAAAATAGTACAGAGAAA	
PromSlHKT1;1-NIL17	(950)	CGATAGACCTTCAGCTCAAGTAAATACAAATAAAAAATAGTACAGAGAAA	
PromSlHKT1;1-H	(946)	CGATAGACCTTCAGCTCAAGTAAATACAAATAAAAAATAGTACAGAGAAA	
PromScHKT1;1-NI14	(1101)	GTTAGTTTTTTTAGAAAAAATCAAAAAAGAC	GAGTGACCTACCTTAACT
PromSlHKT1;1-NIL17	(1100)	GTTAGTTTTTTTAGAAAAAATCAAAAAAGAC	GAGTGACCTACCTTAACT
PromSlHKT1;1-H	(1096)	GTTAGTTTTTTTAGAAAAAATCAAAAAAGAC	GAGTGACCTACCTTAACT
PromScHKT1;1-NI14	(1151)	AATGGGAAGTTTTAAATTAGTAAATCATTGATAATATTTCTTCTGAAATA	
PromSlHKT1;1-NIL17	(1150)	AATGGGAAGTTTTAAATTAGTAAATCATTGATAATATTTCTTCTGAAATA	
PromSlHKT1;1-H	(1146)	AATGGGAAGTTTTAAATTAGTAAATCATTGATAATATTTCTTCTGAAATA	
PromScHKT1;1-NI14	(1201)	AATTAAATAAGATAGAGAATAATTCATATAAATCTAACT	GAAATATTGTG
PromSlHKT1;1-NIL17	(1200)	AATTAAATAAGATAGAGAATAATTCATATAAATCTAACT	GAAATATTGTG
PromSlHKT1;1-H	(1196)	AATTAAATAAGATAGAGAATAATTCATATAAATCTAAC	GAAATATTGTG
PromScHKT1;1-NI14	(1251)	TATATATATATATATACCTTACTACTCTAGATCCAAAATTAATAGAAG	
PromSlHKT1;1-NIL17	(1250)	TATATATATATATATACCTTACTACTCTAGATCCAAAATTAATAGAAG	
PromSlHKT1;1-H	(1245)	TATATATATATATATACCTTACTACTCTAGATCCAAAATTAATAGAAG	
PromScHKT1;1-NI14	(1299)	TGGTTGTAGTTTTTTTTTAAAA	(1319)
PromSlHKT1;1-NIL17	(1300)	TGGTTGTAGTTTTTTTTTAAAA	(1320)
PromSlHKT1;1-H	(1295)	TGGTTGTAGTTTTTTTTTAAAA	(1315)

Figure R11. Sequence polymorphism in promoter region of *HKT1;1* allelic variants from tomato NIL14 (CC) and NIL17(LL). SNPs (highlighted in gray) and indels (highlighted in black) in tomato *HKT1;1* promoter region up to 1300 bp upstream of the translation start site from genomic

sequences of *S. lycopersicum* cv. Cerasiform, NIL14 (*ScHKT1;1*-NIL14) and NIL17 (*SlHKT1;1*-NIL17). The *SlHKT1;1* (Soly07g014690.2.1) genomic sequence of *S. lycopersicum*, cv Heinz 1709 (H) was obtained from genome tomato database (ITAG2.40, <http://solgenomics.net/>). Positions are counted from 5' end of the sequence and the last position refers to the base pair immediately upstream of the start codon.

Además de un gran número de elementos comunes de acción en *cis* en las regiones promotoras y potenciadoras, tales como cajas TATA y CAAT, y señales de poliadenilación, tales como cajas POLASIG, una búsqueda de elementos reguladores en *cis* identificó secuencias putativas relacionadas con tejidos específicos, expresión regulada por la luz (hormonales) y por los ciclos circadianos, así como varios elementos conocidos de respuesta al estrés, incluyendo elementos de defensa y elementos de inducción de anaerobiosis, sitios de unión a factores de transcripción de tipo MYB, implicados en la inducción de sequía y elementos que responden a estrés por calor y por hipo-osmolaridad (Tablas R3 y R4; Apéndices 1 y 2). Las regiones promotoras de *ScHKT1;1* y *SlHKT1;1* revelaron más polimorfismos, incluyendo SNPs e InDels (pequeñas inserciones y deleciones), que las regiones promotoras de los alelos de *HKT1;2* (Figs. R11 y R12). En consecuencia, las diferencias en las secuencias promotoras de *ScHKT1;1/SlHKT1;1* afectaron más a los elementos en *cis* predichos que las de *ScHKT1;2/SlHKT1;2* (Tablas R3 y R4).

Prom <i>ScHKT1;2</i> -NIL14	(251)	TTTAATAAGATTTCAGAGCAGGTTGAAATCTTGTGATCGGATCTCACTCC
Prom <i>SlHKT1;2</i> -NIL17	(251)	TTTAATAAGATTTCAGAGCAGGTTGAAATCTTGTGATCGAATCTCACTCC
Prom <i>SlHKT1;2</i> -H	(251)	TTTAATAAGATTTCAGAGCAGGTTGAAATCTTGTGATCGAATCTCACTCC
Prom <i>ScHKT1;2</i> -NIL14	(301)	ACTTATGTAAAAAGAATTTTCACATGCTTTGACCCATAAAAAATTTTTTG
Prom <i>SlHKT1;2</i> -NIL17	(301)	ACTTATGTAAAAAGAATTTTCACATGCTTTGACCCATAAAAAATTTTTTTG
Prom <i>SlHKT1;2</i> -H	(301)	ACTTATGTAAAAAGAATTTTCACATGCTTTGACCCATAAAAAATTTTTTTG
Prom <i>ScHKT1;2</i> -NIL14	(551)	AAGGAAATATCACTGATCATTTGGCAAGAATTATTATATTCTAACTCCTT
Prom <i>SlHKT1;2</i> -NIL17	(551)	AAGGAAATATCACTGATCATTTGGCAAGAATTATTATATTCTAACTCCTT
Prom <i>SlHKT1;2</i> -H	(551)	AAGGAAATATCACTGATCATTTGGCAAGAATTATTATATTCTAACTCCTT
Prom <i>ScHKT1;2</i> -NIL14	(801)	ATTTATTTTACTA (814)
Prom <i>SlHKT1;2</i> -NIL17	(801)	ATTTATTTTACTA (814)
Prom <i>SlHKT1;2</i> -H	(801)	ATTTATTTTACTA (814)

Figure R12. Sequence polymorphism in promoter region of *SlHKT1;2* from NIL14 (CC) and NIL17(LL). SNPs (highlighted in gray) in tomato *HKT1;2* promoter region up to 814bp upstream of the translation start site from genomic sequences of *S. lycopersicum* cv. Cerasiforme, NIL157-14 (*ScHKT1;2*-NIL14) and NIL157-17 (*SlHKT1;2*-NIL17). The *SlHKT1;2* (Soly07g014680.2.1) genomic sequence of *S. lycopersicum*, cv Heinz 1709 (H) was obtained from genome tomato database (ITAG2.40, <http://solgenomics.net/>). Positions are counted from 5' end of the sequence and the last position refers to the base pair immediately upstream of the start codon.

Table R3. *Cis*-regulatory elements in 5' UTR of *HKT1;1* genomic sequences of *S. lycopersicum* cv. Cerasiforme, NIL157-14 (CC) and NIL157-17 (LL) affected by sequence polymorphism indicated in Figure R11. Sequence corresponding to *S. lycopersicum* cv. Heinz (H) 1709 was used as a reference (Soly07g014690.2.1). Frequencies in each NIL/cultivar are indicated. Promoter sequences were searched against PLACE (Higo *et al.*, 1999), PlantCare (Lescot *et al.*, 2002) and NSITE-PL (<http://linux1.softberry.com>) databases and tools. N14, NIL14; N17, NIL17.

REGULATORY ELEMENT	H	N17	N14	SEQUENCE	FUNCTION
ARE	1	1	2	TGGTTT	<i>Cis</i> -acting regulatory element essential for anaerobic induction.
CAAT	27	27	28	CAAAAT	Common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions.
CACTFTPPCA1	31	32	31	YACT	Tetranucleotide (CACT) is a key component of Mem1 (mesophyll expression module 1) found in the <i>cis</i> -regulatory element in the distal region of the phosphoenolpyruvate carboxylase (ppcA1) of the C4 dicot <i>F. trinervia</i> ; Y=T/C.
CIACADIANLEL HC	4	3	4	CAANNNNAT C	<i>Cis</i> -acting regulatory element involved in circadian control.
MARTBOX	7	8	7	TTWTWTTWTT	T-Box; Motif found in SAR (scaffold attachment region; or matrix attachment region, MAR).
MYB1AT	2	2	3	WAACCA	MYB recognition site found in the promoters of the dehydration-responsive gene rd22 and many other genes in <i>Arabidopsis</i> .
MYB2AT	0	1	1	TAACCTG	MYB binding site involved in drought-inducibility
MYB2CONSENSUSAT	1	2	2	YAACKG	MYB recognition site found in the promoters of the dehydration-responsive gene rd22 and many other genes in <i>Arabidopsis</i> ; Y=C/T; K=G/T.
MYBCORE	1	2	2	CNGTTR	Binding site for all animal MYB and at least two plant MYB proteins ATMYB1 and ATMYB2, both isolated from <i>Arabidopsis</i> ; ATMYB2 is involved in regulation of genes responsive to water stress in <i>Arabidopsis</i> .
PREATPRODH	1	1	0	ACTCAT	PRE (Pro- or hypoosmolarity-responsive element) found in the promoter region of proline dehydrogenase (ProDH) gene in <i>Arabidopsis</i> ; core of 9-bp sequence ACTCATCCT necessary for the efficient expression of ProDH in response to L-Pro and hypoosmolarity.
PRECONSCRHS P70A	1	0	0	SCGAYNRNN NNNNNNNN NNNNNHD	Consensus sequence of PRE (plastid response element) in the promoters of HSP70A in <i>Chlamydomonas</i> ; involved in induction of HSP70A gene by both MgProto and light.
SEF4MOTIFGM7S	6	6	5	RTTTTTTR	SEF4 binding site; soybean (<i>G.max</i>) consensus sequence found in 5'upstream region (-199) of beta-conglycinin (7S globulin) gene (Gmg17.1); binding with SEF4 (soybean embryo factor 4).
POLASIG	23	22	24	AATAAA/AAT TAAA/AATAA T	Plant polyA signal; consensus sequence for plant polyadenylation signal.
SORLREP3AT	1	1	0	TGTATATAT	Sequences Over-Represented in Light-Repressed Promoters (SORLREPs) in <i>Arabidopsis</i> ; computationally identified phyA-repressed motifs.
TATABOX	16	15	17	TATTAAT/TA TATAA/TTAT TT	TATA box, sequence and spacing of TATA box elements are critical for accurate initiation.
TCA-element	0	0	1	CCATCTTTTT	<i>Cis</i> -acting element involved in salicylic acid responsiveness.

Table R4. Cis-regulatory elements in 5' UTR of HKT1;2 genomic sequences of *S. lycopersicum* cv. Cerasiforme, NIL157-14 (CC) and NIL157-17 (LL) affected by sequence polymorphism indicated in Figure R12. Sequence corresponding to *S. lycopersicum* cv. Heinz 1709 (H) was used as a reference (Soly07g014680.2.1). Frequencies in each NIL/cultivar are indicated. Promoter sequences were searched against PLACE (Higo *et al.*, 1999), PlantCare (Lescot *et al.*, 2002) and NSITE-PL (<http://linux1.softberry.com>) databases and tools. N14, NIL14; N17, NIL17.

REGULATORY ELEMENT	H	N17	N14	SEQUENCE	FUNCTION
ARR1AT	13	13	12	NGATT	ARR1-binding element" found in <i>Arabidopsis</i> ; ARR1 is a cytokinin-regulated transcription factor.
CAAT	7	7	8	CAAAT	Common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions.
CACTFTPPCA1	18	18	17	YACT	Tetranucleotide (CACT) is a key component of Mem1 (mesophyll expression module 1) found in the <i>cis</i> -regulatory element in the distal region of the phosphoenolpyruvate carboxylase (ppcA1) of the C4 dicot <i>F. trinervia</i> ; Y=T/C.
HSE	1	2	1	AAAAAATTTC	<i>Cis</i> -acting element involved in heat stress responsiveness.
PRECONSCRHSP 70A	1	1	2	SCGAYNRNN NNNNNNNN NNNNNHHD	Consensus sequence of PRE (plastid response element) in the promoters of HSP70A in <i>Chlamydomonas</i> ; involved in induction of HSP70A gene by both MgProto and light.

En todas las comparaciones de las secuencias genómicas de HKT1;1 y HKT1;2 llevadas a cabo se utilizó como referencia el genoma secuenciado de *S. lycopersicum* Cv. Heinz (<http://solgenomics.net/>). Actualmente, es posible obtener las secuencias completas de todas las variantes alélicas de 360 cultivares y especies de tomate (incluyendo las de nuestro interés) mediante análisis *in silico*, realizando un *blast* de las secuencias de cDNA de HKT1 con la secuencia completa de la especie de tomate *S. lycopersicum* cv. Heinz (https://solgenomics.net/organism/Solanum_lycopersicum/tomato_360). Esto confirmaba la localización en tándem de las secuencias genómicas de HKT1;1 y HKT1;2, en la misma región, separadas únicamente por aproximadamente 5.8 Kb. Esta localización en tándem respalda nuestros resultados previos obtenidos mediante análisis genético (Apartado R2.1), en los cuales ambas isoformas se localizaban juntas en el cromosoma 7, en una posición genómica que solapaba con la posición de máxima significación del valor del QTL (LOD), lkc7.1 (Fig. R7) (Asins *et al.*, 2013).

2.2.2. Análisis funcional de las variantes alélicas de SI/SchKT1;1 y SI/SchKT1;2 en levaduras

Con objeto de evaluar si el cambio observado en la secuencia codificante de SchKT1;1 con respecto a la de SIHKT1;1 (G658C, V222L) puede reportar características bioquímicas diferenciales que expliquen su contribución fisiológica al QTL *lkc7.1*, se evaluó la actividad y modo de transporte de cada variante alélica mediante su expresión heteróloga en la cepa de levadura *WΔ6* defectiva en los transportadores de K⁺ endógenos mayoritarios (*Δtrk1* y *Δtrk2*), utilizando para ello el método de la filtración (Haro *et al* 2005, Bañuelos *et al* 2008). De esta forma, puesto que SIHKT1;2 no mostró ninguna actividad de transporte para Na⁺ o K⁺ mediante el método de la depleción del catión del

medio externo de la levadura (apartado R1.4), se evaluó de nuevo su actividad y modo de transporte mediante el método de la filtración.

Inicialmente, los ORFs de *ScHKT1;1* y *SlHKT1;1*, así como el de *SlHKT1;2* (*HKT1;2* de *S. lycopersicum* y *S. cheesmaniae* tienen la misma secuencia aminoácídica), se clonaron como fragmentos *XbaI-KpnI* en el vector pYPGE15, bajo el control del promotor *PGK1* (Apartado M4.2) (Brunelli y Pall, 1993). Mediante el método de la filtración se analiza la cantidad de Na^+ que entra en la célula de levadura por unidad de tiempo y peso seco. En experimentos preliminares, la absorción de Na^+ por las levaduras que portaban las construcciones de *Sl/ScHKT1* incrementó de forma lineal en el intervalo de tiempo entre 20 y 60 minutos, y fue dependiente de la concentración de NaCl en el medio de incubación de las levaduras (Fig. R13A, B y C). Dicho incremento fue notablemente mayor en aquellas levaduras que expresaban *SlHKT1;1* que en aquellas que expresaban el vector vacío (Fig. R13A y C). Mientras que la absorción de Na^+ por levaduras que expresaban *HKT1;2* fue muy baja y prácticamente indistinguible de las que portaban el vector vacío (Fig. R13C), indicando de nuevo la ausencia de actividad transportadora de dicha isoforma (Apartado R1.4).

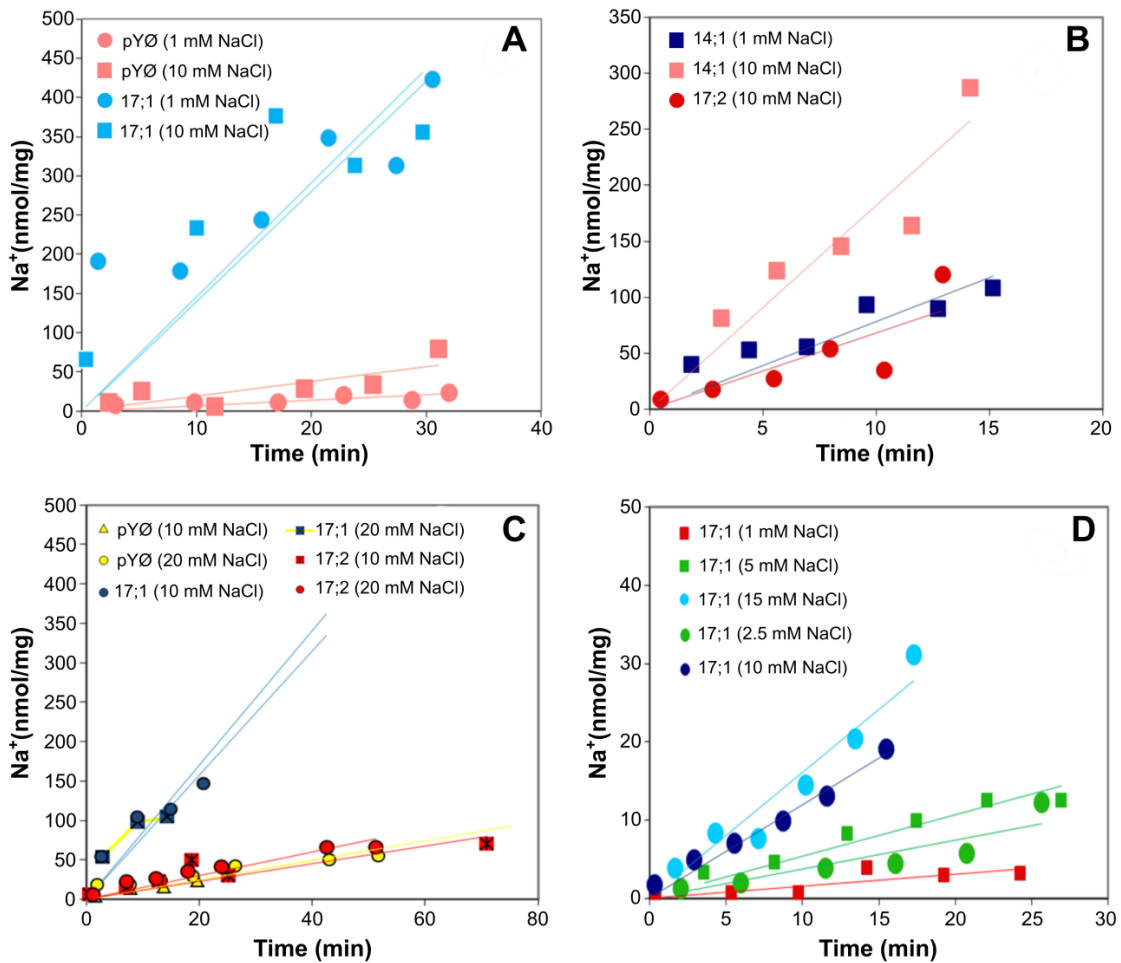


Figure R13. Time course of Na^+ uptake in $W\Delta 6$ yeast cells expressing different constructs bearing *SlHKT1* allelic variants cloned in the yeast shuttle vector pYPGE15 using the filtration method. K^+ -starved cells were incubated in assay buffer, 10 mM MES- Ca^{2+} , pH 6.0, supplemented with 2% (w/v) glucose. Samples were taken at different time intervals after the addition of NaCl. Na^+ was

determined by atomic emission spectrophotometry. pYØ, pYPEPG15 empty; 14;1, ScHKT1;1 (from NIL14); 17;1, SIHKT1;1 (from NIL17); 17;2, Sc/SIHKT1;2. Lines were drawn according to the functions that gave a better fit. In graph D, R^2 for regression lines ranged from 0.6 to 0.97. Each graph is representative of 2-4 independent assays.

Debido a esta ausencia de actividad transportadora de Sl/ScHKT1;2, en una segunda serie de experimentos, se intentó una nueva estrategia, clonándose las diferentes versiones génicas en el vector pDR196/MCS, mediante la técnica de clonaje *in vivo* en levaduras (Apartado M4.2.1). Además de SIHKT1;1 y ScHKT1;1, se utilizaron dos versiones diferentes de la proteína Sl/ScHKT1;2. Una de ellas, la versión completa o *Full Length* (FL), y la otra, carecía de UTR en el extremo 5' (NUT, *non-UTR*), predicho en la secuencia genómica de *HKT1;2* (Fig. R1; Apartado R1.2), anotada por el ITAG 2.40 (<https://solgenomics.net/>), por si la presencia o ausencia de dicho fragmento pudiera condicionar la actividad del transportador. Las actividades de transporte de Na^+ en función de la concentración de Na^+ en el medio externo se determinaron usando la pendiente calculada a partir de la ecuación de regresión ajustada a una recta en cada concentración de Na^+ (Fig. R14F). De nuevo, la actividad de transporte de Na^+ de levaduras que portaban tanto la versión FL como NUT de Sl/ScHKT1;2, incrementó de forma lineal, pero no saturable, con la concentración de Na^+ en el medio de incubación, siendo prácticamente igual al modo de absorción de Na^+ mostrado por las cepas que portaban el vector vacío (Fig. R14A, B y C). Ello indicaba la ausencia de transporte mediada por una proteína transportadora activa funcional. Por otro lado, las levaduras que portaban las construcciones de HKT1;1 exhibían una cinética de saturación para la absorción de Na^+ similar a la de *Michaelis-Menten* (Fig. R14D y E). Esto permitió obtener los parámetros cinéticos de afinidad, K_m aparente y $V_{\max}$, aplicando la conversión de *Lineweaver-Burk* (Fig. R14D y F).

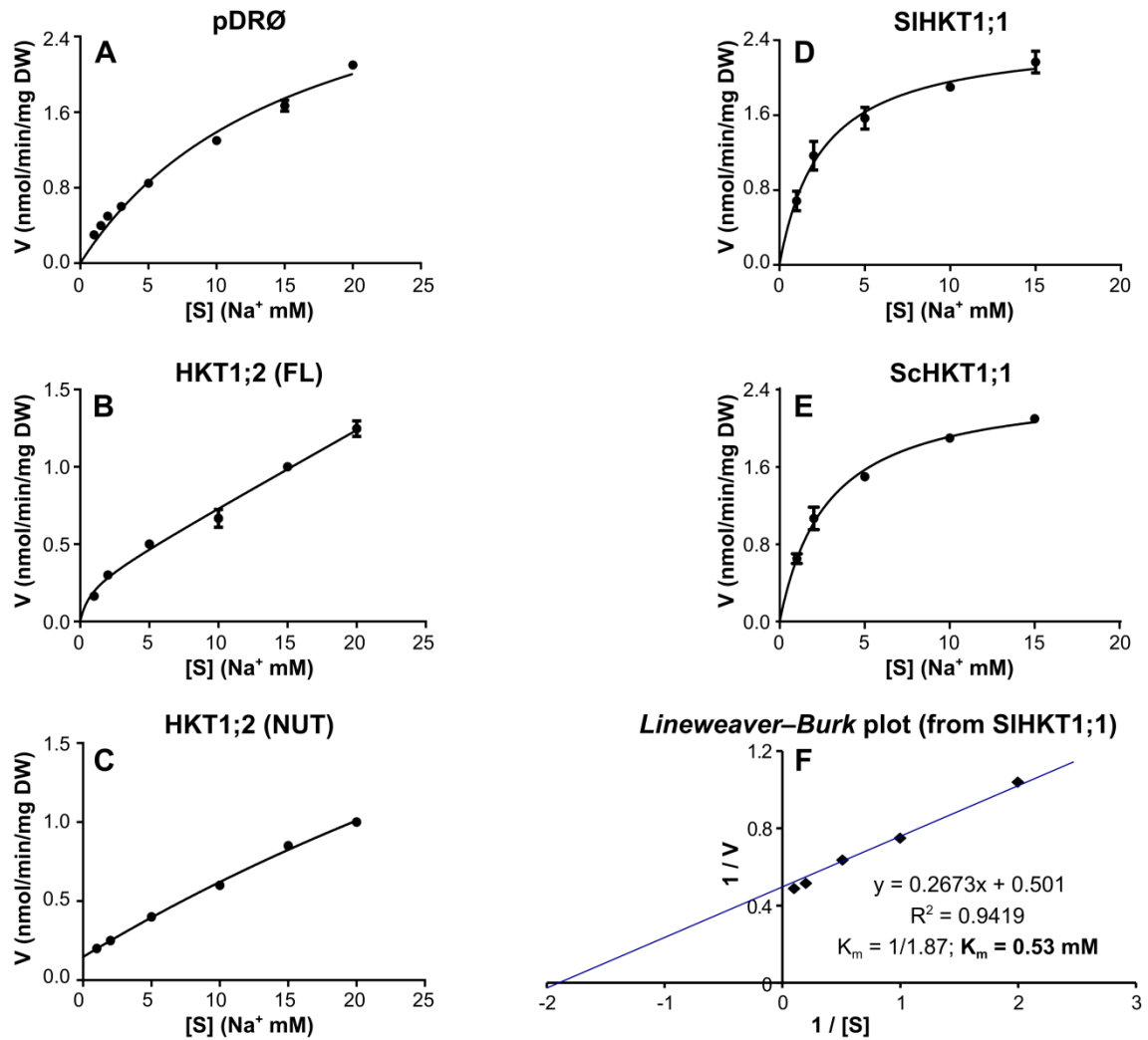


Figure R14. Na^+ uptake activity by W Δ 6 yeast cells expressing different constructs bearing SIHKT1 allelic variants cloned in the yeast shuttle vector pDR196. K^+ -starved cells were incubated in assay buffer, 10 mM MES- Ca^{2+} , pH 6.0, supplemented with 2% (w/v) glucose. Lines were drawn according to the functions that gave a better fit. Na^+ transport activities (in nmol/min/mg DW) as a function of substrate (Na^+ concentration) in the external medium, were determined using the slope calculated from the regression equation of values, adjusted to a straight line at each Na^+ concentration as in Fig. R12F. Na^+ was determined by atomic emission spectrophotometry. **A)** pDRØ, pDR196 empty. **B)** Sc/SIHKT1;2 (FL). **C)** Sc/SIHKT1;2 (NUT). **D)** SIHKT1;1 (from NIL17). **E)** ScHKT1;1 (from NIL14). **F)** Lineweaver-Burk plot, derived from Michaelis-Menten curves (as in D and E).

Las constantes de afinidad, K_m aparente y $V_{\max}$, calculadas a partir de las curvas de actividad de transporte de Na^+ mediante la representación de Lineweaver-Burk, se determinaron en diferentes ensayos, mostrándose muy variables (Tabla R5). Esta variabilidad se observaba tanto en la K_m como en la $V_{\max}$, sobre todo en el caso de la variante alélica de ScHKT1;1, siendo las diferencias más pronunciadas en el caso de la $V_{\max}$ (Tabla R5, celdas azules). No obstante, la versión alélica de SIHKT1;1 aparentemente tuvo una mayor afinidad para el transporte de Na^+ que la de ScHKT1;1 con los dos vectores de expresión utilizados (Tabla R5, celdas amarillas).

Table R5. Kinetic parameter K_m (mM), V_{max} (nmolmin⁻¹mg⁻¹ DW) for Na⁺ influx in the yeast mutant WΔ6 expressing different HKT1 constructs determined in different assays by filtration method. pY, pYPGE15; pDR, pDR196; ND, not detected; --, not determined.

	K_m				V_{max}			
Assay	1	2	3	4	1	2	3	4
Constructions								
pY	6.0	20.0	10.0	--	1.25	6.67	--	--
pDR	16.0	17.0	--	--	3.6	2.50	--	--
pY-SlHKT1;1	0.22	0.21	0.25	--	7.41	6.06	12.05	--
pDR-SlHKT1;1	0.53	--	--	--	2.2	--	--	--
pY-ScHKT1;1	1.25	1.0	0.55	1.9	5.0	6.67	4.15	7.35
pDR-ScHKT1;1	2.87	--	--	--	2.50	--	--	--
pY-Sl/ScHKT1;2 (FL)	ND	ND	ND	--	ND	ND	ND	--
pDR-Sl/ScHKT1;2 (FL)	ND	--	--	--	ND	--	--	--
pDR-Sl/ScHKT1;2 (NUT)	ND	--	--	--	ND	--	--	--

R2.3. FENOTIPOS DE TOLERANCIA A LA SALINIDAD Y EXPRESIÓN GÉNICA DE HKT1; 1 Y HKT1; 2 EN NIL17 y NIL14

Un experimento de fenotipado de las NILs 14 y 17 utilizadas, llevado a cabo por el Grupo de Genética del IVIA de Valencia, en el cual las plantas fueron sometidas a un tratamiento de alta salinidad y posteriormente llevadas a producción durante siete semanas (contando a partir de la primera semana de la cosecha de la fruta), mostró que las líneas NIL14 (CC) y NIL17 (LL) presentaban diferencias significativas con respecto a todos los rasgos vegetativos, siendo la NIL17 considerablemente más vigorosa y ligeramente más productiva que la NIL14 (Tabla D3, ver Discusión). Así, por ejemplo, ocurrió con rasgos como el peso seco de planta y peso total de los frutos, de 12.81g y 2.83g en NIL14 frente a 23.03g y 8.50g en NIL17, respectivamente (Tabla D3, Asins *et al.*, 2013). Aunque, la salinidad afectó significativamente a todos los rasgos vegetativos y al peso medio de los frutos, ambas NILs se comportaron de manera similar cuando fueron sometidas a condiciones salinas, aumentando el peso medio de los frutos y disminuyendo los parámetros de crecimiento y de contenido de agua, excepto en los rasgos relacionados con el crecimiento de la raíz, para los cuales mostraron diferencias significativas con respecto al tratamiento (interacciones NIL x tratamiento). La salinidad afectó menos a la NIL14 en cuanto al peso seco (2.73g a 2.42g), al peso fresco de la raíz (8.97g a 7.09g), así como al peso seco de la planta completa (12.81g a 10.67g), en comparación con la NIL17 (9.24 a 4.28g; 25.09g a 14.30g y 23.03 a 14.46g, respectivamente). Es decir, según este criterio, podría considerarse que la línea NIL14 es más tolerante a la salinidad que la NIL17. Sin embargo, en términos absolutos, el crecimiento y la producción bajo salinidad fue mayor para la NIL17 que para la NIL14 (Asins *et al.*, 2013).

Asimismo, en ese mismo experimento, se encontraron diferencias significativas entre las NILs para la concentración de K⁺ y la razón Na⁺/K⁺ en todos los tejidos, pero no para la concentración de Na⁺ (Asins *et al.*, 2013). La concentración de Na⁺ en la raíz solo presentó diferencias significativas en el caso de NIL17, cuando se comparaba entre control

y tratamiento salino. La razón Na⁺/K⁺ en hojas fue significativamente mayor en NIL14 que en NIL17 en condiciones salinas, mientras que la salinidad aumentó significativamente la concentración de Na⁺ y la razón Na⁺/K⁺ en todos los tejidos y redujo notablemente la concentración de K⁺ en hojas. Cabe señalar que ambas líneas se comportaron de manera diferente (interacción NIL x tratamiento significativa) en relación a la concentración de Na⁺ y K⁺ de la raíz. A pesar de que las NILs no diferían significativamente en cuanto a las concentraciones de Na⁺ de hojas y tallos, la concentración de Na⁺ en la raíz de NIL17 aumentó bruscamente, mientras que en NIL14 no ocurrió así. Ambas NILs difieren en cuanto a la concentración de K⁺ en condiciones control (baja salinidad), registrando los alelos de *cheesmaniae* los niveles más altos. Sin embargo, al igual que en el análisis del QTL (con la población de RILs completa), los alelos de *cheesmaniae* en la NIL se asocian con concentraciones de K⁺ más bajas que los alelos de *lycopersicum* en la parte aérea de la planta (hojas y tallo) (Villalta *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta todos estos datos de ionómica, para comprobar si había una conexión entre la acumulación de Na⁺ y K⁺ y los genes *HKT1* de tomate, se analizaron los parámetros de expresión de dichos genes en diferentes tejidos de ambas NILs. Como ya se ha mencionado, un análisis preliminar mediante RT-PCR indicó que *SlHKT1;1* y *SlHKT1;2* se expresaban en todos los tejidos analizados del tomate cultivado (hojas, tallos, raíces, flores y frutos) en condiciones normales de crecimiento (Fig. R4, Apartado R1.3). El análisis de la expresión génica de *HKT1;1* y *HKT1;2* en ambas NILs se llevó a cabo por RT-qPCR. Previamente observamos que la expresión del gen de referencia, *LeEF1-α*, que normaliza las medidas de expresión, fue muy estable en el tiempo, independientemente de las NILs, tejidos y días de tratamiento salino (Fig. R15).

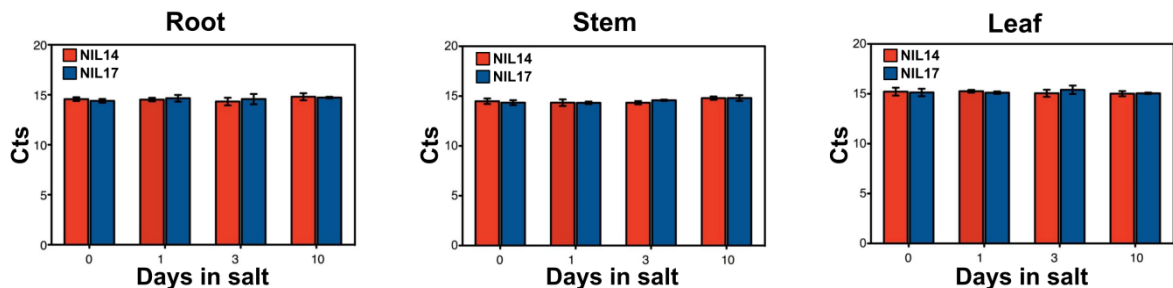


Figure R15. Stability of tomato EF1-α gene expression (expressed as cycle threshold -Cts-) in response to salt stress treatment in NIL14 (CC) and NIL17 (LL). Total RNA was purified from leaf, stem and root of tomato plants treated with 100 mM NaCl for 0, 1, 3 and 10 days in hydroponic cultures. Transcript level was analyzed by RT-qPCR using primers indicated in Table M20. Error bars indicate the SD from nine repeats for stems and leaves (three biological and three analytical repeats), and twelve repeats for roots (four biological and three analytical repeats).

El análisis mediante RT-qPCR reveló un patrón complejo de expresión de *HKT1;1* y *HKT1;2*, que fue esencialmente dependiente del tejido y de la NIL y en algunos casos, dependiente del tratamiento (Fig. R16). La salinidad aumentó claramente los niveles de expresión de *SlHKT1;2* en las raíces de NIL17, mientras que en NIL14, la expresión de *ScHKT1;2* fue inducida únicamente 10 días después de comenzar el tratamiento salino (Fig. R16). La expresión de *SlHKT1;2* en hojas se redujo al aplicar el tratamiento salino

(Fig. R16). Un comportamiento similar se observó para *ScHKT1;2* (los niveles de expresión disminuyeron 1 día después de comenzar el tratamiento salino). Los niveles de expresión de *SlHKT1;2* en las raíces de NIL17 fueron considerablemente más altos que los de *ScHKT1;2* en NIL14 (Fig. R16). La expresión del alelo *lycopersicum* en hojas fue despreciable, mientras que el alelo *cheesmaniae* se expresó en hojas a niveles similares a los de la raíz (Fig. R16). En tallos, la expresión de ambos alelos de *HKT1;2* fue aproximadamente de 1/4 con respecto a la muestra de referencia (alelo *lycopersicum* en raíz de NIL 17, 0 días de tratamiento salino) y no se observaron diferencias con respecto a las NILs (Fig. R16). Con respecto a *HKT1;1*, la tendencia general fue una disminución de su expresión en tallos y hojas al aplicar el tratamiento salino en ambas NILs (Fig. R16). En tallos, la expresión de ambos alelos de *HKT1;1* mostró un patrón análogo, con niveles de expresión similares a los de la muestra calibradora en condiciones control, mientras que al aplicar el tratamiento salino, los niveles de expresión disminuyeron a la mitad (Fig. R16). Los niveles de expresión de *HKT1;1* en NIL14 fueron mucho más elevados en raíces y especialmente en hojas que los de *HKT1;1* en NIL17, independiente de los días de tratamiento, alcanzando niveles de expresión 20 y 25 veces mayores, respectivamente, que los de la muestra calibradora. Sin embargo, estos niveles disminuyeron al aplicar el tratamiento salino en raíces (Fig. R16). Con respecto a las dos isoformas, *HKT1;2* siempre se expresó considerablemente más que *HKT1;1*, independientemente del tiempo de tratamiento y del tejido estudiado (Fig. R17).

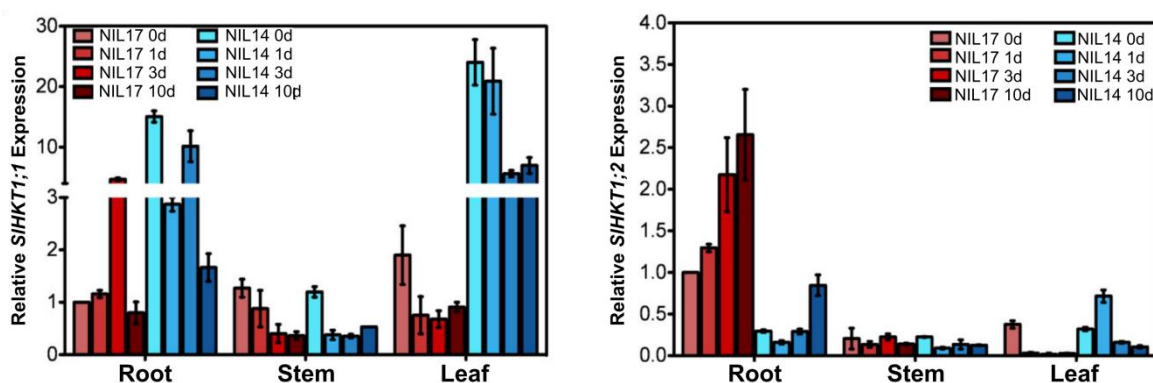


Figure R16. Relative gene expression of *SlHKT1;1* and *SlHKT1;2* in response to salt stress in NIL14 (CC) and NIL17(LL). Total RNA was purified from the leaf, stem and root of tomato plants treated with 100 mM NaCl for 0, 1, 3 and 10 days in hydroponic cultures. Transcript level was analyzed by RT-qPCR using primers indicated in Table M20. The tomato elongation factor gene (*LeEF1-a*) was used as the reference gene. The relative expression level was calculated by using as the calibrator sample the expression level of each gene in roots of NIL17 at day 0 of NaCl treatment (equal to 1). Error bars indicate the SD from nine repeats for stems and leaves (three biological and three analytical repeats) and twelve repeats for roots (four biological and three analytical repeats).

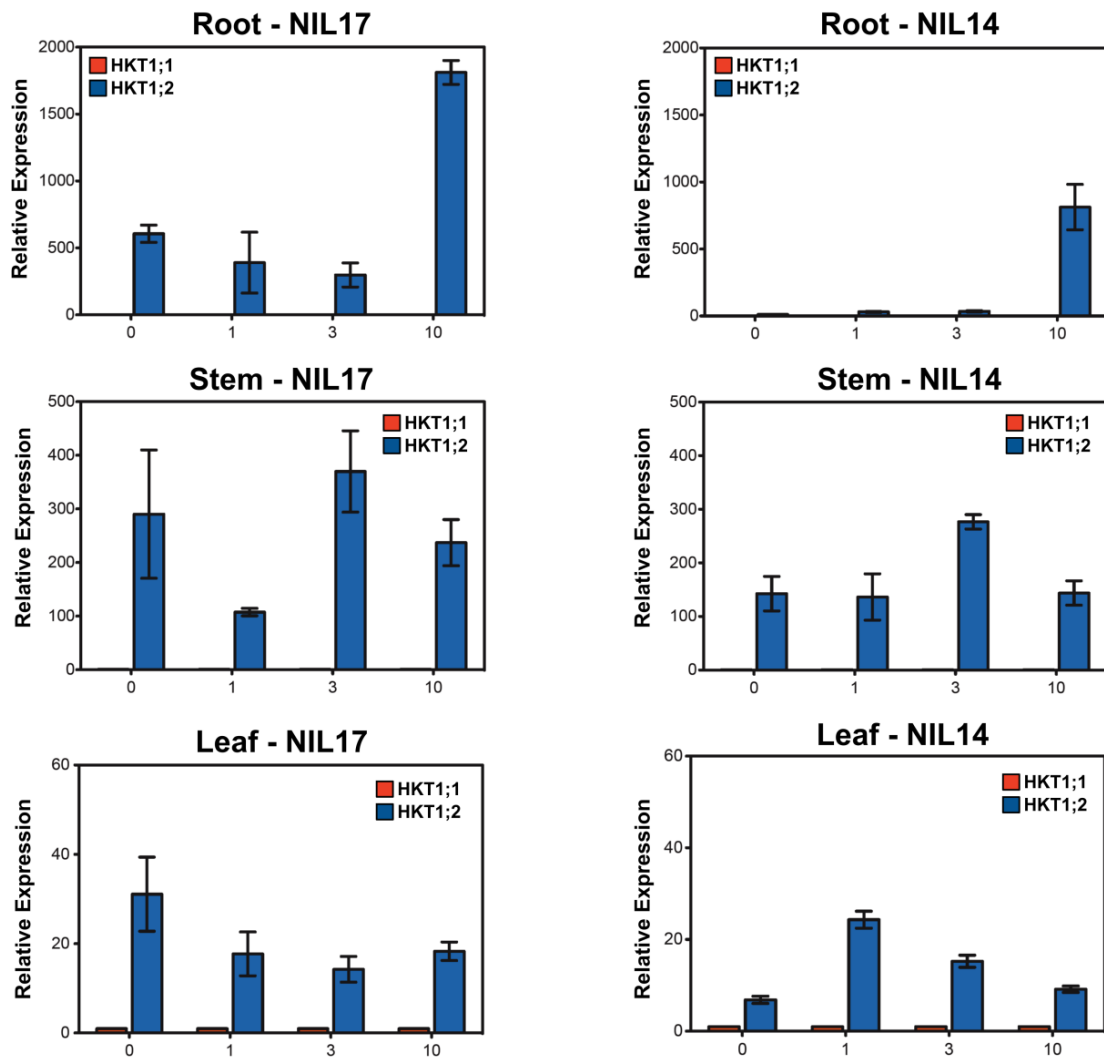


Figure R17. Comparison between the relative gene expression of tomato *HKT1;1* and *HKT1;2* in response to salt stress in NIL14 (CC) and NIL17(LL). Total RNA was purified from leaf, stem and root of tomato plants treated with 100 mM NaCl for 0, 1, 3 and 10 days in hydroponic cultures. Transcript level was analyzed by RT-qPCR using primers indicated in Table M20. Tomato elongation factor gene (*LeEF1-a*) was used as reference gene. The relative expression level was calculated using as calibrator sample the expression level of *HKT1;1* in each tissue from each NIL at each day of NaCl treatment (equal to 1). Error bars indicate the SD from nine repeats for stems and leaves (three biological and three analytical repeats), and twelve repeats for roots (four biological and three analytical repeats).

Estos resultados de expresión génica fueron muy similares a los obtenidos en estudios transcriptómicos provenientes del *eFP tomato Browser* (Rose_Lab_Atlas, Bio-Analytic Resource -BAR- University of Toronto, Winter et al. (2007), <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Dichos estudios confirman que en términos absolutos, la expresión de *SlHKT1;2* es mucho mayor que la de *SlHKT1;1* en cualquier tejido (Fig. R18). Asimismo, confirman que la expresión de la variante *cheesmaniae* de *HKT1;1* en la hoja es siempre mayor que la de la variante alélica en la hoja del tomate cultivado, asumiendo que la primera variante de *cheesmaniae* es muy similar a la de la especie silvestre *S. pimpinellifolium* (Fig. R18).

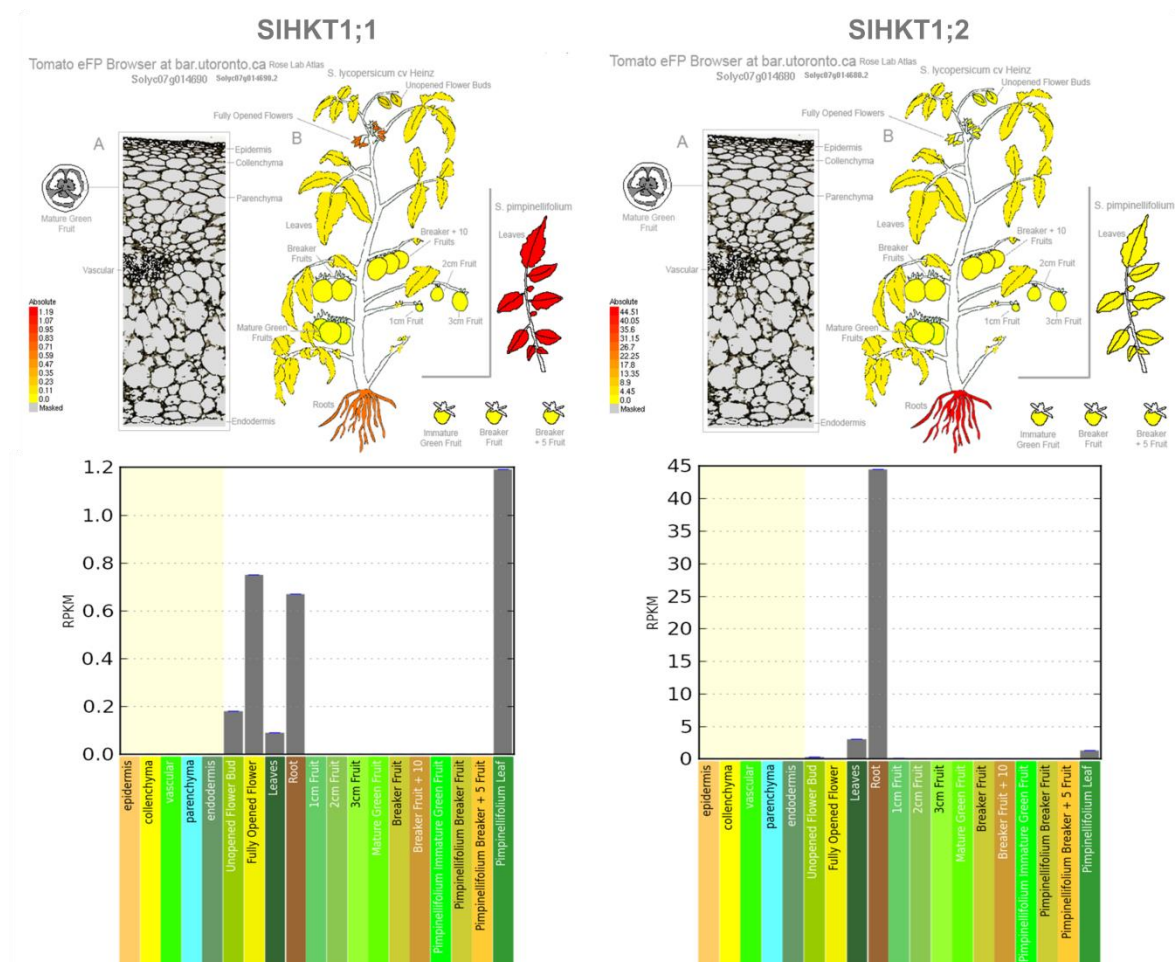


Figure R18. Expression data of *SIHKT1;1* (Soly07g014690) and *SIHKT1;2* (Soly07g014680) in different tissues of *S. lycopersicum* Cv Heinz obtained from the *eFP tomato Browser*. Expression data in leaves of *S. pimpinellifolium* is included. Rose_Lab Atlas was used as data resource (Bio-Analytic Resource -BAR- of University of Toronto, Winter *et al.* (2007), <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>).

R2.4. ANÁLISIS FUNCIONAL DE *Sc/SIHKT1;1* Y *Sc/SIHKT1;2* IN PLANTA MEDIANTE SILENCIAMIENTO GÉNICO POR RNAi.

Hasta aquí, los datos genéticos (proximidad genética y física con el máximo de LOD de los QTLs implicados) obtenidos por el Grupo de Genética del IVIA de Valencia, en combinación con los datos moleculares (variación alélica en las secuencias y análisis de expresión), obtenidos en el presente trabajo, han permitido identificar a *HKT1;1* y *HKT1;2* como los principales genes candidatos responsables del QTL mayoritario implicado en la homeostasis de Na^+/K^+ en tomate (Asins *et al.* 2013). Dado el estrecho ligamiento existente entre *HKT1;1* y *HKT1;2* en tomate (Asins *et al.* 2013), en el siguiente apartado se aplicará una estrategia basada en el silenciamiento génico por RNAi para determinar qué locus *HKT1* (*HKT1;1* y/o *HKT1;2*) juega un papel principal en la homeostasis de Na^+/K^+ de la parte aérea en condiciones salinas, en la líneas NIL17 y NIL14, diferenciadas en el alelo *cheesmaniae* o *lycopersicum* de cada locus. Para ello, en colaboración con el grupo del Dr. Vicente Moreno, IBMCP-Universidad Politécnica de Valencia (UPV), se generaron

líneas de plantas de tomate transgénicas, de expresión reducida para *HKT1;1* y *HKT1;2*, mediante construcciones *RNAi* para dichas isoformas, a partir de ambas NILs.

R2.4.1. Selección de líneas silenciadas de tomate. Genotipado de plantas T₀ de tomate mediante PCR

A partir de los transformantes primarios independientes (T₀), que se generaron en las líneas NIL14 y NIL17, el Grupo de Cultivo *in vitro* y Mejora Vegetal de la IBMCP-UPV, seleccionó 18 líneas diploides mediante citometría de flujo (Ellul *et al.*, 2003). Ya en nuestro laboratorio, dichas líneas se genotiparon mediante PCR diagnóstica (Fig. R19). Mediante estos análisis se detectó la presencia de las construcciones de *RNAi* que portaban fragmentos de DNA de *HKT1;1* o *HKT1;2*. Las plantas transgénicas se consideraron positivas cuando, utilizando DNA genómico y oligonucleótidos específicos, amplificaron tanto la banda del gen *NPTII* (800 pb), como los fragmentos de 802 pb (para *HKT1;1*) o de 682 pb (para *HKT1;2*), en este último caso utilizando los oligos específicos de pKANNIBAL, que flanquean los respectivos fragmentos de cDNA sentido (Tabla M17, Fig. M13).

Los análisis de PCR mostraron que de las 18 plantas T₀ diploides, únicamente 12 amplificaron banda con ambas parejas de oligos y se consideraron por tanto como plantas positivas, siendo seleccionadas para continuar con estudios posteriores (Fig. R19, líneas marcadas en negro). Las 6 líneas restantes (marcadas en rojo en la Fig. R19) se consideraron negativas y por consiguiente, se descartaron.

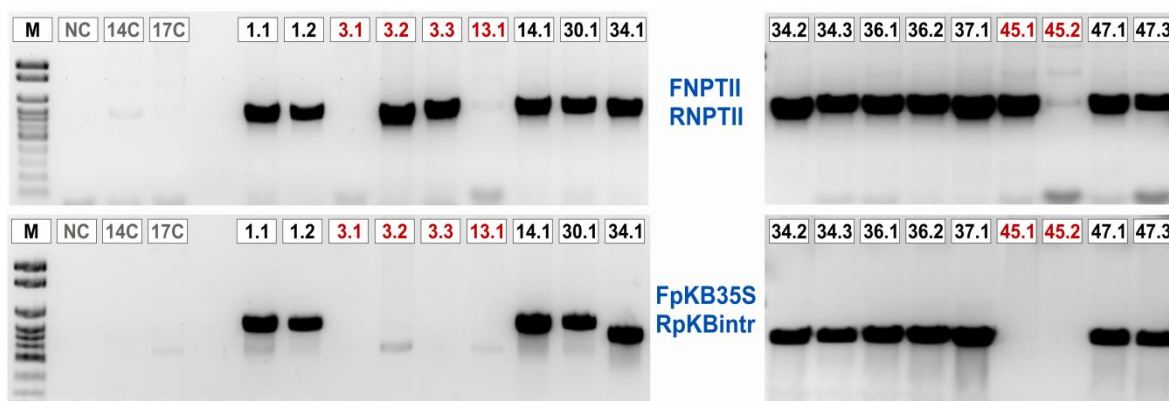


Figure R19. Diagnostic PCR to detect the presence of *RNAi* constructs bearing the *HKT1;1/HKT1;2* DNA fragments in primary transformants lines (T₀ plants) in two tomato NILs. Transgenic plant were considered as positive when amplified PCR bands using genomic DNA and specific primers for *NPTII* gene (800 bp, upper panel), in addition to the presence of an expected fragments of 802 bp for *HKT1;1* and 682 bp for *HKT1;2*, using *pKANNIBAL*-specific primers flanking the respective cDNA sense fragments (lower panel) (Table M17). Lanes 17C and 14C are NIL17 and NIL14 lines, respectively, transformed and regenerated without a silencing construct (WT phenotype). Lane M (marker) is a 100-2000 bp ladder and lane NC is a PCR negative control. Lines marked in red were considered as negative, while those marked in black were considered as positive.

R2.4.2. Análisis de expresión de plantas T₀ de tomate mediante RT-qPCR

Se aisló el RNA total de tres muestras biológicas diferentes, procedentes de los transformantes primarios (T₀), para llevar a cabo análisis de expresión génica utilizando la técnica de RT-qPCR. Estos análisis confirmaron que las líneas seleccionadas presentaron una expresión génica reducida para cada locus *HKT1* en comparación con la de su correspondiente NIL no silenciada (NIL14C o NIL17C, plantas que sufrieron el proceso completo de transformación y posterior regeneración, pero que no portaban la construcción de silenciamiento) (Fig. R20).

Aquellas líneas que presentaron una expresión génica de *HKT1;1* o *HKT1;2* claramente reducida en las tres muestras biológicas se seleccionaron para llevar a cabo los estudios de segregación, previos a la evaluación fenotípica. Concretamente, en el caso de NIL14, las líneas 1.2 (silenciada para *ScHKT1;1*), 47.1 y 47.3 (silenciadas para *ScHKT1;2*) se consideraron las más apropiadas, mientras que la línea 1.1 (silenciada para *ScHKT1;1*) fue descartada (Fig. R20). En el caso de NIL17, las líneas 14.1, 30.1 (silenciadas para *SlHKT1;1*), 34.1, 34.3, 36.1 y 36.2 (silenciadas para *SlHKT1;2*) parecieron ser las más idóneas para continuar con nuestros estudios, mientras que las líneas 34.2 y 37.1 (ambas silenciadas para *SlHKT1;2*) se descartaron (Fig. R20).

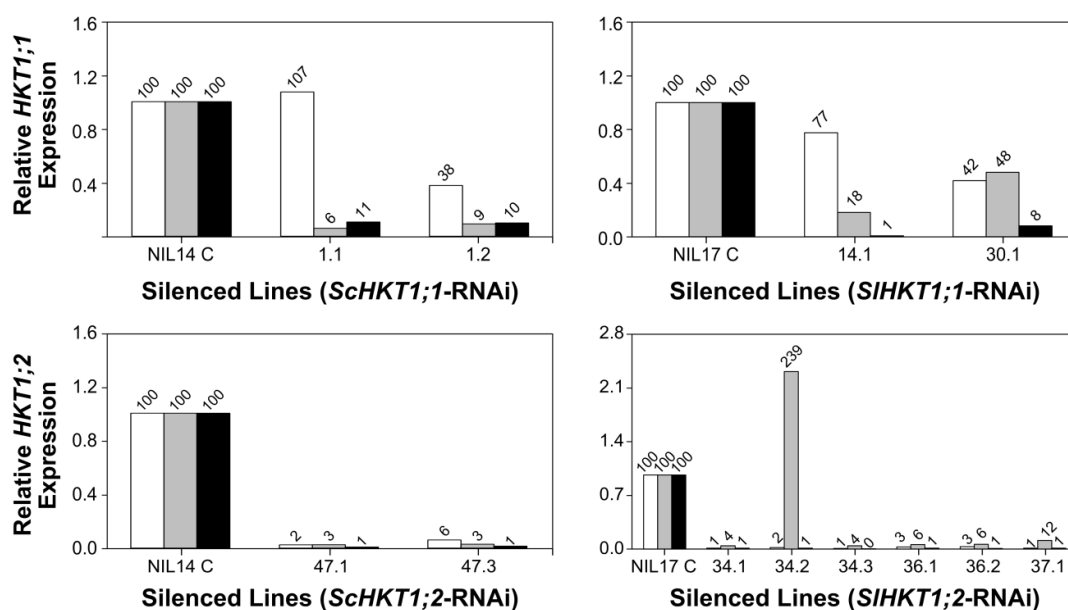


Figure R20. Gene expression determined by RT-qPCR in three different biological samples of different silenced lines of *HKT1;1/HKT1;2* allelic variants from *lycopersicum* and *cheesmaniae* in two tomato NILs. NIL17 C and NIL14 C lines are NIL157-17 and NIL157-14, respectively, transformed and regenerated without a silencing construct. Total RNA was isolated from root (white bars), leaf (gray bars) of regenerated primary transformants grown *in vitro* culture and leaf (black bars) of acclimated plants grown in pots in growth chamber. Numbers on top of bars represent % gene expression level respect to that of each non-silenced NIL17 C and NIL14 C.

R2.4.3. Estudio de segregación de plantas T₁ seleccionadas de tomate

Por último, se utilizaron semillas T₁ procedentes de las plantas seleccionadas previamente mediante análisis de genotipado y expresión para realizar estudios de segregación en respuesta a la Kanamicina y determinar así el patrón de herencia al que se

ajusta cada una de las líneas. Para ello, 30 semillas procedentes de aquellas líneas T₀ que fueron positivas según los ensayos de genotipado (Fig R20) y que además presentaban un bajo porcentaje de expresión en comparación con el de su correspondiente línea no silenciada (NIL14C o NIL17C, Fig. R20) se sembraron en botes de cultivo que contenían medio MS sólido (ver Figura M4) suplementado con 100 µg/ml de Kanamicina. Según nuestra hipótesis inicial, en este medio, las plántulas deberían crecer de acuerdo a un patrón de herencia dominante 3:1, típico de la estrategia de genética reversa, en el caso de contener una única copia de la construcción de silenciamiento de *RNAi*, o de acuerdo a un patrón 15:1, en el caso de contener dos copias de dicha construcción (Wesley *et al.*, 2001; Olías *et al.*, 2009a).

Para comprobar a cual de los dos patrones de herencia (3:1 o 15:1) se ajustaba mejor cada una de las líneas y determinar el número de copias de la construcción de silenciamiento de *RNAi* presentes en cada una de ellas, se utilizó el estadístico chi-cuadrado (χ^2) con un margen de error del 5% (Griffiths *et al.*, 2000). Se hizo un recuento del número de plántulas resistentes (Kan^R) y sensibles (Kan^S) a la kanamicina observadas (O) a partir de las 30 semillas sembradas inicialmente y se comparó con el número de plántulas Kan^R y Kan^S esperadas (E) según nuestra hipótesis inicial. En el caso de haber una única copia de la construcción de silenciamiento (es decir, el patrón de herencia se ajusta a 3 Kan^R: 1 Kan^S), E sería 22.5 Kan^R: 7.5 Kan^S, mientras que en el caso de haber dos copias (patrón de herencia correspondiente a 15 Kan^R: 1 Kan^S), E sería 28 Kan^R: 2 Kan^S. La ecuación general para calcular χ^2 es la siguiente:

$$\text{Calculated } \chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Equation R1. Calculation of the chi-square statistic (χ^2).

En la cual, E = número esperado en una clase, O = número observado en una clase y Σ indica “sumatorio”.

Para convertir el valor de χ^2 en una probabilidad se utiliza la Tabla R6, la cual muestra los valores de χ^2 para diferentes grados de libertad (df, del inglés *degrees of freedom*). Generalmente, el número de grados de libertad (representado como las diferentes filas de la Tabla R6) es igual al número de clases menos 1. En este caso, el número de clases sería 2, ya que tenemos plántulas Kan^R y Kan^S. Por lo tanto, el número de grados de libertad sería 2 - 1 = 1. Si miramos en la tabla R6 a lo largo de la fila correspondiente a 1 grado de libertad y vemos en qué punto se cruza con la probabilidad de error del 5% ($p \leq 0.05$), encontramos que el valor de χ^2 para establecer nuestro punto de corte es 3.841 (Tabla R6, recuadro rojo). Esto significa que cuando el valor de nuestra χ^2 calculada sea menor que 3.841, aceptaremos la hipótesis inicial (es decir, el patrón de herencia se ajustaría bien a 3:1 o 15:1, según hubiera una o dos copias de la construcción de silenciamiento *RNAi* respectivamente).

Table R6. Critical values of the χ^2 distribution.

df	P									df
	0.995	0.975	0.9	0.5	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005	
1	0.000	0.000	0.016	0.455	2.706	3.841	5.024	6.635	7.879	1
2	0.010	0.051	0.211	1.386	4.605	5.991	7.378	9.210	10.597	2
3	0.072	0.216	0.584	2.366	6.251	7.815	9.348	11.345	12.838	3
4	0.207	0.484	1.064	3.357	7.779	9.488	11.143	13.277	14.860	4
5	0.412	0.831	1.610	4.351	9.236	11.070	12.832	15.086	16.750	5
6	0.676	1.237	2.204	5.348	10.645	12.592	14.449	16.812	18.548	6
7	0.989	1.690	2.833	6.346	12.017	14.067	16.013	18.475	20.278	7
8	1.344	2.180	3.490	7.344	13.362	15.507	17.535	20.090	21.955	8
9	1.735	2.700	4.168	8.343	14.684	16.919	19.023	21.666	23.589	9
10	2.156	3.247	4.865	9.342	15.987	18.307	20.483	23.209	25.188	10
11	2.603	3.816	5.578	10.341	17.275	19.675	21.920	24.725	26.757	11
12	3.074	4.404	6.304	11.340	18.549	21.026	23.337	26.217	28.300	12
13	3.565	5.009	7.042	12.340	19.812	22.362	24.736	27.688	29.819	13
14	4.075	5.629	7.790	13.339	21.064	23.685	26.119	29.141	31.319	14
15	4.601	6.262	8.547	14.339	22.307	24.996	27.488	30.578	32.801	15

A mayor valor del estadístico χ^2 , mayor será la diferencia entre los valores observados y los teóricos de cada clase. Por consiguiente, las líneas con un valor de χ^2 más bajo se consideraron las más indicadas para continuar con nuestros estudios de evaluación fenotípica. Además, para estandarizar la elección de las líneas, únicamente se seleccionaron aquellas que tenían una sola copia de la construcción de silenciamiento. De esta manera, las líneas 47.3 y 36.2, silenciadas para *ScHKT1;2* y *SIHKT1;2* respectivamente, se descartaron por tener dos copias de la construcción de silenciamiento, mientras que las líneas 30.1, 34.3 y 36.1, silenciadas para *SIHKT1;1*, *SIHKT1;2* y *ScHKT1;2* respectivamente, se descartaron por presentar mayores diferencias entre los valores observados y los valores esperados de plántulas Kan^R y Kan^S (Tablas R7-R15).

Por tanto, tras aplicar los análisis de expresión (Apartado R2.4.2) y seleccionar aquellas líneas que contenían una sola copia de la construcción *RNAi*, las líneas 14.1 y 34.1, silenciadas en NIL17 para *SIHKT1;1* y *SIHKT1;2* respectivamente, y las líneas 1.2 y 47.1, silenciadas en NIL14 para *ScHKT1;1* y *ScHKT1;2*, respectivamente, se consideraron las más apropiadas para llevar a cabo los estudios de evaluación fenotípica (Tablas R7-R15).

Tables R7-R15. Segregation analysis of different *HKT1;1/HKT1;2* silenced lines of from *S. lycopersicum* and *S. cheesmaniae* in response to kanamycin. 30 seeds from T₀positive lines (see Fig R18) with low % gene expression level respect to that of each non-silenced NIL17C and NIL14C (see Fig. R19) were sown in solid MS medium supplemented with kanamycin (100 µg/ml), in which were supposed to grow according to a monogenic and dominant inheritance pattern 3:1 (3 Kan^R: 1 Kan^S, with one copy of the silencing *RNAi* construct) or 15:1 (15 Kan^R: 1 Kan^S, with two copies of the silencing *RNAi* construct). This hypothesis was tested by the chi-square statistic (χ^2). The calculated chi-square was compared with the tabular value (χ^2_{1df} , 0.05 level of probability = 3.841) for each silenced line in order to accept or reject the hypothesis and select the lines for further studies. Kan^R, kanamycin-resistant seedlings; Kan^S, kanamycin-sensitive seedlings; O, Observed seedlings; E, Expected seedlings; T, Total number of seeds.

Table R7. Line 1.2

Classes	O	E (3:1)	(O - E) ² / E
Kan ^R	24	22.5	0.1
Kan ^S	6	7.5	0.3
T	30	30	$\chi^2 = 0.4$

Calculated $\chi^2 = 0.4$
 Tabular $\chi^2_{1df} (0.05) = 3.841$
 Calculated $\chi^2 < \text{Tabular } \chi^2$
Hypothesis accepted

Table R8. Line 14.1

Classes	O	E (3:1)	(O - E) ² / E
Kan ^R	25	22.5	0.278
Kan ^S	5	7.5	0.833
T	30	30	$\chi^2 = 1.111$

Calculated $\chi^2 = 1.111$
 Tabular $\chi^2_{1df} (0.05) = 3.841$
 Calculated $\chi^2 < \text{Tabular } \chi^2$
Hypothesis accepted

Table R9. Line 36.1

Classes	O	E (3:1)	(O - E) ² / E
Kan ^R	17	22.5	1.344
Kan ^S	13	7.5	4.033
T	30	30	$\chi^2 = 5.377$

Calculated $\chi^2 = 5.377$
 Tabular $\chi^2_{1df} (0.05) = 3.841$
 Calculated $\chi^2 > \text{Tabular } \chi^2$
Hypothesis rejected

Table R10. Line 30.1

Classes	O	E (3:1)	(O - E) ² / E
Kan ^R	0	22.5	22.5
Kan ^S	30	7.5	67.5
T	30	30	$\chi^2 = 90$

Calculated $\chi^2 = 90$
 Tabular $\chi^2_{1df} (0.05) = 3.841$
 Calculated $\chi^2 > \text{Tabular } \chi^2$
Hypothesis rejected

Table R11. Line 47.1

Classes	O	E (3:1)	(O - E) ² / E
Kan ^R	20	22.5	0.278
Kan ^S	10	7.5	0.833
T	30	30	$\chi^2 = 1.111$

Calculated $\chi^2 = 1.111$
 Tabular $\chi^2_{1df} (0.05) = 3.841$
 Calculated $\chi^2 < \text{Tabular } \chi^2$
Hypothesis accepted

Table R12. Line 34.1

Classes	O	E (3:1)	(O - E) ² / E
Kan ^R	23	22.5	0.011
Kan ^S	7	7.5	0.033
T	30	30	$\chi^2 = 0.044$

Calculated $\chi^2 = 0.044$
 Tabular $\chi^2_{1df} (0.05) = 3.841$
 Calculated $\chi^2 < \text{Tabular } \chi^2$
Hypothesis accepted

Table R13. Line 47.3

Classes	O	E (15:1)	(O - E) ² / E
Kan ^R	29	28	0.036
Kan ^S	1	2	0.500
T	30	30	$\chi^2 = 0.536$

Table R14. Line 34.3

Classes	O	E (3:1)	(O - E) ² / E
Kan ^R	16	22.5	1.878
Kan ^S	14	7.5	5.633
T	30	30	$\chi^2 = 7.511$

Calculated $\chi^2 = 0.536$
 Tabular $\chi^2_{1df} (0.05) = 3.841$
 Calculated $\chi^2 < \text{Tabular } \chi^2$
Hypothesis accepted

Calculated $\chi^2 = 7.511$
 Tabular $\chi^2_{1df} (0.05) = 3.841$
 Calculated $\chi^2 > \text{Tabular } \chi^2$
Hypothesis rejected

Table R15. Line 36.2

Classes	O	E (15:1)	(O - E) ² / E
Kan ^R	27	28	0.036
Kan ^S	3	2	0.500
T	30	30	$\chi^2 = 0.536$

Calculated $\chi^2 = 0.536$
 Tabular $\chi^2_{1df} (0.05) = 3.841$
 Calculated $\chi^2 < \text{Tabular } \chi^2$
Hypothesis accepted

R2.4.4. Fenotipado de plantas silenciadas de tomate

Solo aquellas líneas de tomate generadas (T₀) genotipadas positivamente para la presencia de la construcción de *RNAi*, (Fig R20), que presentaban un bajo porcentaje de expresión en comparación con el de su correspondiente línea no silenciada (NIL14C o NIL17C, Fig. R20) y cuyos patrones de segregación de respuesta a la kanamicina se ajustaban mejor a 3:1 (una sola copia de la construcción de silenciamiento de *RNAi*) se seleccionaron para llevar a cabo los estudios de evaluación fenotípica. Dado el carácter dominante de la construcción *RNAi* (Apartado M5.4), en dichos experimentos se utilizaron las semillas de la progenie T₁, eliminándose las plantas azigotas de dicha población segregante después de evaluar en cada planta individual, mediante PCR diagnóstica con los oligos específicos FNPTII y RNPTII, la presencia o ausencia de las construcciones de *RNAi* (Apartado M5.4, Tabla M17, Fig. M7 y Fig. R20). Esto se hizo así debido a la necesidad de acortar los plazos necesarios para una evaluación fenotípica en generaciones posteriores homocigóticas.

Expresión génica de *HKT1;1* y *HKT1;2* en líneas NILs silenciadas de tomate

Los patrones de expresión génica de cada una de las variantes alélicas de los genes de tipo *HKT1* (*Sl/ScHKT1;1* y *Sl/ScHKT1;2*) se analizaron en diferentes tejidos de la progenie T₁ (una vez eliminadas las plantas azigotas) de cada una de las líneas de tomate silenciadas en este trabajo (ver Apartado M1.3.1). Para ello, 9 plantas de cada línea (3 cubetas con tres plantas cada una) se cultivaron en sistema hidropónico durante 24 días, tras los cuales se les aplicó un tratamiento salino de 3 días con 0 y 100 mM de NaCl.

El patrón de expresión génica de *HKT1* obtenido en las NILs no silenciadas fue muy similar al previamente obtenido en el apartado R2.3, en el cual los niveles de expresión de *SlHKT1;2* en las raíces de NIL17 fueron considerablemente más altos que los de *ScHKT1;2* en NIL14, mientras que en la parte aérea (principalmente en hojas), se observó una tendencia opuesta (Fig. R21). Los niveles de expresión de *ScHKT1;1* en NIL14 fueron mucho más elevados en hojas y en raíces que los de *SlHKT1;1* en NIL17. Además,

el tratamiento salino incrementó claramente los niveles de transcripción de *HKT1;2* en las raíces de NIL17 y los redujo en hojas y tallos de ambas NILs. Con respecto a *HKT1;1*, la expresión génica disminuyó generalmente tras la aplicación del tratamiento salino en ambas NILs, excepto en el caso de las raíces de NIL17, las cuales mostraron un aumento en dicha expresión. Como era de esperar, independientemente del experimento, tratamiento y tejido, la expresión génica del locus *HKT1* de la progenie T₁ de cada una de las líneas silenciadas (*Sc/SlHKT1;1-RNAi* o *Sc/SlHKT1;2-RNAi*) se redujo fuertemente en comparación con la de sus respectivas NILs no silenciadas (Fig. R21).

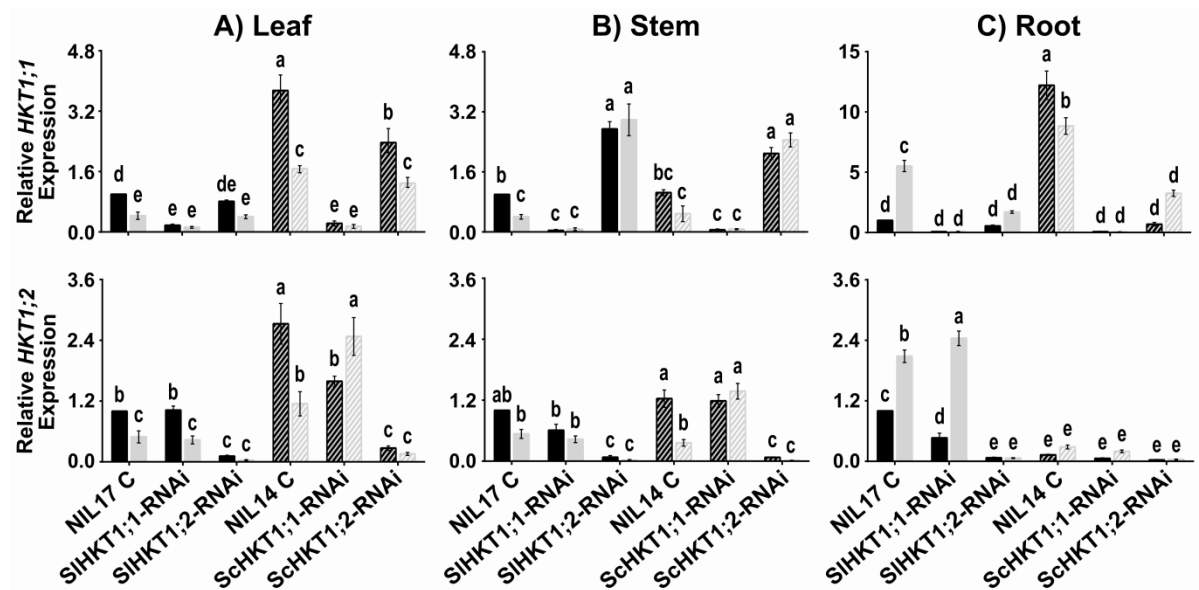


Figure R21. Transcript levels of *HKT1;1* and *HKT1;2* in leaf (A), stem (B) and root (C) tissues of different silenced lines of *HKT1;1/HKT1;2* allelic variants from *S. lycopersicum* and *S. cheesmaniae* in two tomato near-isogenic lines (NILs). NIL117C and NIL14C lines are NIL157-17 and NIL157-14, respectively, transformed and regenerated without a silencing construct. Total RNAs were purified from the leaf, stem and root of four weeks-old T₁ transgenic plants cultivated for 24 days on hydroponics and treated for 3 days with 0 (dark bars) and 100 mM NaCl (clear bars). The tomato elongation factor gene (*LeEF-1a*) was used as the reference gene. The results show the expression of each *HKT1* gene as an increase or decrease in their transcript levels relative to those in the roots, stems and leaves of untransformed plants cultivated in the absence of stress, to which a value of 1 is assigned. Each value is the mean $\pm$ the standard error of the mean (SEM) from nine repeats for roots, stems and leaves (three biological and three technical repeats). Significant differences are indicated by different letters according to Tukey's test ($P < 0.05$).

Cultivo de plantas de tomate en ausencia de transpiración (placas de Petri)

Para comprobar el efecto del silenciamiento de *HKT1* en estadios muy tempranos del desarrollo del tomate, varias semillas de cada una de las líneas se sembraron *in vitro*, en placas de Petri de 12 x 12 cm que contenían medio Hoagland 1/4 (Hoagland y Arnon, 1950), bajo condiciones de no transpiración. Las plántulas de tomate crecieron en una cámara de cultivo (ver condiciones en el Apartado M1.3.1) durante 5 días, después de los cuales fueron transferidas a placas más grandes (24 x 24 cm) que contenían el mismo medio, o bien este medio suplementado con 175 mM de NaCl durante 7 días adicionales. El crecimiento se midió como el peso fresco, tanto de la parte aérea como de la parte radical. En este caso, la presencia de estrés salino afectó de forma similar a todas las

líneas, independientemente del locus de *HKT1* silenciado, viéndose el crecimiento de la parte radical más afectado que el de la parte aérea (Figura R22A y B).

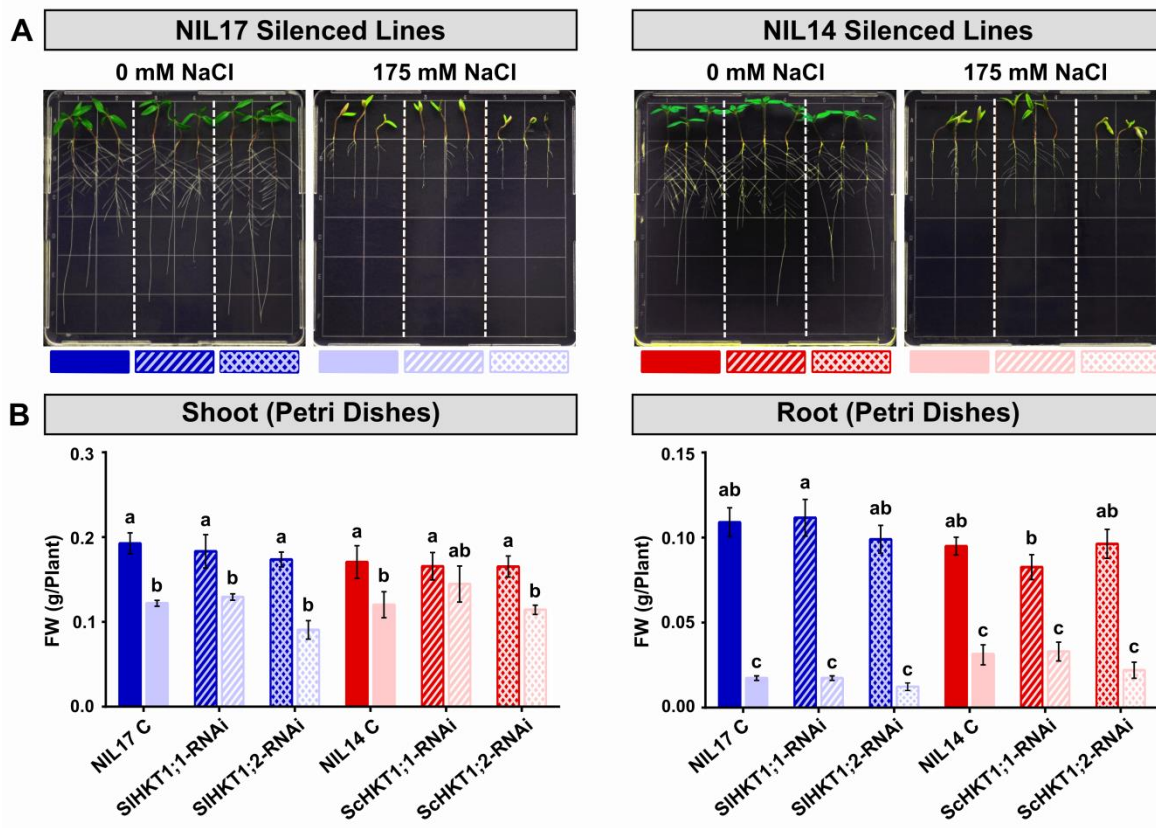


Figure R22. Effect of NaCl treatment on growth, measured as fresh weight of shoot and root, in different silenced lines of *SIHKT* (blue bars) and *SCHKT* (red bars) grown in Petri dishes. **A)** Four-day-old T_1 transgenic seedlings cultivated on Petri plates in 1/4 Hoagland medium were transferred to Petri plates containing the same medium supplemented with 0 mM NaCl (dark bars) and 175 mM NaCl (clear bars) and grown on it for 5 additional days. **B)** Fresh weight of shoot and root. Each value is the mean of 3 replications (3 different plates) $\pm$ SEM. Significant differences ($P < 0.05$) are indicated by different letters, according to Tukey's test.

Cultivo de plantas de tomate bajo condiciones de transpiración (macetas e hidropónicos)

El efecto del estrés salino sobre el crecimiento de las plantas se midió como peso fresco de la parte aérea en plantas cultivadas bajo condiciones de transpiración, en un invernadero, utilizando dos modalidades de cultivo: macetas que contenían fibra de coco y se regaron 2-3 veces por semana con solución de riego Hoagland 1/4x (Hoagland y Arnon, 1950) suplementada con 100 mM NaCl durante 15 días (ver *Cultivo de plantas de tomate en maceta*, Apartado M1.3.1) y sistema hidropónico con aireación continua, que permitía evaluar el efecto del estrés salino sobre el crecimiento, medido como peso fresco, tanto de la parte aérea como de la parte radical. Para ello, se utilizaron cubetas de 2.5 litros que contenían solución nutritiva Hoagland 1/4x modificada para cultivo hidropónico (ver *Cultivo de plantas de tomate en sistema hidropónico*, Apartado M1.3.1), a las que se adicionó nuevamente 100 mM de NaCl, esta vez durante 6 días.

En ambos sistemas de cultivo, los tratamientos salinos ocasionaron una fuerte reducción en el crecimiento de la parte aérea, medido como peso fresco, en las líneas *ScHKT1;2-RNAi* y *SIHKT1;2-RNAi*, en comparación con sus respectivas plantas no silenciadas. Dicha reducción fue significativamente mayor en las líneas *ScHKT1;2-RNAi* que en las de *SIHKT1;2-RNAi* (Figs. R23 y R24). El crecimiento de la raíz en sistema hidropónico también se vio afectado negativamente por el estrés salino únicamente en las líneas *ScHKT1;2-RNAi* y *SIHKT1;2-RNAi* (Fig. R24). Es destacable que las plantas de la línea *ScHKT1;1-RNAi* cultivadas sin NaCl en condiciones de transpiración, tanto en macetas como en hidropónicos mostraron un peso fresco significativamente mayor de hojas, tallos y raíces que su control, NIL14C (Figs. R23 y R24).

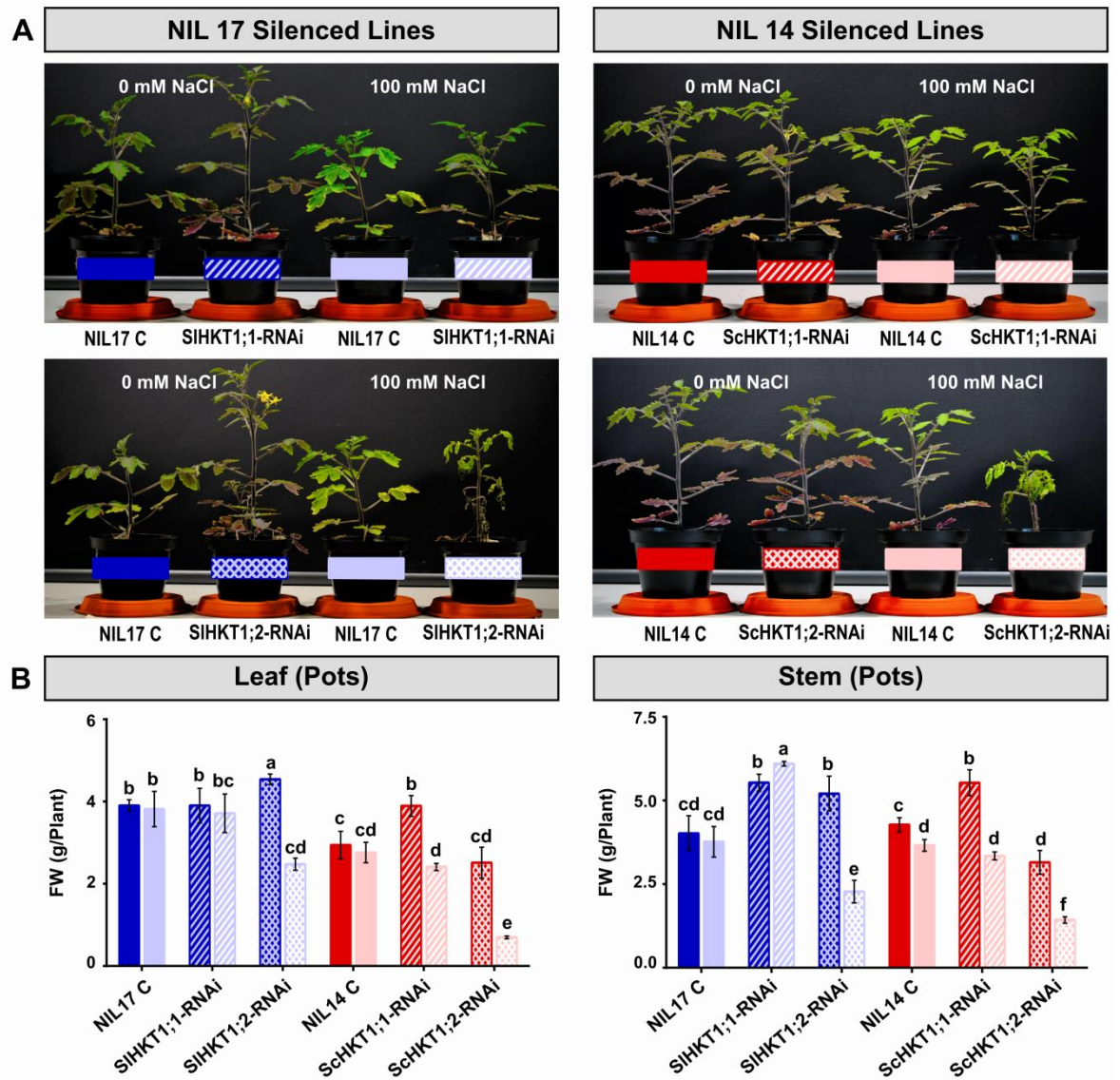


Figure R23. Effect of NaCl treatment on growth, measured as fresh weight of leaves and stem in different silenced lines of *SIHKT* (blue bars) and *ScHKT* (red bars) grown in pots. A) Five-week-old T1 transgenic plants cultivated on pots in cocopeat and irrigated with 1/4 x Hoagland solution in a greenhouse. Plants were treated with 0 mM NaCl (dark bars) and 100 mM NaCl (clear bars) for 15 days. **B)** Fresh weight of leaves and stems. Each value is the mean of 3 replications (3 different pots) $\pm$ SEM. Significant differences ($P < 0.05$) are indicated by different letters, according to Tukey's test.

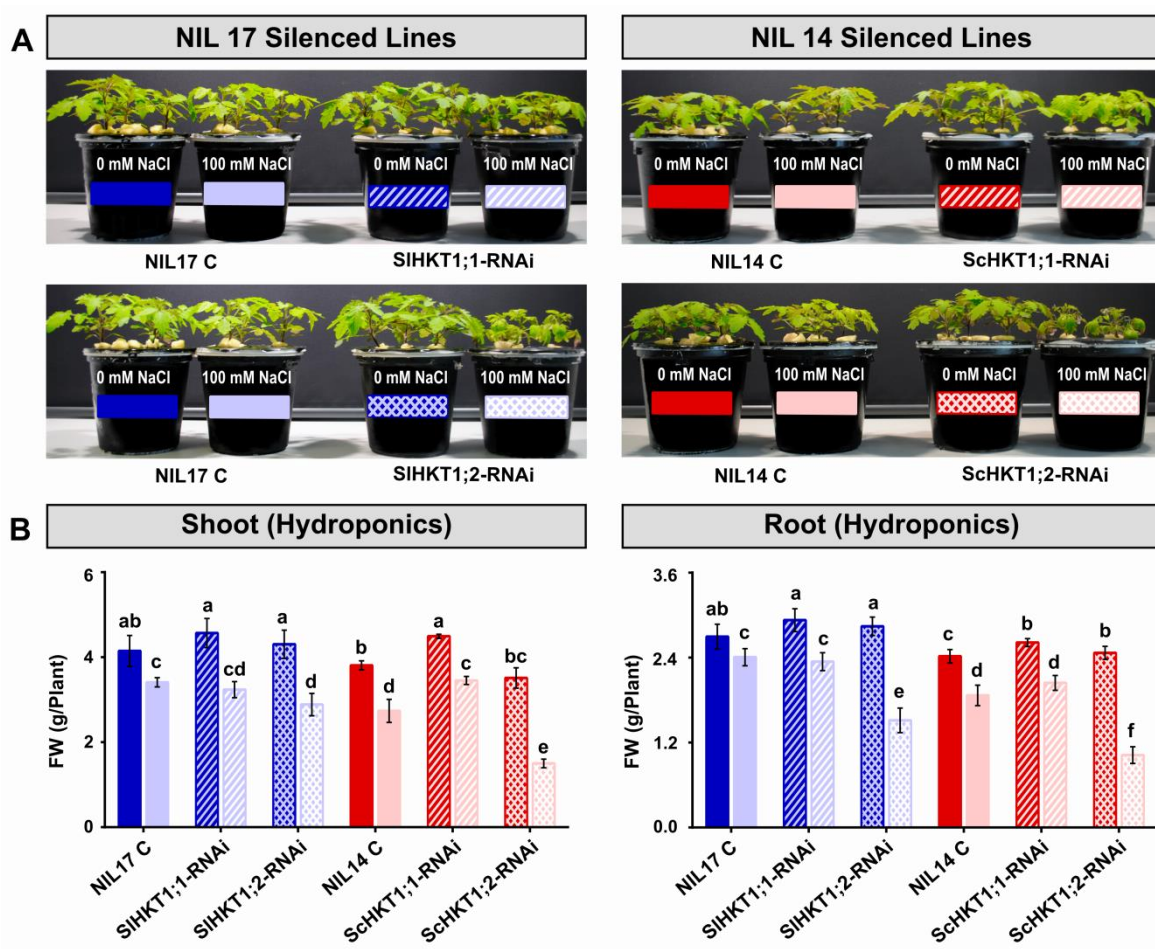


Figure R24. Effect of NaCl treatment on growth, measured as fresh weight of shoots and roots in different silenced lines of *SIHKT1* (blue bars) and *SchKT1* (red bars) grown in hydroponics. **A)** Plants cultivated for 24 days on hydroponics with an aerated 1/4 x Hoagland solution in a greenhouse and treated for 6 days with 0 (dark bars) and 100 mM NaCl (clear bars). **B)** Fresh weight of shoots and roots. Each value is the mean of 3 replications (3 different buckets) $\pm$ SEM. Significant differences ($P < 0.05$) are indicated by different letters, according to Tukey's test.

Contenido iónico en hojas de plantas silenciadas de tomate

Para examinar el efecto del silenciamiento de cada locus *HKT1* sobre la homeostasis de Na^+/K^+ en cada NIL cultivada bajo condiciones de salinidad, se llevó a cabo un análisis del contenido iónico utilizando el material seco procedente de hojas de plantas de tomate cultivadas en condiciones de transpiración (macetas e hidropónicos, tratados con 0 y 100 mM NaCl durante 15 y 6 días respectivamente) y de la parte aérea completa de plántulas de tomate cultivadas en condiciones de no transpiración (placas de Petri tratadas con 0 y 175 mM de NaCl durante 7 días).

En condiciones de no transpiración, es decir, plantas cultivadas en placas de Petri que contenían medio Hoagland 1/4x o este mismo medio suplementado con 175 mM NaCl, no hubo diferencias significativas en lo referente a las concentraciones de Na^+ y K^+ en hojas entre las distintas líneas (Figura R25C). Sin embargo, en cultivos bajo condiciones de transpiración las plantas no silenciadas de NIL14 y NIL17, que crecieron en en salinidad, reprodujeron la tendencia previamente descrita en Asins *et al.* (2013) para las

concentraciones de Na^+ y K^+ en los alelos de *S. cheesmaniae* y *S. lycopersicum*: NIL14 presentó una razón Na^+/K^+ en hojas mayor que NIL17 debido a la presencia de una mayor concentración de Na^+ y una menor de K^+ en dicho tejido, aunque según nuestros datos, dicha tendencia no fue estadísticamente significativa (Fig. R25A y B).

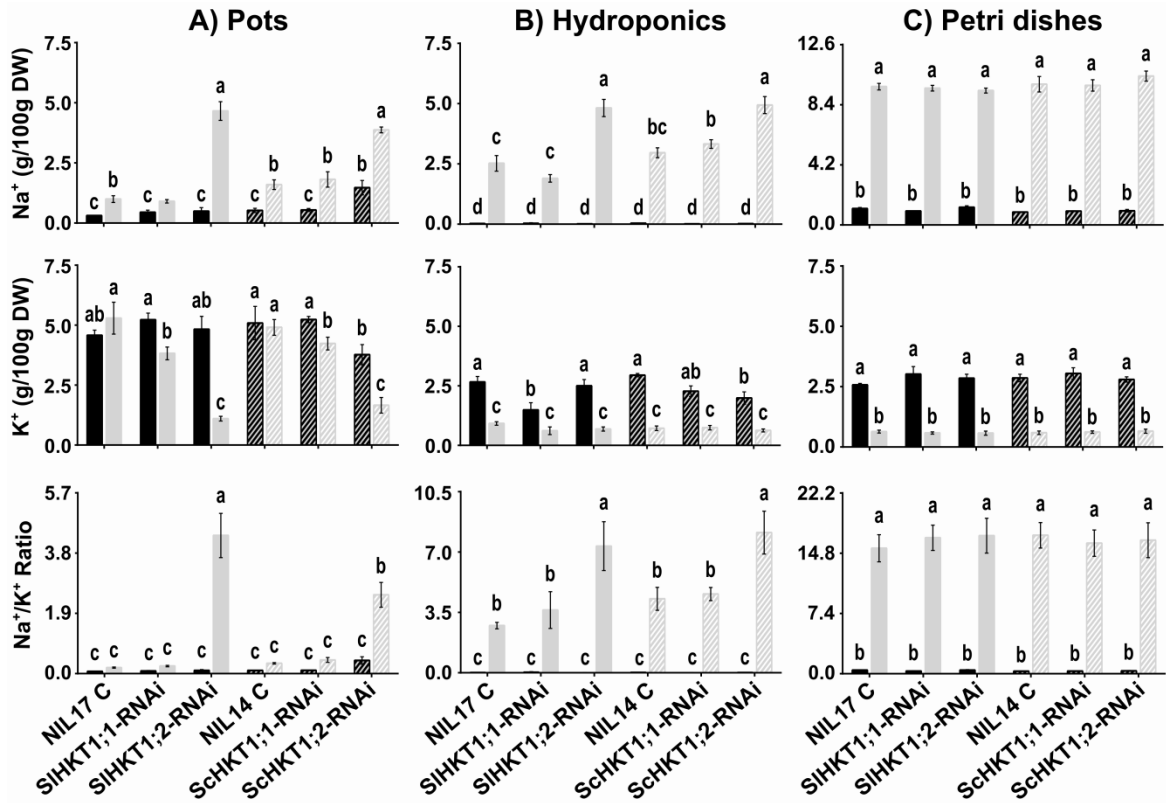


Figure R25. Leaf contents of Na^+ and K^+ in control and salt-treated plants of different *ScHKT1;1/HKT1;2*- and *SIHKT1;1/HKT1;2*-silenced NIL lines grown under transpiring (pots -A- and hydroponics -B-) and non-transpiring conditions (Petri dishes -C-). Leaf contents of Na^+ and K^+ in control (closed bars) and salt-treated (open bars) plants from non silenced and silenced NIL14 (*ScHKT1* alleles) and NIL17 (*SIHKT1* alleles). Tomato plants were grown in pots, hydroponics and Petri dishes as indicated in legends of figures R22, R23 and R24, respectively. Values represent the mean $\pm$ SEM of three different samples. Significant differences ($P < 0.05$) are indicated by different letters, according to Tukey's test.

Las líneas *SIHKT1;2-RNAi* y *ScHKT1;2-RNAi*, las cuales ya presentaron un fenotipo de hipersensibilidad a la salinidad (Figs. R23 y R24), mostraron de igual modo altos niveles de acumulación de Na^+ y bajos de K^+ , y consecuentemente, mayores razones Na^+/K^+ en hojas que sus respectivas NILs no silenciadas (Fig. R25A y B). En contraste, el silenciamiento de *ScHKT1;1* en NIL14 y de *SIHKT1;1* en NIL17, que tuvieron respectivamente un menor efecto o un efecto no significativo en el crecimiento de las plantas en condiciones salinas (Figs. R23 y R24), apenas afectaron a la proporción Na^+/K^+ en comparación con sus respectivas NILs no silenciadas bajo condiciones de estrés por salinidad (Fig. R25A y B).

Análisis de la expresión de otros genes de tomate (SOS1, NHX2 y NHX4) implicados en la homeostasis de Na⁺ y K⁺ en las líneas NILs silenciadas

Como se indica en el apartado M1.3.1, ambas NILs (NIL17 y NIL14) fueron genotipadas como homocigóticas para el alelo de *S. cheesmaniae* en los loci *SOS1* y *NHX4* (*ScSOS1*, *ScNHX4*), y para el alelo de *S. lycopersicum* en el locus *SOS2* y *NHX2* (*SISOS2* y *SINH2*) (M.J. Asins y A. Belver, resultados no publicados). Por tanto, el patrón de expresión génica de *ScSOS1*, *LeNHX2* y *ScNHX4* también se analizó en hojas, tallos y raíces de la progenie T₁ de cada una de las líneas de tomate silenciadas en este trabajo, cultivadas en sistema hidropónico en las mismas condiciones descritas anteriormente (ver *Cultivo de plantas de tomate en sistema hidropónico*, Apartado M1.3.1), aplicándose en este caso un tratamiento salino de 3 días con 0 y 100 mM de NaCl.

En todos los tejidos de NIL157-17 no silenciada (NIL17C), los niveles de expresión de *ScSOS1* fueron similares, tanto en presencia como en ausencia de tratamiento salino, mientras que en NIL157-14 no silenciada (NIL14C), el tratamiento salino incrementó la expresión de *SOS1* en la parte aérea (tallos y hojas) y la disminuyó en las raíces (Fig. R26). Este comportamiento no se observó en ninguna de las líneas silenciadas de NIL14 para ninguno de los alelos de tipo *HKT1*. Sin embargo, el silenciamiento de *SIHKT1;1* (en NIL17) vino acompañado por un aumento significativo de los niveles de expresión de *SOS1* en hojas en presencia de tratamiento salino, tal y como ocurría en las plantas no silenciadas de NIL14 (Fig. R26A).

El silenciamiento de las distintas variantes alélicas de *HKT1* tuvo poco efecto en la expresión de *LeNHX2*, independientemente del tejido y de la NIL implicada (Fig. R26A, B y C). La salinidad indujo cambios similares en los niveles de expresión de *ScNHX4* en tallos (Fig. R26B) y raíces (Fig. R26C), en las líneas no silenciadas, pero sí en los de hojas (Fig. R26A). El patrón encontrado en *SIHKT1;1-RNAi* fue muy similar al encontrado en NIL14C en hojas; es decir, en ambos genotipos se incrementaron los niveles de expresión de *ScNHX4* en condiciones salinas (Fig. R26A). En la raíz, el silenciamiento de *SIHKT1;2* estuvo asociado con un aumento significativo de los niveles de expresión de *ScNHX4* en condiciones salinas, mientras que en ausencia de NaCl, las plantas de la línea *ScHKT1;1-RNAi* mostraron niveles de expresión de *ScNHX4* reducidos (Fig. R26C). Por tanto, el genotipo en los loci *HKT1* (*S. lycopersicum* o *cheesmaniae*, silenciados o no) afectó al comportamiento de transcripción de los alelos de *cheesmaniae* en los loci *SOS1* y *NHX4*.

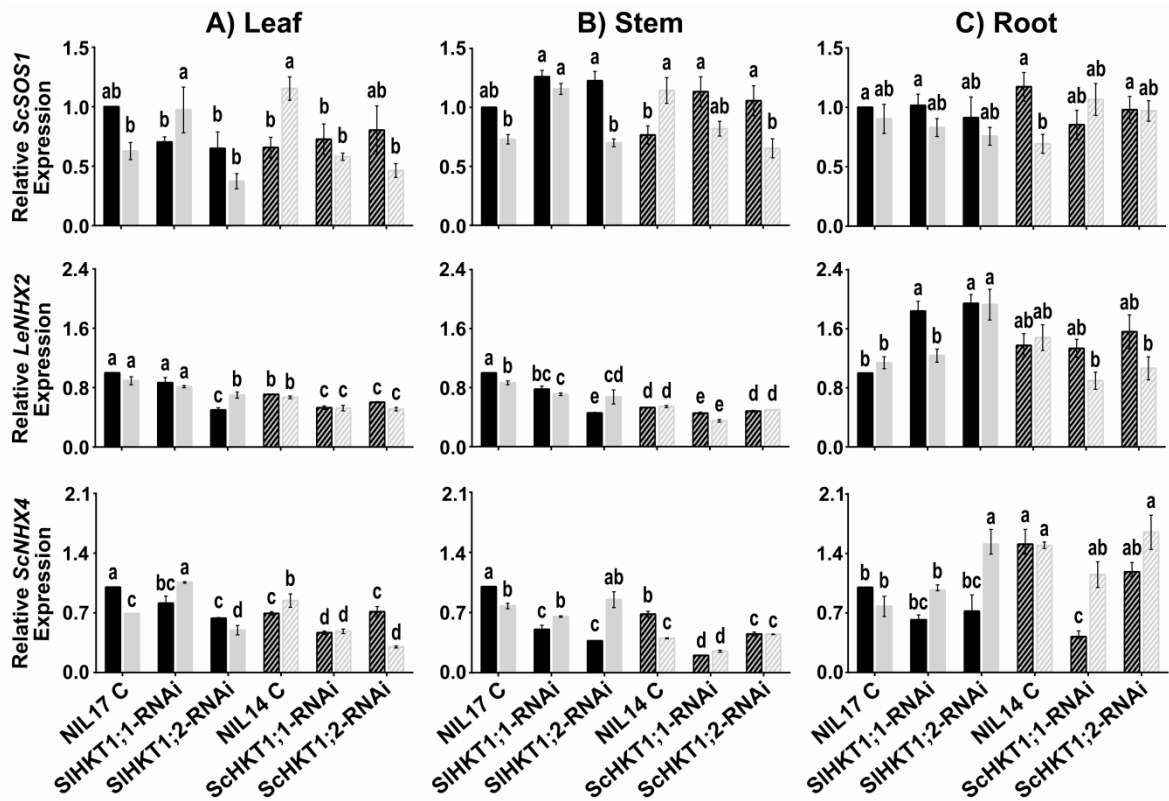


Figure R26. Transcript levels of *ScSOS1*, *LeNHX2* and *ScNHX4* in leaf (A), stem (B) and root (C) tissues of different silenced lines of *HKT1;1/HKT1;2* allelic variants from *S. lycopersicum* and *S. cheesmaniae* in two tomato near-isogenic lines (NILs). NIL17C and NIL14C lines are NIL157-17 and NIL157-14, respectively, transformed and regenerated without silencing construct. Total RNA was purified from the leaf, stem and root of four weeks-old T_1 transgenic plants cultivated for 24 days on hydroponics and treated for 3 days with 0 mM (dark bars) and 100 mM NaCl (clear bars). The tomato elongation factor gene (*LeEF-1a*) was used as the reference gene. The results show the expression of each gene as an increase or decrease in their transcript levels relative to those in roots, stems and leaves of untransformed plants cultivated in the absence of stress, to which a value of 1 is assigned. Each value is the mean $\pm$ the standard error of the mean (SEM) from nine repeats for roots, stems and leaves (three biological and three technical repeats). Significant differences are indicated by different letters according to Tukey's test ($P < 0.05$).

R2.5. ANÁLISIS FUNCIONAL COMPARATIVO DE MUTANTES *hkt1;1* EN *ARABIDOPSIS*

2.5.1. Selección de líneas mutantes *hkt1;1* de *Arabidopsis thaliana*. Genotipado de plantas de *Arabidopsis* mediante PCR

Se llevó a cabo un estudio comparativo de los fenotipos de tolerancia a estrés salino de las líneas silenciadas *HKT1* de tomate, con el de mutantes insercionales nulos para el gen *AtHKT1;1*. A partir de dos mutantes insercionales nulos para el gen *AtHKT1;1* (*At4g10310.1*), generados mediante inserciones de T-DNA con el plásmido pAC161 en fondo genético Columbia (Col. 0), se seleccionaron 10 líneas para llevar a cabo un análisis de genotipado mediante PCR diagnóstica. Uno de los mutantes era concretamente el GK-386D05 y el otro, el mutante GK-795G10, ambos de la colección GABI-Kat (<https://www.gabi-kat.de/>). Dichas semillas fueron proporcionadas por el NASC (Nottingham *Arabidopsis* Stock Center <http://arabidopsis.info/>). De acuerdo con el sitio web, en el

mutante GK-386D05, el T-DNA está insertado en un intrón, mientras que en el mutante GK-795G10, el T-DNA está insertado en un exón (Tabla M10) y ambas líneas pueden contener una o más inserciones.

Tras realizar los análisis de genotipado mediante PCR diagnóstica, se determinó cuáles de las líneas eran aparentemente homocigóticas y cuales heterocigóticas para la inserción de T-DNA, tal y como se describe en el apartado M6.2 (Fig. M23). Para la línea mutante GK-386D05, en 2 de las 5 plantas analizadas se amplificó banda con los oligos específicos del gen (GSP *Forward* y *Reverse*, PCR 1, flechas rojas de la Fig. R27), lo cual indicaba que dichas plantas eran claramente heterocigóticas (Fig. R27, líneas marcadas en color rojo). En las tres plantas restantes, en las que no se amplificó banda con los oligonucleótidos específicos, se obtuvo una banda del tamaño esperado combinando el oligonucleótido específico del borde izquierdo del T-DNA (LBP) con el oligonucleótido específico del gen *Forward* (GSP *Forward*, Fig. R27, PCR 3). Esto indicaba que dichas plantas eran aparentemente homocigóticas para la inserción de T-DNA (Fig. R27, líneas marcadas en color negro). Por otro lado, para la línea mutante GK-795G10, en 3 de las 5 plantas analizadas se amplificó banda con los oligos específicos del gen (PCR 1, flechas rojas de la Fig. R28), indicando que dichas plantas eran heterocigóticas (Fig. R28, líneas marcadas en color rojo). En las dos plantas restantes se obtuvo una banda del tamaño esperado combinando el LBP con el GSP *Forward* (Figura R28, PCR 3), indicando que dichas líneas eran aparentemente homocigóticas para la inserción de T-DNA (Fig. R28, líneas marcadas en color negro).

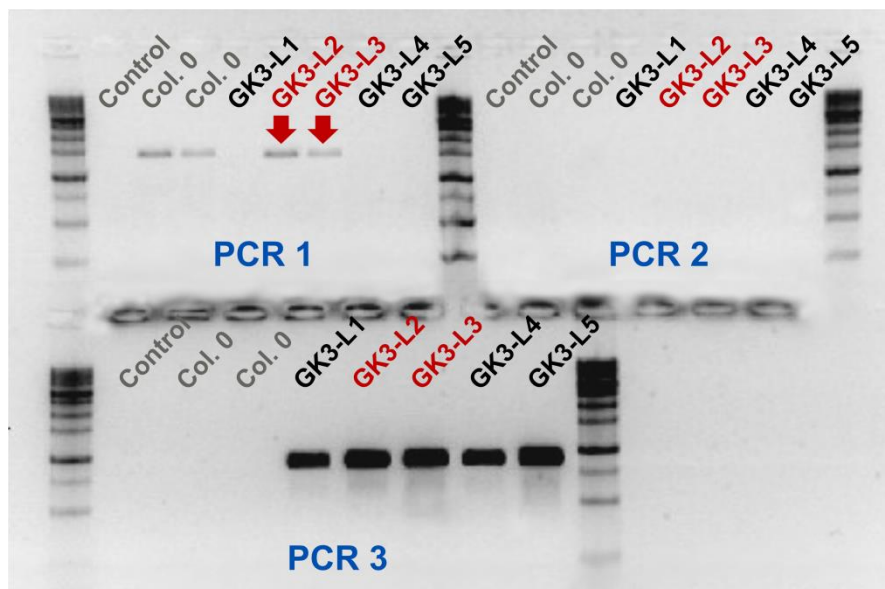


Figure R27. Diagnostic PCR to identify homozygous T-DNA insertion plants from the *athkt1;1* mutant line GK-386D05. GSP *Forward* and *Reverse* (FGK1-hkt1 and RGK1-hkt1) were used in PCR 1 (control reaction). GSP *Reverse* combined with the LBP (pAC8409) were used in PCR 2. GSP *Forward* together with the LBP were used in PCR 3 (Table M18). Mutant plants were considered as heterozygous when amplified bands using genomic DNA and primers from PCR 1 and PCR 3 and as homozygous when amplified band using genomic DNA and primers from PCR 3. Plants marked in red were considered as heterozygous. Red arrows point to the amplified bands using GSPs (PCR 1). GSP, Gene Specific Primer; LBP, Left Border Primer. Marker is a 250-10000 bp ladder (1 Kb DNA Ladder Molecular Weight Marker, Genecraft).

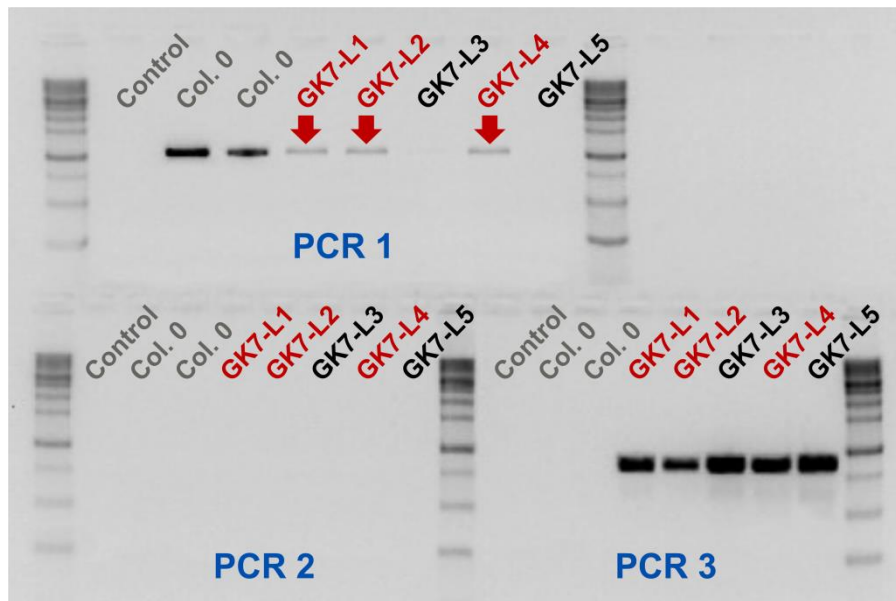


Figure R28. Diagnostic PCR to identify homozygous T-DNA insertion plants from the *athkt1;1* mutant line GK-795G10. GSP Forward and Reverse (FGK2-hkt1 and RGK2-hkt1) were used in PCR 1 (control reaction). GSP Reverse combined with the LBP (pAC8409) were used in PCR 2 and GSP Forward together with the LBP were used in PCR 3 (Table M18). Mutant plants were considered as heterozygous when amplified bands using genomic DNA and primers from PCR 1 and PCR 3 and as homozygous when amplified band using genomic DNA and primers from PCR 3. Plants marked in red were considered as heterozygous. Red arrows point to the amplified bands using GSPs (PCR 1). GSP, Gene Specific Primer; LBP, Left Border Primer. Marker is a 250-10000 bp ladder (1 Kb DNA Ladder Molecular Weight Marker, Genecraft).

2.5.2. Análisis de expresión de *AtHKT1;1* en las líneas *athkt1;1*

Varias semillas T₁ resistentes a sulfadiazina, progenie de las 5 líneas mutantes de *Arabidopsis* previamente seleccionadas por PCR (Figs. R27 y R28), se sembraron en semilleros que contenían turba:vermiculita en proporción 1:1 y se cultivaron durante 3 semanas en una cámara de cultivo con las mismas condiciones previamente descritas en el Apartado M1.3.1. Pasado este tiempo, se aisló el RNA total de varias plantas completas para llevar a cabo análisis de expresión génica utilizando la técnica de RT-qPCR. Para ello se utilizaron oligonucleótidos específicos del gen (*AtHKT1.1 forward* y *reverse*) y como genes de referencia se utilizaron tanto la tubulina-3 como la actina-2 (Mason *et al.*, 2010). Estos análisis confirmaron que las 5 líneas mutantes presentaban una expresión génica reducida para *AtHKT1;1* con respecto a la de Col.0 (Fig. R29).

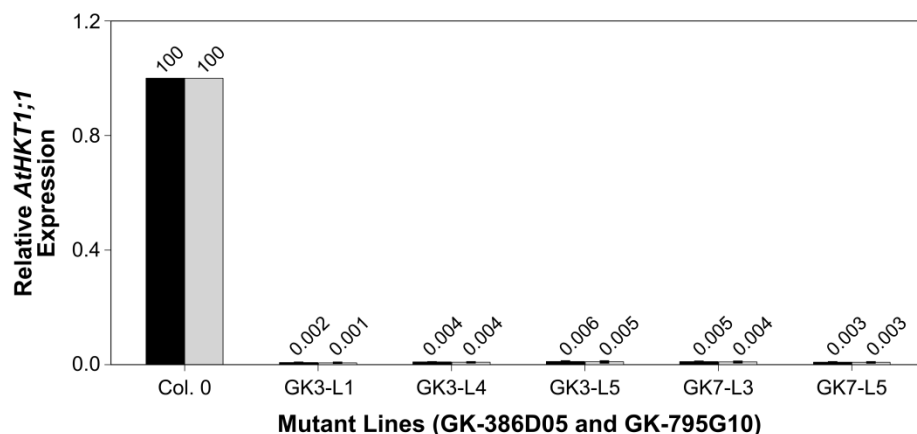


Figure R29. Gene expression determined by RT-qPCR in different *athkt1;1* mutant lines. Total RNA was isolated from whole *Arabidopsis* plants grown in seedbeds with peat-moss:vermiculite (1:1) in growth chamber. Transcript level was analyzed by RT-qPCR using primers described by Mason et al. (2010). Tubuline-3 (dark bars) and actine-2 (clear bars) were used as the reference genes. Numbers on top of bars represent % gene expression level respect to that of Col. 0 (WT).

2.5.3. Estudio de segregación de plantas de *Arabidopsis*

Finalmente, se utilizaron semillas de la progenie de las 5 líneas seleccionadas previamente, mediante análisis de genotipado y expresión para realizar estudios de segregación en respuesta al herbicida sulfadiazina, y determinar de esta manera el patrón de herencia al que se ajustaba cada una de las líneas. Para ello, la progenie (unas 80-110 semillas) de aquellas líneas que fueron homocigóticas para la inserción de T-DNA (Figs. R27 y R28) y que presentaban una baja expresión del gen *AtHKT1;1* en comparación con la de Col. 0 (Fig. R29) se sembraron en placas de Petri redondas de 9 cm de diámetro que contenían medio MS sólido (ver Fig. M6) suplementado con 5.25 mg/l de sulfadiazina. Según nuestra hipótesis inicial, en este medio, si las plántulas son heterocigóticas deberían segregar de acuerdo a un patrón de herencia dominante 3:1, típico de la estrategia de genética reversa, en el caso de contener una única inserción de T-DNA, o de acuerdo a un patrón 15:1, en el caso de contener dos inserciones. Si son homocigóticas debe esperarse que un 100% de las semillas sean resistentes.

Al igual que en el caso de las plantas de tomate, se utilizó el estadístico chi-cuadrado (χ^2) con un margen de error del 5% para comprobar a qué patrón se ajustaba mejor cada una de las líneas (ver Apartado R2.4.3). En este caso, las 5 líneas parecieron ajustarse a un patrón 3:1, lo cual indicaba que probablemente todas ellas tuvieran una inserción de T-DNA (Tablas R16-R20).

Tables R16-R20. Segregation analysis of different *athkt1;1* mutant lines from *Arabidopsis* in response to sulfadiazine. La progenie (80-110 seeds) from several independent positive mutant lines (see Figs. R27 and R28) with low % gene expression level respect to that of Col. 0 (see Fig. R29) were sown in solid MS medium supplemented with the herbicide sulfadiazine (5.25 mg/l), in which were supposed to grow on the basis of sulfadiazine-resistance segregation according to a monogenic and dominant inheritance pattern typical of reverse genetic strategy 3:1 (3 resistant: 1 sensitive, with one T-DNA insertion) or 15:1 (15 resistant: 1 sensitive, with two T-DNA insertions). This hypothesis was tested by the chi-square statistic (χ^2). The calculated chi-square was compared with the tabular value (χ^2_{1df} , 0.05 level of probability = 3.841) for each mutant line in order to accept or reject the hypothesis and select the lines for further studies. Sul^R, sulfadiazine-resistant seedlings; Sul^S, sulfadiazine-sensitive seedlings; T, Total number of seeds.

Table R16. Line GK3-L1

Classes	O	E (3:1)	(O - E) ² / E
Kan ^R	81	75	0.054
Kan ^S	19	6.25	0.810
T	100	100	$\chi^2 = 0.854$

Calculated $\chi^2 = 0.48$
 Tabular χ^2_{1df} (0.05) = **3.841**
 Calculated $\chi^2 <$ Tabular χ^2
Hypothesis accepted

Table R17. Line GK3-L4

Classes	O	E (3:1)	(O - E) ² / E
Kan ^R	80	69	0.163
Kan ^S	12	5.75	2.446
T	92	92	$\chi^2 = 2.609$

Calculated $\chi^2 = 1.754$
 Tabular χ^2_{1df} (0.05) = **3.841**
 Calculated $\chi^2 <$ Tabular χ^2
Hypothesis accepted

Table R18. GK3-L5

Classes	O	E (3:1)	(O - E) ² / E
Kan ^R	97	83.25	0.154
Kan ^S	14	7	2.286
T	111	111	$\chi^2 = 2.440$

Calculated $\chi^2 = 2.271$
 Tabular χ^2_{1df} (0.05) = **3.841**
 Calculated $\chi^2 >$ Tabular χ^2
Hypothesis accepted

Table R19. GK7-L3

Classes	O	E (3:1)	(O - E) ² / E
Kan ^R	96	81.75	0.143
Kan ^S	13	6.82	2.139
T	109	109	$\chi^2 = 2.282$

Calculated $\chi^2 = 2.484$
 Tabular χ^2_{1df} (0.05) = **3.841**
 Calculated $\chi^2 >$ Tabular χ^2
Hypothesis accepted

Table R20. GK7-L5

Classes	O	E (15:1)	(O - E) ² / E
Kan ^R	75	66	0.076
Kan ^S	13	5.5	1.136
T	88	88	$\chi^2 = 1.212$

Calculated $\chi^2 = 1.227$
 Tabular χ^2_{1df} (0.05) = **3.841**
 Calculated $\chi^2 <$ Tabular χ^2
Hypothesis accepted

2.5.4. Fenotipado de plantas mutantes de *Arabidopsis* en función de su tolerancia al estrés salino

Cultivo de plantas de Arabidopsis bajo condiciones de transpiración

Las semillas de las cinco líneas homocigotas seleccionadas previamente mediante ensayos de genotipado y segregación (ver Apartados R2.5.1 y R2.5.3), tres de las cuales correspondían al mutante GK-386D05 y las otras dos, al GK-795G10, ambos de la colección GABI-Kat (<https://www.gabi-kat.de/>), se utilizaron para realizar estudios de fenotipado en función de su tolerancia al estrés salino. Al menos 8 plántulas de cada línea se sembraron en semilleros que contenían turba:vermiculita en proporción 1:1, a razón de una planta por semillero y se cultivaron en una cámara de cultivo durante tres semanas, en condiciones de transpiración, regando 2-3 veces por semana con solución nutritiva de riego de *Arabidopsis* (ver Tabla M12). Tras este tiempo, la mitad de las plantas de cada línea recibieron tratamiento salino (100 mM NaCl) durante una semana, tras la cual se hicieron estudios de crecimiento, determinado como peso fresco de la parte aérea completa. En ausencia de estrés salino, todas las plantas crecieron de forma homogénea, presentando la misma longitud del tallo floral, así como la misma forma y longitud de las hojas en roseta (Fig. R30A, 0 mM NaCl). Sin embargo, el tratamiento salino afectó de diferente manera al crecimiento de las líneas. Por un lado, las tres líneas pertenecientes al mutante GK-386D05 presentaron tallos florales de menor longitud que las dos líneas mutantes GK-795G10, mientras que por otro, las plantas del mutante GK-386D05 presentaron hojas en roseta más grandes y suculentas que las del mutante GK-795G10 (Fig. R30A, 100 mM NaCl).

En ausencia de tratamiento salino no se observaron diferencias significativas entre los distintos tipos de plantas (Fig. R30B, *Dark Bars*), mientras que el cultivo en presencia de 100 mM NaCl afectó a todas las plantas, pero especialmente a las líneas mutantes, de forma que en presencia de tratamiento, las líneas mutantes presentaron un menor peso fresco que las de *Col. 0*, siendo estas diferencias significativas (Fig. R30B, *Clear Bars*). Sin embargo, ambas líneas mutantes se afectaron de igual manera por el tratamiento salino, no existiendo diferencias significativas entre los pesos frescos del mutante GK-386D05 y los del GK-795G10 (Fig. R30B, *Clear Bars*).

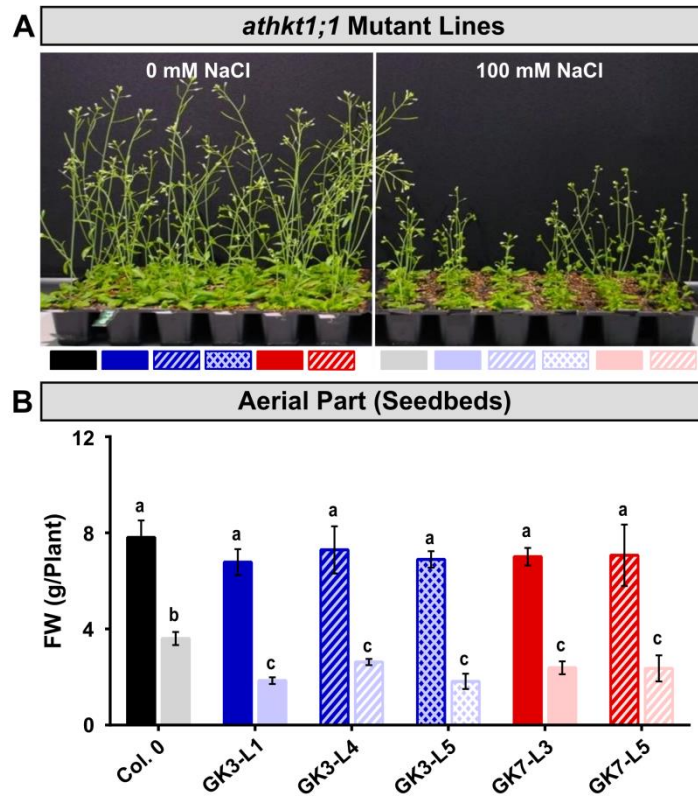


Figure R30. Effect of NaCl treatment on growth, measured as fresh weight of complete aerial part, in different *athkt1;1* mutant lines grown under transpiring conditions. Three and two different lines from two distinct *athkt1;1* mutants in genetic background Col.0 (respectively GK-386D05 and GK-795G10) from GABI-Kat collection were used (purchased from NASC). **A)** Growth of wild type (col. 0) and five different lines from GABI-Kat collection for 3 weeks in seedbeds with peat-moss:vermiculite 1:1 at 22/20°C, 16 h light (120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$) / 8 h darkness and treated with 0 mM and 100 mM NaCl for 7 days under transpiring conditions. **B)** Fresh weight of complete aerial part of *Arabidopsis* plants treated with 0 mM (dark bars) and 100 mM NaCl (clear bars) for 7 days. Each value is the mean of 5 replication (5 different plants) $\pm$ SEM. Significant differences ($P < 0.05$) are indicated by different letters, according to Tukey's test.

Cultivo de plantas de *Arabidopsis* en placas de Petri

Los estudios comparativos entre *HKT1* de tomate y *AtHKT1;1* también se realizaron en condiciones de no transpiración, sembrando las semillas de *Arabidopsis* previamente descritas (ver Tabla M11) en placas de Petri redondas de 9 cm de diámetro que contenían medio mínimo (Tabla M13) (Mäser *et al.*, 2002) y se mantuvieron en estas condiciones durante 3-5 días, tras los cuales, las plántulas germinadas se transfirieron a placas cuadradas de 12x12 cm, que contenían este mismo medio, o bien dicho medio suplementado con 75 mM de NaCl. Se transfirieron al menos 10 semillas de cada línea, que se colocaron junto a otras 10 semillas de la variedad silvestre (Col. 0) y se mantuvieron en una cámara de cultivo durante 40 días. El crecimiento se determinó como peso fresco, tanto de la parte aérea como de la parte radical. En ausencia de estrés salino, si bien todas las plantas presentaron un aspecto bastante similar en cuanto a la longitud del tallo, estadio floral, color de las hojas en roseta y longitud de las raíces, algunas de las líneas presentaron un aspecto ligeramente diferente al resto. Concretamente, las dos líneas pertenecientes al mutante GK-795G10 y la línea GK3-L5, perteneciente al mutante GK-

386D05, presentaron hojas en roseta más curvadas y con una mayor longitud, así como un mayor desarrollo de la parte radical, observándose raíces más gruesas que en el resto de líneas estudiadas y que en la variedad silvestre (Fig. R31A, 0 mM NaCl). El tratamiento salino afectó de forma diferente a las plantas mutantes y a la variedad silvestre, siendo las plantas mutantes las más afectadas. Las plantas mutantes presentaron una menor longitud en los tallos florales que las plantas de la variedad silvestre, así como un menor crecimiento de las hojas en roseta, que venía asociado a un mayor número de hojas cloróticas. Además, las plantas mutantes presentaron raíces primarias de menor longitud y más delgadas que las plantas silvestres, así como raíces secundarias más cortas y delgadas (Figura R31A, 100 mM NaCl).

En ausencia de tratamiento salino, las dos líneas pertenecientes al mutante GK-795G10 y la línea GK3-L5 del mutante GK-386D05, presentaron un peso fresco de la parte aérea mayor que las líneas GK3-L1, GK3-L4 y que la variedad silvestre Col. 0, siendo estas diferencias significativas (Figura R31B, *Dark Bars, Shoots*). Con respecto a la parte radical, las dos líneas pertenecientes al mutante GK-795G10 presentaron un peso fresco mayor que las líneas GK3-L1 y GK3-L4 del mutante GK-386D05 y que la variedad silvestre Col. 0, siendo también estas diferencias significativas. Sin embargo, la línea GK3-L5 presentó en este caso un peso fresco de la parte radical intermedio entre las dos líneas del mutante GK-795G10 y el resto de líneas, incluyendo a la variedad silvestre, de forma que no existieron diferencias significativas entre los pesos frescos dicha línea y los pesos frescos del resto de las líneas (Figura R31B, *Dark Bars, Roots*). En presencia de tratamiento salino, la variedad silvestre presentó un peso fresco de la parte aérea mayor que el de las líneas mutantes, independientemente de su procedencia, siendo estas diferencias significativas (Figura R31B, *Clear Bars, Shoots*), mientras que en el caso de la parte radical, tanto la línea silvestre como las líneas mutantes presentaron pesos frescos similares, no existiendo entre ellos diferencias significativas (Figura R24B, *Clear Bars, Roots*).

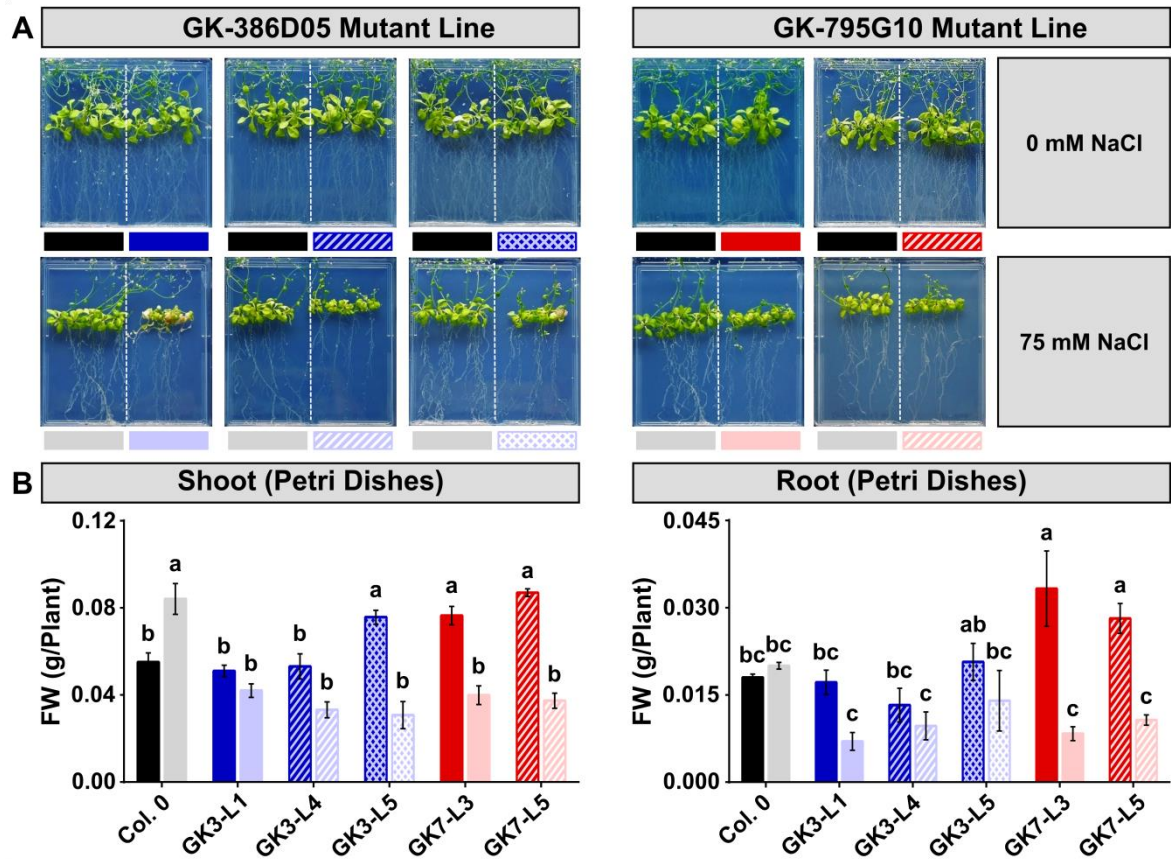


Figure R31. Effect of NaCl treatment on growth, measured as fresh weight of shoot and root, in different *athkt1;1* mutant lines grown under non transpiring conditions. Three and two different lines from two distinct *athkt1;1* mutants in genetic background col.0, respectively (GK-386D05 and GK-795G10) from GABI-Kat collection were used (purchased from NASC). **A)** Growth of wild type (col. 0) and five *athkt1;1* mutant lines in minimal medium subjected to 0 mM and 75 mM salt treatment for 40 days in Petri dishes. **B)** Fresh weight of complete aerial part of *Arabidopsis* plants grown in Petri dishes (non-transpiring conditions) with minimal medium, subjected to 0 mM (dark bars) and 75 mM NaCl (clear bars) for 40 days (Mäser *et al.*, 2002). Each value is the mean of 3 replication (3 different >Petri dishes) $\pm$ SEM. Significant differences ($P < 0.05$) are indicated by different letters, according to Tukey's test.

Contenido iónico en la parte aérea de líneas mutantes de *Arabidopsis*

El análisis del contenido iónico en *Arabidopsis* se llevó a cabo nuevamente utilizando el material seco procedente de la parte aérea completa de plantas cultivadas en condiciones de transpiración (semilleros alveolares tratados con 0 y 100 mM de NaCl durante 7 días) y de no transpiración (placas de Petri suplementadas con 0 y 75 mM de NaCl durante 40 días).

Al igual que sucedía en tomate, en condiciones de no transpiración, las plantas de *Arabidopsis* cultivadas en placas de Petri que contenían 1/4 x de Hoagland o este mismo medio suplementado con 75 mM NaCl durante 40 días, no presentaron diferencias significativas con respecto a las concentraciones de Na^+ y K^+ entre las distintas líneas (Fig. R32B). Sin embargo, en condiciones de transpiración (cultivo en semilleros alveolares con turba:vermiculita en proporción 1:1 y regadas con solución nutritiva para riego de *Arabidopsis*, o bien con esta misma solución suplementada con 100 mM de NaCl durante 7

días), las plantas mutantes *athkt1,1* cultivadas en condiciones de estrés salino presentaron una mayor acumulación de Na^+ y menor de K^+ en la parte aérea, y por consiguiente, una mayor razón Na^+/K^+ que las plantas de la variedad silvestre Col. 0 (Fig. R32A).

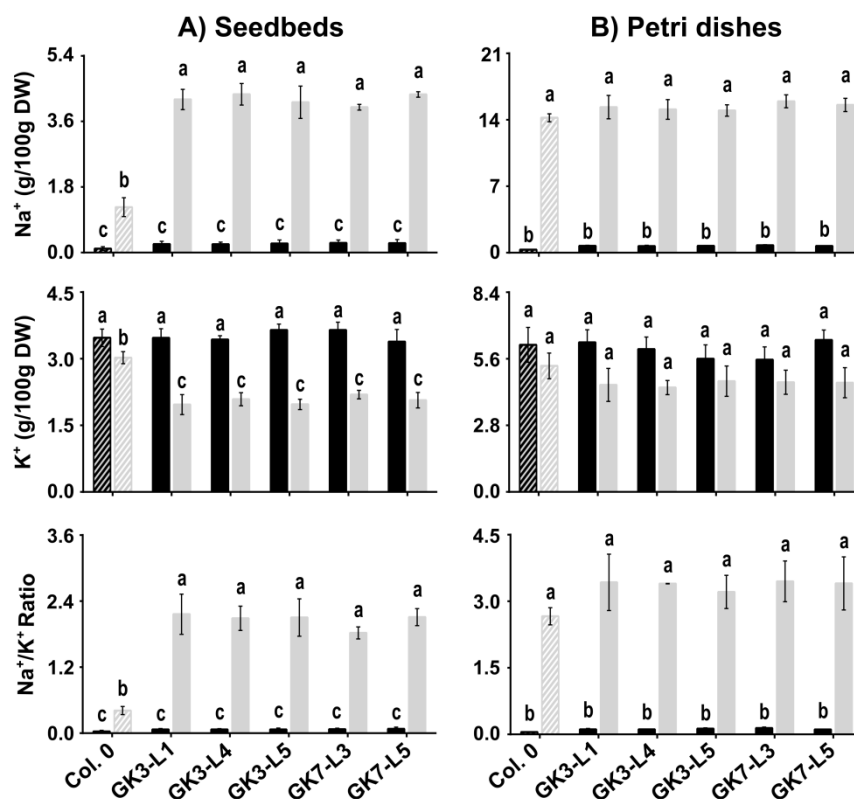


Figure R32. Aerial part contents of Na^+ and K^+ in control and salt-treated plants grown in seedbeds (A) and Petri dishes (B). Aerial part contents of Na^+ and K^+ in control (closed bars) and salt-treated plants (open bars) from Col. 0 and *athkt1,1* mutant lines. *Arabidopsis* plants were grown in seedbeds (transpiring conditions) and Petri dishes (non transpiring conditions) as indicated in legends of figures R10 and R11 respectively. Values represent the mean $\pm$ SEM of three different samples. Significant differences ($P < 0.05$) are indicated by different letters, according to Tukey's test.

R3. COORDINACIÓN DE *SISOS1* Y *SIHKT1* EN EL TRANSPORTE DE SODIO Y POTASIO A LARGA DISTANCIA.

Un aspecto importante a estudiar en el contexto de la homeostasis iónica bajo condiciones salinas en tomate es la existencia de algún tipo de coordinación entre *SISOS1* y las isoformas de *SIHKT1* en el control del transporte de Na^+ a larga distancia, e indirectamente el de K^+ , un aspecto que parece clave en la tolerancia del tomate a la salinidad. Nuestra hipótesis de trabajo es que la acción coordinada de ambos tipos de transportadores determinaría en último término la cantidad de Na^+ que deja las raíces, la que se retiene en el tallo o la que se transfiere a las hojas. Para ello, se ha estudiado en qué tejido se localizan la expresión de los genes *HKT1* y *SOS1* en las líneas *NILs*. Asimismo, se estudió el patrón de expresión en función del estadio de desarrollo de los órganos de la planta en una línea silenciada (*RNAi*) para el gen *SISOS1* en plantas de tomate (*S. lycopersicum* cv. Moneymaker), previamente generada en nuestro laboratorio (Olías *et al.*, 2009a, 2009b).

R3.1. LOCALIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES HKT1 Y SOS1 MEDIANTE RT-PCR *IN SITU*

La localización de la expresión tisular de estos dos transportadores en tomate se determinó mediante la técnica de PCR *in situ* (Apartado M8). Esta técnica permite la localización semi-cuantitativa de mRNA directamente en los tejidos de la planta, incorporando nucleótidos marcados que se detectan posteriormente mediante inmunohistoquímica (colorimetría o fluorescencia). La expresión del transcrito de ambas isoformas, *HKT1;1* y *HKT1;2*, fue detectada en el haz vascular de hojas de tomate, tanto en el nervio foliar principal como en los nervículos secundarios (Fig. R33A). En el tejido radical, únicamente se detectó la expresión de *HKT1;2*, concretamente en las células de la estela o cilindro vascular (Figura R33B), mientras que la expresión de *HKT1;1* fue indetectable en este tejido mediante el uso de esta técnica. Estos resultados indican que ambos transportadores se localizan en las células del parénquima xilemático y, posiblemente también, en células acompañantes del floema (Figura R33C). La expresión de *SOS1* fue detectada en los mismos tejidos que la de *HKT1;1* y *HKT1;2* en hoja (Fig. R33A), mientras que en raíces, fue detectada tanto en el cilindro vascular como en las células del córtex y la epidermis (Fig. R33B).

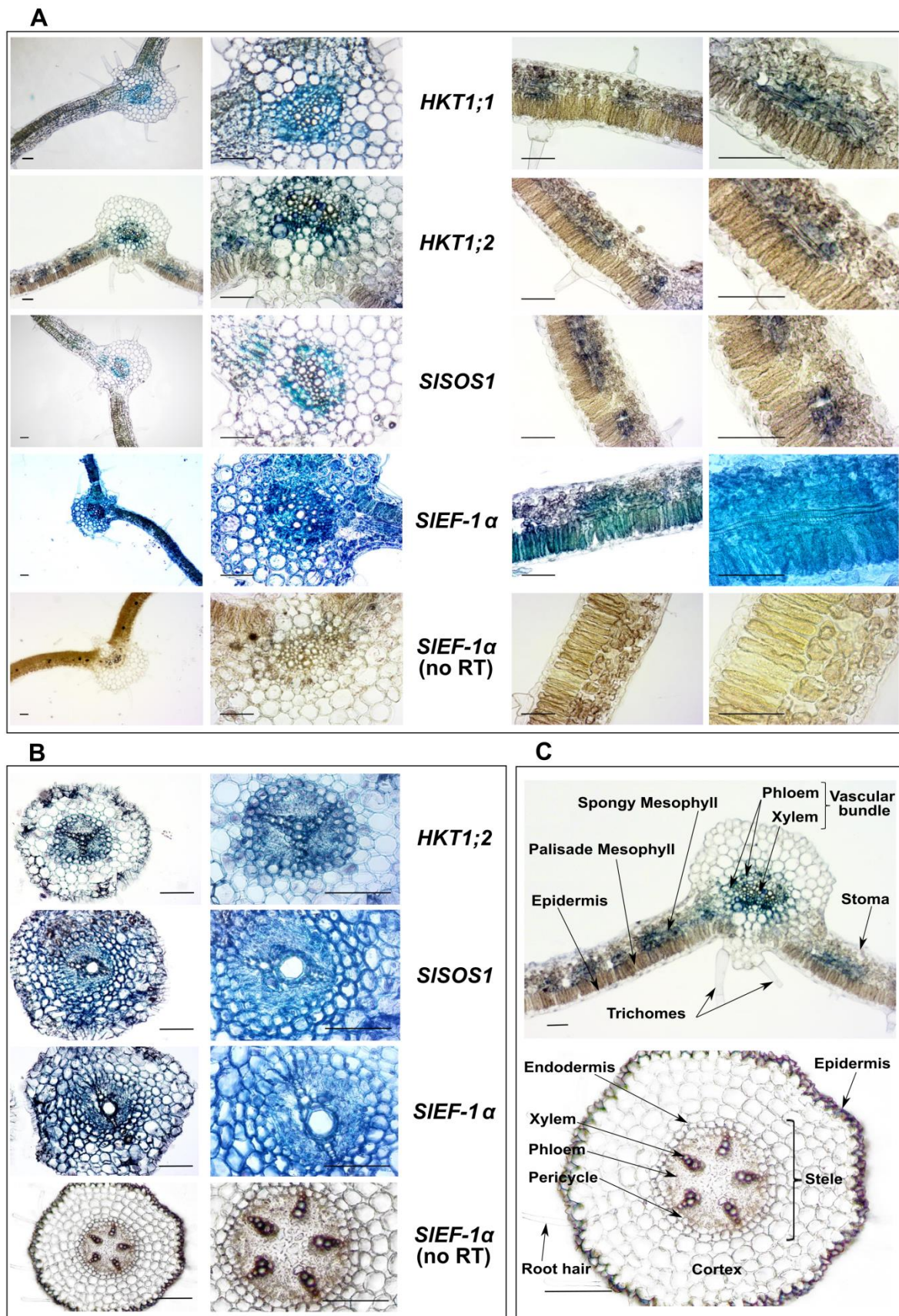


Figure R33. Tissue localization of tomato *HKT1;1*, *HKT1;2* and *SOS1* genes by *in situ* PCR. Blue stain indicates the presence of transcript. Expression of elongation factor-1 α (*LeEF-1 α* is seen in all cell types) is shown as positive control while a no RT (no reverse transcription) is used as negative control to show lack of genomic DNA contamination. A) Shows the expression of *HKT1;1*, *HKT1;2*

and *SOS1* in the vascular bundle of leaf sections (midvein in the left panels). **B)** Vasculature-specific expression of *HKT1;2* and expression of *SOS1* in the vascular stele, cortex and epidermis, both of them in root sections. **C)** Diagram of a leaf cross-section (top panel) and a root cross-section (lower panel) showing the different tissues. Images on the right are magnifications on their respective left images. Scale bars represent 100 μm .

R3.2. EXPRESIÓN DE LOS GENES *HKT1;1* Y *HKT1;2* EN LINEAS SILENCIADAS *SISOS1*

Con objeto de ver si existe algún tipo de coordinación funcional entre miembros de la ruta SOS, como el antiportador Na⁺/H⁺, *SOS1* y las proteínas HKT1 de tomate, estudiamos la expresión de los genes *SISOS1*, *SIHKT1;1* y *SIHKT1;2* en una línea silenciada *SOS1-RNAi*, (con fondo genético *S. lycopersicum* cv. Moneymaker), previamente obtenida en nuestro laboratorio (Olías *et al.*, 2009a, 2009b). Las plantas se cultivaron en sistema hidropónico con solución Hoagland ¼ durante tres semanas y posteriormente se trataron con la misma solución suplementada con NaCl 100 mM, recogiendo muestras de tejido para su posterior análisis los días 1, 3 y 10 de tratamiento salino. La determinación de la expresión de los genes *SISOS1*, *SIHKT1;1*, *SIHKT1;2* se llevó a cabo en raíz, tallo joven, tallo viejo, hoja joven y hoja vieja (Fig. R34, recuadro superior derecho).

Como era de esperar, en las plantas en las que se había silenciado el gen *SISOS1* (Olías *et al.*, 2009a, 2009b), el nivel de expresión de dicho gen fue significativamente menor que en las plantas no silenciadas a lo largo de todo el tratamiento salino (Fig. R34A). Si bien, fue apreciable una ligera expresión del gen *SOS1* conforme aumentaba la duración del tratamiento en las plantas silenciadas, hecho que podría ser debido a un efecto de estabilización del ARNm por el tratamiento salino (Chung *et al.*, 2008). El máximo de expresión de *SISOS1* en plantas no silenciadas se observó a los 3 días de tratamiento, produciéndose una notable disminución de la expresión a los diez días, momento en el cual las plantas ya presentaban claros síntomas de senescencia, típicos de su fenotipo hipersensible a la salinidad (Olías *et al.*, 2009a). En ausencia de estrés (día 0), la mayor expresión de *SISOS1* se observó en hoja, tanto joven como vieja, produciéndose menor expresión en tallo viejo, aunque dichas diferencias de expresión entre un tejido y otro no fueron significativas (Fig. R34A).

Con respecto al efecto de la salinidad sobre la expresión de las isoformas de *SIHKT1* en plantas de tomate Moneymaker silvestres y plantas *SISOS1-RNAi* en diferentes tejidos de tomate, la expresión de *SIHKT1;1* aumentó drásticamente por el efecto de la sal en todos los tejidos, tanto en las plantas silvestres como en las plantas silenciadas para *SISOS1*, siendo este aumento mucho más drástico en el caso de las plantas silenciadas (Fig. R34B). En el caso del gen *SIHKT1;2*, el comportamiento fue aparentemente distinto al de *SIHKT1.1*, de manera que en las plantas silenciadas se produjo una disminución del nivel de expresión, indicando que ambas isoformas podrían estar reguladas de forma diferencial (Fig. R34C). Todo ello sugiere la existencia de una coordinación funcional entre los transportadores de Na⁺ *SOS1*, *HKT1;1* y *HKT1;2*, ya que cuando hay pérdida de función de *SISOS1*, que participa tanto en la extrusión al medio como en la carga

xilemática de Na^+ , también se afectan los procesos de descarga xilemática de Na^+ a través de los transportadores de tipo HKT1 de todos los tejidos.

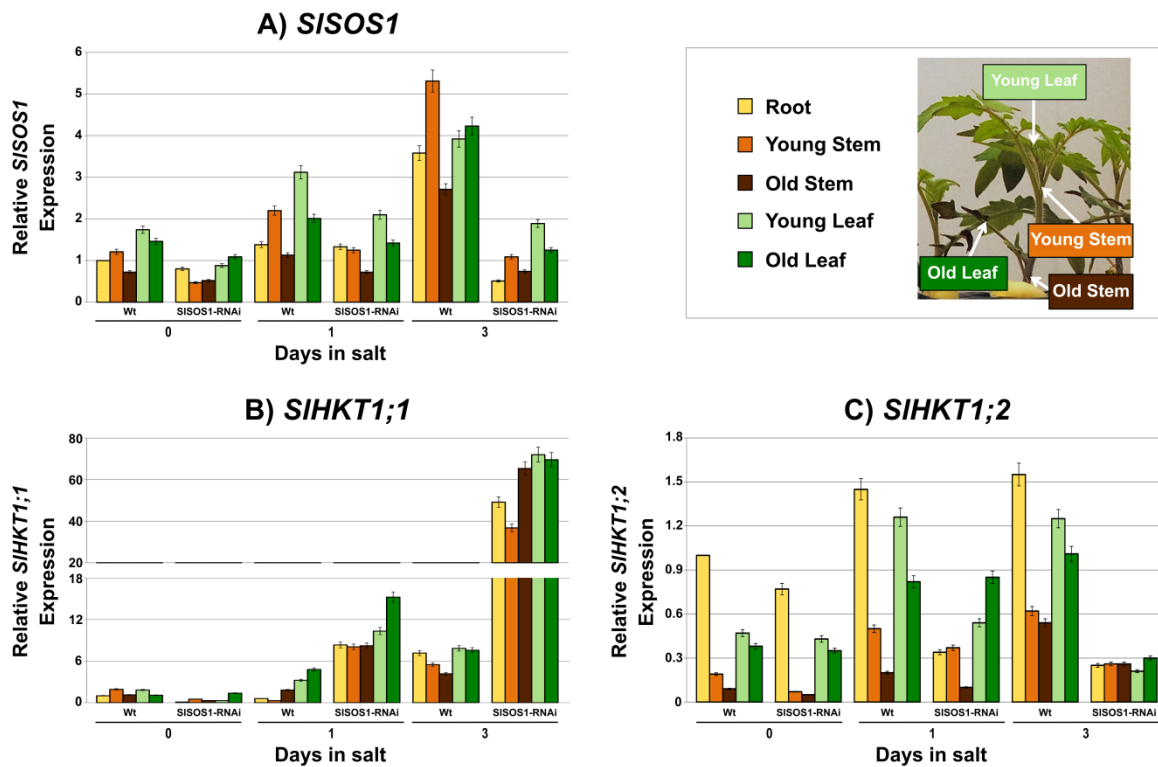


Figure R34. Gene expression analysis of *SISOS1*, *SIHKT1;1* and *SIHKT1;2* in response to salt stress in wild type and an homozygous T3 *SOS1*-silenced line of tomato (*S. lycopersicum* var. **MoneyMaker**). Total RNA was isolated from tissues of tomato plants treated with 100 mM NaCl for 0, 1, 3 days in hydroponic cultures. Transcript level was analyzed by RT-qPCR using primers described in Table M19. The tomato elongation factor gene (*LeEF1-a*) was used as the reference gene. The relative expression level was calculated using the equation $2^{-\Delta\Delta C_t}$ using the expression level of each gene in roots from WT at day 0 of NaCl treatment as the calibrator sample (equal to 1).

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSSION

D1. HKT1;1 Y HKT1;2 SON DOS GENES DE TOMATE QUE CODIFICAN A SENDOS TRANSPORTADORES ESPECÍFICOS DE SODIO DE LA SUBFAMILIA 1 DE HKT

Los transportadores de iones de la familia HKT son cruciales para la tolerancia a la salinidad en las plantas, ya que junto a otros transportadores, son responsables de la homeostasis de Na⁺, e indirectamente de la de K⁺, así como de la distribución de Na⁺ dentro de la planta (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006; Hauser y Horie, 2010; Pardo y Rubio, 2011). En este trabajo de Tesis Doctoral, hemos aislado dos isoformas génicas de tomate, *SlHKT1;1* y *SlHKT1;2*, que según el análisis de sus respectivas secuencias y filogenia, se clasifican dentro de la subfamilia 1 (o clase I) de transportadores HKT (Figs. R1 y R2) (Platten *et al.*, 2006b). Un análisis en mayor profundidad de sus respectivas secuencias, detallado mas abajo, predice para estas dos isoformas, una función como transportadores específicos de Na⁺.

Las proteínas HKT de plantas superiores se pueden dividir en dos subfamilias, teóricamente con distintas selectividades iónicas (Platten *et al.*, 2006b; Hauser y Horie, 2010), si bien, se ha propuesto una subfamilia 3, para el encaje filogenético de miembros de plantas superiores primitivas, tales como *Selaginella* y *Physcomitrella* (Hauser y Horie, 2010; Su *et al.*, 2015). Se ha sugerido que un residuo conservado de Gly en el filtro selectivo del canal de K⁺ (GYG de los dominios *P-loop*, ver Fig. I18) determina la selectividad iónica de los transportadores HKT (Mäser *et al.*, 2002). En los transportadores HKT de la subfamilia 2 (o clase II), la presencia de un residuo de Gly en el primer dominio en *P-loop* está muy conservada, determinando una fuerte permeabilidad al K⁺. Sin embargo, algunos miembros de este grupo están claramente implicados en la absorción primaria de Na⁺ en las raíces bajo condiciones externas de cultivo particulares, tales como la deficiencia de K⁺ (Horie *et al.*, 2007). Los transportadores de la subfamilia 3 (o clase III) son similares a la subfamilia 2, ya que presentan el residuo de Gly en el primer *P-loop*, postulándose una actividad de cotransporte K⁺-Na⁺ para algunos de sus miembros (Haro *et al.*, 2009; Haro *et al.* 2010; Su *et al.*, 2015).

En cambio, en la clase I de los transportadores HKT, la presencia de una Ser en lugar de una Gly en la región *PA-loop* (Fig. R1, I18) parece ser la característica clave que determina la conductancia preferencial de Na⁺ (Mäser *et al.*, 2002; Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006; Horie *et al.*, 2009; Hauser y Horie, 2010). Los miembros de esta clase caracterizados hasta ahora (*AtHKT1;1*, *OsHKT1;1*, *OsHKT1;5*, *TmHKT1;5-A* y *TaHKT1;5-D*) se han descrito como transportadores de Na⁺ localizados en la membrana plasmática de células del parénquima que rodean los vasos de xilema, responsables de la descarga de Na⁺ en el xilema, evitando así la acumulación de Na⁺ en la parte aérea de la planta (Uozumi *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2005; Sunarpi *et al.*, 2005; Davenport *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2011; Munns *et al.*, 2012).

Como en el caso de los transportadores de la clase II, también se han observado algunas excepciones en relación a la actividad de transporte de los transportadores de la clase I, especialmente cuando éstos se expresaron en sistemas heterólogos (Fairbairn *et al.*,

2000; Su *et al.*, 2003). Sin embargo, dichas excepciones fueron mucho más complejas de lo esperado. En la planta halófila *Thelungiella salsuginea*, una de las isoformas perteneciente a la clase I, TsHKT1;2, mostró una fuerte actividad transportadora para el K^+ , altamente selectiva con respecto al Na^+ (Ali *et al.*, 2012). Esta capacidad para transportar K^+ fue atribuida a la presencia de dos residuos de *Aspartato* (D), D207 y D238, en los dominios transmembrana M_{2B} y poro P_B . En estas dos mismas posiciones se encontraron residuos de *Asparagina* (Asn) en *Arabidopsis* y en todas las demás secuencias de plantas conocidas (Ali *et al.*, 2012). Tales residuos de *Aspartato* no están presentes en la secuencia de ninguna de las isoformas de tomate, lo cual nos indica que éstas son más próximas a la secuencia de los transportadores típicos de Na^+ (Fig. R1).

Mediante expresión heteróloga en células mutantes de levadura, defectivas para los transportadores endógenos de K^+ (TRK1 y TRK2) y subsiguientes ensayos de transporte de cationes, hemos podido concluir que HKT1;1 de tomate es un transportador selectivo de Na^+ que no se ve afectado por K^+ (Fig. R6), tal y como se observó en el caso de AtHKT1;1 (Uozumi *et al.*, 2000). Sin embargo, todos los ensayos de transporte realizados con diferentes clones obtenidos en diferentes eventos de transformación de levadura que expresaban SIHKT1;2 fueron infructuosos, por lo que no fue posible determinar su selectividad iónica y actividad de transporte. Esta es una situación que ocurre con frecuencia en este tipo de ensayos, tal y como se ha descrito previamente en relación con ciertas isoformas de HKT de arroz y que podría deberse a una expresión deficiente, a una localización errónea o a un problema de regulación (Garcíadeblás *et al.*, 2003, Haro *et al.*, 2005). Una explicación alternativa podría ser que la falta de actividad de SIHKT1;2 expresado en levadura se deba a diferencias en la secuencia genómica, tales como 22 aminoácidos extra en SIHKT1;2, entre los dominios transmembrana M_{2A} y M_{1B} , que no aparecían en las secuencias de SIHKT1;1 ni en la de AtHKT1;1. Sin embargo, su efecto en la estructura de la proteína y, como consecuencia, en la función de la misma y/o su actividad es muy probablemente limitada, debido a la escasa homología que muestra esta región, comparada con las proteínas de tipo HKT1 de *S. lycopersicum* y con los transportadores HKT de otras plantas (Figs R1 y R3).

Otra posibilidad que explicara la falta de actividad de SIHKT1;2, podría ser por la existencia de un 5'-UTR, predicho en la secuencia genómica de *SIHKT1;2*, anotado por el ITAG2.40 (<http://solgenomics.net/>), que afectaría a los 13 primeros aminoácidos de su ORF putativo (ver Fig. R1). Sin embargo, tras una consulta reciente a las bases de datos genómicos de tomate, se ha comprobado que dicho 5'UTR ya no aparece en la última versión de la secuencia anotada actualizada por el ITAG (versión 3.2, Junio de 2017, <https://solgenomics.net>). Este error aparente en la anotación determinó en su momento que se llevara a cabo el clonaje de dos versiones diferentes del gen *SIHKT1;2*, una versión completa (*Full Length* -FL-), y otra, que carecía del UTR en el extremo 5' (NUT -non-UTR-), y que ambas versiones fueran expresadas en la levadura mutante y ensayadas para su actividad de transporte de Na^+ . De nuevo, en tales ensayos se encontró una absorción de Na^+ de tipo lineal, muy similar al tipo de absorción de Na^+ mostrado por las cepas que

portaban el vector vacío (Fig. R14), lo cual indicaba una falta de funcionalidad de dicha proteína transportadora.

Finalmente, se decidió no continuar con la caracterización funcional de SIHKT1;2 en levaduras, ya que, por entonces, Almeida *et al.* (2014a, 2014b), utilizando una estrategia de expresión heteróloga de dicho transportador en oocitos de *Xenopus laevis* y TEVC (*Two-Electrode Voltage Clamp*), realizaron con éxito dicha caracterización, describiendo a HKT1;2 como un transportador específico de Na⁺ de baja afinidad.

D2. HKT1;1 Y HKT1;2 DE TOMATE SE EXPRESAN ESPECIFICAMENTE EN LOS HACES VASCULARES

Los genes *HKT1;1* y *HKT1;2* de tomate codifican sendos transportadores selectivos de Na⁺ de la clase I (Apartado D1; Almeida *et al.*, 2014a, 2014b), que se expresan de forma ubicua en raíces, tallos, hojas, flores y frutos (ver Fig. R4). Además, utilizando un protocolo de RT-PCR *in situ* (Athman *et al.*, 2014), hemos encontrado que *HKT1;2* de tomate se expresa en el sistema vascular, tanto en células del xilema como del floema, en hojas y raíces, mientras que la expresión de *HKT1;1* solo se detecta en el mismo tipo de células en hojas (Fig. R33). La expresión de *HKT1;1* no se detectó en raíces, probablemente debido a su baja expresión (Figs. R17, R18, Almeida *et al.* 2014b).

En un estudio previo, plantas de *Arabidopsis* transformadas con *SIHKT1;2_{prom.}::GUS* mostraron que las células adyacentes al tejido vascular del xilema y del floema se teñían fuertemente, tanto en hojas como en raíces (Almeida *et al.*, 2014a). Como con otros transportadores HKT de clase I de dicotiledóneas y monocotiledóneas caracterizados hasta la fecha, es probable que *HKT1;1* y *HKT1;2* de tomate sean responsables de la descarga de Na⁺ del xilema, evitando así la acumulación de este catión en la parte aérea (Sunarpi *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2005; Munns *et al.*, 2012; Byrt *et al.*, 2014). Dicha localización también sugiere que además de la descarga de Na⁺ del xilema, *HKT1;1* y/o *HKT1;2* podrían estar implicados en la carga de Na⁺ en los elementos cribosos del floema. Ello sugeriría su participación en la redistribución de Na⁺ hacia los órganos y tejidos sumidero, tal y como se hipotetizaba en el caso de *AtHKT1;1* (Mäser *et al.*, 2002; Berthomieu *et al.*, 2003; Sunarpi *et al.*, 2005), a pesar de que este papel funcional ha sido seriamente cuestionado (Davenport *et al.*, 2007). Sin embargo, existen evidencias de que *HKT1;1* y/o *HKT1;2* de tomate podrían estar implicados en la carga de Na⁺ en la savia del floema en hojas y su descarga en órganos sumidero, tales como los frutos y las raíces (Asins *et al.*, 2015).

D3. HKT1;1 Y/O HKT1;2 PODRÍAN SER RESPONSABLES DE LA AGRUPACIÓN DE QTLs MAYORITARIOS IMPLICADOS EN LA HOMEOSTASIS DE Na⁺/K⁺ EN LA PARTE AÉREA, SEGÚN UN ANÁLISIS DE GENES CANDIDATOS EN DOS POBLACIONES DE RILs Y DE EXPRESIÓN GÉNICA EN DOS NILs DE TOMATE

La tolerancia a la salinidad es un rasgo cuantitativo en plantas (Flowers, 2004; Cuartero *et al.*, 2006). La identificación de los loci de rasgos cuantitativos (QTLs) que controlan esta característica es de gran importancia para producir cosechas tolerantes a la salinidad (Flowers, 2004; Cuartero *et al.*, 2006). En un estudio previo, utilizando las poblaciones RIL-P (*S. lycopersicum* x *S. pimpinellifolium*) y RIL-C (*S. lycopersicum* x *S. chesmaniae*), se identificó en el cromosoma 7 un grupo de QTLs mayoritarios que controlan las concentraciones de Na⁺ y K⁺ en la parte aérea de la planta cultivada bajo condiciones salinas (Villalta *et al.*, 2007, 2008). En dicho estudio, se probaron como genes candidatos un grupo de genes que codifican transportadores de Na⁺ (LeNHX1 y LeNHX3, SISOS1 y sus proteínas reguladoras, SISOS2 y SISOS3), por estar implicados en la homeostasis de Na⁺/K⁺ en tomate (Olías *et al.*, 2009a,b; Huertas *et al.*, 2012; Gálvez *et al.*, 2012), pero ninguno de estos genes se localizó en aquella región genómica para dichos QTLs (Villalta *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta la relevancia que los genes de tipo HKT1 tienen en la determinación de QTLs que controlan la concentración de Na⁺ y K⁺ en la tolerancia a la salinidad en otras especies (Ren *et al.* 2005; Rus *et al.* 2006, Huang *et al.* 2006; James *et al.* 2006, 2011; Byrt *et al.* 2007), como objetivo esencial de la presente Tesis Doctoral, se decidió estudiar los genes HKT como genes candidatos para aquellos QTLs implicados en la homeostasis de Na⁺/K⁺ encontrados en tomate por Villalta *et al.* (2007, 2008).

D3.1. HKT1;1 Y/O HKT1;2 SON GENES CANDIDATOS POSICIONALES DE LA AGRUPACIÓN DE QTLs MAYORITARIOS QUE CONTROLAN LA HOMEOSTASIS DE Na⁺/K⁺

HKT1;1 y *HKT1;2* se localizaron juntos en el cromosoma 7 de ambas poblaciones RILs, P y C (Fig. R7), en una posición genómica que coincidía con la posición de máxima puntuación LOD para los QTLs anteriormente mencionados (Tabla D1, Figs. R8 y R9) (Asins *et al.*, 2013). Por otro lado, la secuenciación completa de la especie de tomate *S. lycopersicum* cv Heinz 1709 confirmó que *HKT1;1* y *HKT1;2* se localizaban en tándem en el cromosoma 7, a una distancia de aproximadamente 6 kb (Tabla R2) (<http://solgenomics.net/>). Además, cuando se consideraba únicamente el mapa con los SNPs de SolCAP (*Solanaceae Coordinated Agricultural Project*, <http://solgenomics.net/>) para el análisis de QTLs, *HKT1;1* y *HKT1;2* estaban sólo a 35kb del SNP con la máxima puntuación LOD para LNC, LKC, LKN, SNC, SKC, TN y NLS en condiciones salinas, y para LKN y SNC en condiciones control (ver Tabla D2) (Asins *et al.*, 2013), lo cual es coincidente con el rango de posiciones en las cuales se encontraron otros genes responsables de QTLs (Price, 2006).

Table D1. Significant LOD scores, percentage of explained variance (PEV) and additive values (*a*) by using MQM procedure for traits that presented maximum LOD at HKT1 genes in both the P and C population of RILs. Negative *a* values correspond to the wild allele. ^aAnother significant QTL in C7 is located at marker TG35_506 for NLS (LOD = 2.4, PEV = 9.6, *a* = -8.89). Taken from Asins *et al.* (2013).

P-Population				C-Population			
Trait	LOD at HKT1	PEV	<i>a</i>	LOD at HKT1	PEV	<i>a</i>	Trait
logLNC_S	13.69	37.00	-0.08	9.32	33.50	-305.75	LNC_S
LKC_S	4.03	12.70	59.71	7.14	26.90	0.65	LKC_S
sqLKN_S	14.15	37.90	0.17	10.34	36.40	0.39	LKN_S
logSNC_S	10.77	30.40	-0.08	10.75	37.60	-493.25	SNC_S
SKC_S	2.57	8.30	92.04	5.75	22.30	0.61	SKC_S
TN_S	13.31	36.10	-0.32	6.48	24.70	-0.52	TN_S
NLS_S	3.24	10.80	7.70	4.52 ^a	25.00	11.56	NLS_S
NLC_C	6.40	19.40	-17.74				
LKN_C	7.24	21.60	4.17				
SNC_C	6.15	18.70	-29.79				

Otros genes candidatos en esta región genómica también podrían ser responsables para estos QTLs, particularmente *lkc7.1*. En una búsqueda de otros genes de tomate que codificaban transportadores putativos de Na⁺ o K⁺ en el intervalo físico de 10 Mb, que abarcan los loci de *SlHKT1;1* y *SlHKT1;2* del cromosoma 7 (secuencia genómica de tomate anotada por el ITAG2.40, <http://solgenomics.net/>), se identificaron otros candidatos funcionales (Tabla R2). Sin embargo, todos ellos estaban a más de 3.5 Mbp de *Solcap_snp_sl_57007* (Citocromo P450; 40.805 cM, 5 056 490 bp, ver Tabla R2) donde se encuentra la puntuación máxima LOD para el QTL que controla las concentraciones de Na⁺ y K⁺ (Tabla D2). Dado el intervalo de confianza de 1 LOD en los análisis de QTL que aparecen en la Tabla D2, el(los) gen(es) responsable(s) probablemente estará(n) situado(s) en un intervalo físico de 1113481 bp (entre *SolCAP SNPs 45591* y *57007*). Por lo tanto, *HKT1;1* y/o *HKT1;2* son los principales genes candidatos, por posición y posiblemente funcionales, subyacentes a la agrupación de QTLs relacionados con la homeostasis de Na⁺/K⁺ en el cromosoma 7.

Table D2. LOD scores, percentage of explained variance (PEV) and additive values (*a*) for significant and adjacent SolCAP single-nucleotide polymorphisms (SNPs; <http://solgenomics.net>) in chromosome P7 by using MQM procedure for traits that presented maximum LOD at *HKT1* genes in the P population of RILs (Table D1). Negative *a* values correspond to the wild allele. Taken from Asins *et al.* (2013).

SolCAP SNP no.	45 591	57 007	57 002/56 997	56 998
LOD LogLNC_S	0.08	13.10	12.22	0.04
PEV	0.20	35.60	33.70	0.10
<i>a</i>	0.03	-0.08	-0.08	0.02
LOD LKC_S	0.01	4.89	4.77	0.01
PEV	0.00	15.20	14.80	0.00
<i>a</i>	11.76	68.71	68.15	12.78
LOD sqLKN_S	0.03	15.44	14.37	0.05
PEV	0.10	40.50	38.30	0.10
<i>a</i>	-0.04	0.18	0.18	-0.05
LOD logSNC_S	0.28	9.08	8.38	0.08
PEV	0.70	26.30	24.50	0.20
<i>a</i>	0.06	-0.08	-0.07	0.04
LOD SKC_S	0.11	3.29	3.06	0.02
PEV	0.30	10.50	9.80	0.10
<i>a</i>	100.78	108.92	105.56	-49.17
LOD TN_S	0.08	12.30	11.61	0.01
PEV	0.20	33.90	32.30	0.00
<i>a</i>	0.13	-0.32	-0.32	0.05
LOD NLS_S	0.04	3.84	3.65	0.00
PEV	0.10	12.60	12.10	0.00
<i>a</i>	-4.39	8.79	8.61	-1.17
LOD LNC_C	0.08	6.18	6.39	0.21
PEV	0.20	18.80	19.30	0.60
<i>a</i>	10.78	-18.37	-18.71	-17.20
LOD LKN_C	0.16	5.49	5.46	0.04
PEV	0.40	16.80	16.80	0.10
<i>a</i>	-3.35	3.87	3.88	1.77
LOD SNC_C	0.02	8.99	8.87	0.04
PEV	0.00	26.10	25.80	0.10
<i>a</i>	-8.20	-37.04	-36.94	-12.85

D3.2. EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA TAMBIÉN SUGIERE A *HKT1;1* Y/O *HKT1;2* COMO GENES RESPONSABLES DE LA AGRUPACIÓN DE QTLs QUE CONTROLAN LA HOMEOSTASIS DE Na⁺/K⁺

Para comprobar si la variación alélica de *HKT1;1* y *HKT1;2* subyacía funcionalmente al grupo de QTLs de Na⁺/K⁺ del cromosoma 7, se estudiaron los patrones de expresión de NIL14 (doble homocigota para los alelos de *HKT1;1* y *HKT1;2* de *S. cheesmaniae*, denominados *ScHKT1;1* y *ScHKT1;2*, respectivamente) y NIL17 (doble homocigota para los alelos de *HKT1;1* y *HKT1;2* de *S. lycopersicum*, denominados *SlHKT1;1* y *SlHKT1;2*, respectivamente) (Fig. R16), así como las diferencias en la secuencia

nucleotídica (INDELs -inserción/delección- y SNPs -single nucleotide polymorphism-), particularmente en la región 5' reguladora aguas arriba (Figs. R10, R11 y R12).

HKT1;1 y *HKT1;2* mostraron un complejo patrón de expresión. El nivel de expresión de *ScHKT1;2* en las raíces de NIL14 fue más bajo que el de *SlHKT1;2* en NIL17, mientras que la expresión de *ScHKT1;1* y *ScHKT1;2* en hojas fue mucho mayor en cualquiera de los días de tratamiento salino (Fig. R16). En otros estudios se ha documentado que los niveles de expresión de los transportadores HKT1 están directamente relacionados con la tolerancia a la salinidad y con la distribución específica de Na⁺ en los tejidos según la especie vegetal. En arroz y trigo, cuyas variedades más tolerantes acumulan menos Na⁺ en hojas (y tienen una elevada razón K⁺/Na⁺ en hojas), las variantes alélicas altamente expresadas y/o hiperactivas de los transportadores de tipo HKT1 soportan funcionalmente similares QTLs (Ren *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006b; James *et al.*, 2006; Byrt *et al.*, 2007). En *Arabidopsis*, donde la tolerancia a la salinidad de algunos ecotipos está asociada con una mayor concentración de Na⁺ en la parte aérea, los alelos débiles de *AtHKT1;1* (débilmente expresados) son típicos de ecotipos adaptados a las zonas costeras y los suelos salinos en Europa (Rus *et al.*, 2006; Baxter *et al.*, 2010; Jha *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta la similaridad funcional descrita en dicotiledóneas (Hauser y Horie, 2010), y dada la localización de ambas isoformas en el cilindro vascular de hojas y raíces (Fig. R33), sería razonable esperar que *HKT1;2* controlase la descarga de Na⁺ xilemática en raíces. Una baja expresión de *ScHKT1;2* en las raíces de NIL14 debería implicar una menor recuperación de Na⁺ procedente del xilema de este órgano y en consecuencia, en esta NIL debería transportarse más Na⁺ a través de la corriente de transpiración hacia la parte aérea en comparación con NIL17. Al mismo tiempo, un aumento en la expresión de *ScHKT1;2* y hasta cierto punto, en la expresión de *ScHKT1;1* en hojas podría aumentar la retirada de Na⁺ del xilema, provocando así su acumulación intracelular en las células del mesófilo de las hojas. También se podría especular que la contribución de la isoforma *HKT1;2* en los movimientos de Na⁺ en tomate es mayor que la de *HKT1;1*, ya que los niveles de expresión de las variantes alélicas de *HKT1;2* son mayores que los de las variantes alélicas de *HKT1;1*, cuando los datos de expresión relativa se calcularon utilizando la expresión de *HKT1;1* de cada NIL, tejido y días de tratamiento como muestras calibradoras (Fig. R17). Además, *HKT1;2* tiene un perfil de expresión similar al encontrado en la literatura para *AtHKT1;1* (alta expresión en la raíz y baja en la parte aérea, patrón diferente al encontrado para *SlHKT1;1*) y la NIL con mayor expresión de *HKT1;2* tiene una menor concentración de Na⁺ en la parte aérea, aunque dicha diferencia no fue significativa (Tabla D3). Por lo tanto, se podría sugerir que esta isoforma tiene un papel similar al de *AtHKT1;1*, especialmente en las raíces, mientras que *HKT1;1* de tomate podría funcionar principalmente en hojas. A este respecto, el papel esencial de *HKT1;2* en la regulación de la homeostasis de Na⁺/K⁺ en tomate será demostrado en los experimentos de silenciamiento génico por RNAi en tomate y será discutido en el apartado D4.

Las diferencias observadas en los niveles de expresión de los genes de tipo *HKT1* en las NILs de tomate podrían ser explicadas por las diferencias en su secuencia promotora, las cuales alterarían las posibles uniones de los elementos reguladores. En distintos ecotipos de *Arabidopsis*, las variaciones alélicas de *AtHKT1;1* reguladoras en *cis* y el consiguiente efecto en su expresión se han relacionado con las diferencias en la tolerancia a la salinidad (Rus *et al.*, 2006; Baxter *et al.*, 2010). Una delección en el promotor de *ScHKT1;1* a aproximadamente 1251 pb (Fig R11) podría originar potencialmente una caja TATA adicional que no aparece en *SIHKT1;1* ni en Heinz (Tabla R3), justo antes del comienzo de la transcripción. La adición de esta caja TATA podría explicar por qué NIL14 tiene un nivel de expresión mucho más alto para *ScHKT1;1* que NIL17 para *SIHKT1;1* en raíces y hojas (Fig. R16). El hecho de que *ScHKT1;2* tenga una caja ARR1AT menos que *SIHKT1;2* (Tabla R4) podría ser la causa de la menor expresión de *ScHKT1;2* en las raíces de NIL14, en comparación con *SIHKT1;2* de NIL17 (Fig. R16), ya que los factores de transcripción de tipo ARR, implicados en la señalización de las citoquininas, han demostrado tener un papel relevante en la regulación de la expresión génica de *AtHKT1;1* en las raíces en respuesta a citoquinina (Mason *et al.*, 2010). Todavía no está claro cómo las diferencias en la frecuencia de otros elementos reguladores en *cis* (Tablas R3 y R4) afectan a la expresión de los genes *HKT1* de tomate. Podría ser posible que otras diferencias alélicas en la región 5', "aguas arriba" de la secuencia del promotor (además de aquellas mostradas en este estudio) podrían contener motivos críticos implicados en las diferencias en la expresión génica de las NILs. Por ejemplo, la expresión reducida de *AtHKT1;1* en la raíz observada en los ecotipos costeros de *Arabidopsis* se ha atribuido a una delección en una secuencia repetida en tándem situada entre 5 y 3 kb "aguas arriba" de la secuencia que codifica *AtHKT1;1*, la cual afectó a un grupo de microRNAs (Rus *et al.*, 2006). Para averiguar si estos mismos elementos reguladores en *cis*, predichos en el análisis *in silico*, son responsables de las diferencias observadas en los niveles de expresión de cada NIL se requeriría de un análisis de las regiones promotoras de las variantes alélicas de ambas isoformas, mucho mas aguas arriba del codón de inicio (5 a 8 kb) que las estudiadas aquí, y que no ha podido llevarse a cabo en el contexto de esta Tesis Doctoral.

Tal y como se ha descrito previamente en Jha *et al.* (2010), es importante tener en cuenta que los cambios en la expresión génica no tienen por qué ir unidos a los cambios en la abundancia de proteínas, ni ser una indicación del grado de actividad que pueden exhibir dichos transportadores. Sin embargo, podrían existir diferencias entre genotipos con respecto a la efectividad de los reguladores de esas proteínas o, como ocurre en nuestro trabajo, la única sustitución aminoacídica encontrada en la región en hélice M_{1B} de la variante alélica *ScHKT1;1* (Fig. R1) podría haber alterado la actividad del transportador (esta cuestión se discutirá a continuación y en el apartado D4).

Table D3. Means, their standard errors (E.E.) and P-values of Na⁺ and K⁺ related traits of NILs 157-14 and 157-17 under control (14_C and 17_C) and high salinity conditions (14_S and 17_S). First group of traits corresponds to cation concentration (given in ppm – $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) in the stem (S), followed by the root (R), the leaf (L) and the difference between the aerial and root parts (S + L-R). The last group (highlighted in yellow) corresponds to important growth traits like fresh and dry weights (-FW and -DW) of plant (P), R and S tissues (given in grams). For traits showing significant NIL x Treatment interaction, means with the same letter are not significantly different. Taken from Asins *et al.* (2013).

Trait	P-NIL	P-Treat.	P-Interact.	14_C	E.E.	14_S	E.E.	17_C	E.E.	17_S	E.E.
K_S	0.00087	0.36702	0.76791	25419.67	1671.48	23143.41	1621.67	34164.84	2705.72	32990.52	529.45
Na_S	0.84404	0.00099	0.43768	39797.43	3240.22	51866.98	3617.09	38046.91	2916.32	54776.99	684.35
Na/K_S	0.00064	0.00025	0.56162	1.58	0.17	2.24	0.09	1.11	0.02	1.66	0.02
K_R	0.00128	0.56156	0.00677	4611.10a	507.38	2984.09ab	357.56	1353.37b	220.82	2514.20b	398.12
Na_R	0.95968	0.00341	0.03153	5360.87ab	730.91	6727.77ab	720.39	2949.13b	200.36	9044.71a	1486.53
Na/K_R	0.00001	0.00001	0.39981	1.15	0.04	2.27	0.09	2.25	0.21	3.59	0.11
K_L	0.00665	0.02990	0.05692	29559.96	1630.24	24277.60	789.50	31093.29	718.36	30644.16	964.55
Na_L	0.07004	0.00010	0.64183	43613.75	1062.20	68125.76	4260.46	38444.14	2957.13	59845.67	3660.16
Na/K_L	0.00139	0.00002	0.03331	1.49bc	0.10	2.80a	0.09	1.23c	0.07	1.96b	0.17
K_S+L-R	0.00004	0.04438	0.41466	50368.53	576.37	44436.92	1376.64	63904.76	3186.08	61120.47	1002.64
Na_S+L-R	0.24106	0.00012	0.74986	78050.31	3468.77	113264.97	5405.73	73541.91	5603.38	105577.95	4484.51
RFW	0.00004	0.00245	0.01564	8.97bc	1.02	7.09c	0.61	25.09a	2.03	14.30b	1.72
RDW	0.00004	0.00081	0.00176	2.73b	0.20	2.42b	0.37	9.24a	0.69	4.28b	0.60
PDW	0.00007	0.00043	0.00865	12.81b	1.01	10.67b	1.09	23.03a	0.99	14.46b	0.54

Las diferencias en la expresión de los alelos *HKT1;1* y *HKT1;2* podrían estar relacionadas con las diferencias obtenidas en las medias genotípicas de los QTLs relacionados con las concentraciones de Na^+ y K^+ encontrados en el cromosoma 7 de la población C de las RILs estudiadas en un trabajo previo, en el cual, las RILs con (un) alelo(s) de *cheesmaniae* débiles en las raíces se asociaban con una mayor concentración de Na^+ y menor de K^+ en tallos y hojas que las RILs con los alelos de *lycopersicum* (Villalta *et al.*, 2008). Al contrario de lo que se esperaba, sólo se han encontrado diferencias significativas entre las NILs en el caso del K^+ en hojas y en el caso de la relación Na^+/K^+ en condiciones salinas, pero no en el caso del Na^+ en hojas (Tabla D3) (Asins *et al.*, 2013). Esto indicaría que las NILs (al menos, en nuestros experimentos) no reproducen exactamente las diferencias alélicas observadas cuando se utilizó la población completa de RILs (Villalta *et al.*, 2008). Sin embargo, NIL17 acumuló una mayor concentración de Na^+ en la raíz (ver la comparación de medias de Na_R en la Tabla D3), siendo esta diferencia significativa. Esto explicaría la reducción en el peso seco de la planta y de la raíz de NIL17 (sensible a la salinidad), mientras que en el caso de NIL14 (tolerante a la salinidad) no se encontraron diferencias significativas en los parámetros RDW (peso seco de la raíz) y PDW (peso seco de la planta) cuando se comparaban ambos niveles de salinidad.

¿Cómo podrían las diferencias entre los alelos *HKT1* explicar las diferencias observadas en las concentraciones de K^+ y en las razones $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$ entre las NILs si los transportadores *HKT1* son específicos para el Na^+ ? El análisis de las secuencias indicó que las secuencias aminoacídicas de *HKT1;2* de ambas NILs fueron idénticas (Fig. R1). Sin embargo, la variante alélica de *HKT1;1* procedente de *cheesmaniae* (tolerante a la salinidad) en NIL14, ScHKT1;1, tenía una única sustitución en dicha secuencia (V222L, Val222Leu), en la región en hélice M_{1B} en comparación con la variante alélica de *HKT1;1* procedente de la especie cultivada (Fig. R1). Si bien, la versión alélica de SIHKT1;1 aparentemente tuvo una mayor afinidad para el transporte de Na^+ que la de ScHKT1;1 con ambos vectores de expresión en levaduras utilizados (Tabla R5), los datos obtenidos en relación a los parámetros cinéticos (sobre todo, la K_m) de las variantes alélicas SIHKT1;1/ScHKT1;1 fueron altamente variables (Tabla R5), lo que no permitió llevar a cabo un análisis estadístico fiable de sus diferentes propiedades cinéticas. En cualquier caso, dicha sustitución no afectaba a ninguna de las cuatro sustituciones que habían mostrado un incremento de la tolerancia a la salinidad en TaHKT1 (Rubio *et al.*, 1995), ni a los residuos adicionales conservados que resultaron ser necesarios para la selectividad del K^+ (Kato *et al.*, 2007), ni a otras mutaciones que afectaban a las propiedades funcionales de los transportadores *HKT* cuando se expresaban en sistemas heterólogos (Corratgé-Faillie *et al.*, 2010), ni a la sustitución V395L de una variedad de arroz que mostró ser responsable de la menor actividad transportadora de Na^+ o de la menor selectividad iónica de OsHKT1;5 (Cotsaftis *et al.*, 2012).

Las diferencias alélicas en la expresión de los transportadores *HKT1* de tomate podrían explicar el diferente comportamiento de las poblaciones de RILs y de NILs para las concentraciones de K^+ en hojas, anteriormente mencionado. Otros transportadores de

tipo HKT1, como AtHKT1;1, OsHKT1;5 y TmHKT1;5A, que tampoco intervienen en el transporte de K⁺ (Uozumi *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2005; Munns *et al.*, 2012) parecen mantener una elevada concentración de K⁺ y baja de Na⁺ en la parte aérea en condiciones salinas, retirando Na⁺ del xilema de la raíz (Rus *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2005; Sunarpi *et al.*, 2005; Byrt *et al.*, 2007). Además, la sobreexpresión de AtHKT1;1 en la estela de la raíz produjo no sólo una reducción de Na⁺ en la parte aérea, sino también una elevada concentración de K⁺ en esta parte de la planta en comparación con los controles en *Arabidopsis* y arroz (Møller *et al.*, 2009; Plett *et al.*, 2010). Todavía se desconocen los mecanismos por los cuales los transportadores de tipo HKT1 pueden afectar a la homeostasis del K⁺. Sin embargo, la evidencia fisiológica sugiere que podría ser por un efecto indirecto, ya que el Na⁺ compite con el K⁺ en los procesos de absorción, siendo cualquiera de los dos iones capaz de afectar al transporte y la asimilación del otro (Rus *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2005). Se ha sugerido que la absorción de Na⁺ por HKT1 podría despolarizar las células del parénquima del xilema, lo cual, a su vez, podría activar el mecanismo de canales de eflujo de K⁺, tales como KORC (*K⁺-outwardly rectifying channels*), produciendo la liberación de K⁺ en la savia xilemática (Sunarpi *et al.*, 2005). Por lo tanto, la mayor concentración de K⁺ encontrada en las raíces de NIL14 en condiciones de baja salinidad podría ser debida a una reducción indirecta de la carga de K⁺ en los vasos del xilema, como consecuencia de la presencia de un alelo *ScHKT1;2* débil en las raíces (ver la comparación de medias de K_R en la Tabla D3). Por otro lado, una elevada expresión de los alelos de *ScHKT1;2* en hojas debería causar indirectamente una reducción de la concentración de K⁺ y en consecuencia, una reducción en la razón K⁺/Na⁺.

Los datos de la Tabla D3 sugieren que la conexión entre las variantes alélicas de *HKT1;1* y *HKT1;2* de tomate y la tolerancia a la salinidad todavía no parece estar clara, ya que esto pareció depender fundamentalmente del criterio de tolerancia a la salinidad que tengamos en cuenta en los experimentos de fenotipado bajo condiciones salinas (ver resultados del experimento realizado en el IVIA con las NILs, Tabla D3) (Asins *et al.*, 2013). Así, si se asume que la supervivencia de las plantas al final del tratamiento salino es el criterio de tolerancia a la salinidad (Rus *et al.*, 2006), sólo una de las plantas de NIL17 estuvo próxima a la muerte, a pesar de tener un fruto (resultados procedentes del experimento del IVIA, Tabla D3) (Asins *et al.*, 2013). En cambio, si la tolerancia a la salinidad se define en términos de reducción del crecimiento, como sugieren otros autores (Qiu *et al.*, 2011), la NIL14 (homocigota para los alelos de la especie silvestre *S. cheesmaniae*), que mostraba una menor expresión de *ScHKT1;2* y una acumulación no significativa de Na⁺ en la raíz, sería considerada más tolerante a la salinidad que la NIL17, cuya considerable acumulación de Na⁺ en la raíz podría ser debida a la fuerte reducción del crecimiento de sus raíces en comparación con las de NIL14 (Tabla D3). No obstante, bajo condiciones salinas, NIL17 presenta valores superiores a NIL14 con respecto a casi todos los rasgos, independientemente de su mayor reducción en el crecimiento (Tabla D3). Los datos genéticos obtenidos por el grupo del IVIA sugieren que la naturaleza más vigorosa de la NIL17 podría ser debida a epistasis, ya que se han detectado dos interacciones epistáticas significativas ($P = 0.02$) en la población C de las RILs bajo

condiciones salinas entre *HKT1;1* y/o *HKT1;2* y dos genes marcadores de dos grupos de ligamiento segregantes en RIL 157: SSRW223_800 en C11a, relacionado con el peso fresco de la planta y SSR66_200 en C2a, relacionado con la sensibilidad al Na⁺ de la hoja (Asins *et al.*, 2013).

En resumen, los datos relacionados con la proximidad a la posición genética y física con el máximo LOD correspondiente, así como con el análisis de expresión génica, apoyan la hipótesis de que los genes *HKT1;1* y/o *HKT1;2* son los principales responsables de un grupo de QTLs mayoritarios, particularmente del *lkc7.1*, localizados en el cromosoma 7, implicados en la homeostasis de Na⁺ y K⁺ de la parte aérea de tomate.

D4. PAPEL DE *HKT1;1* Y *HKT1;2* EN EL CONTROL DEL QTL MAYORITARIO IMPLICADO EN LA HOMEOSTASIS DE Na⁺/K⁺ EN LA PARTE AÉREA DE TOMATE

Dada la estrecha proximidad genética y genómica entre *HKT1;1* y *HKT1;2* en tomate (6Kb, <http://solgenomics.net/>), fue necesaria una estrategia de genética inversa, basada en la pérdida de función del gen, para determinar qué transportador HKT1 desempeñaba el papel principal en la regulación de concentración de Na⁺/K⁺ de la parte aérea de tomate cultivado bajo condiciones salinas. De ahí que hayamos aplicado dicha estrategia a las dos NILs, que varían alélicamente en los loci *HKT1* de *S. lycopersicum* o *S. cheesmaniae*. Conceptualmente, silenciar un locus *HKT1* que condujera a una disminución en el nivel de halotolerancia en ambas NILs indicaría que dicho locus *HKT1* específico tendría un papel importante en el mecanismo de tolerancia a la sal en el tomate. Por lo tanto, se generaron diferentes líneas transgénicas derivadas de las NILs (NIL14 y NIL17), en las que se silenciaron establemente por RNA de interferencia (*RNAi*) cada gen de un alelo particular (de *S. lycopersicum* o *S. cheesmaniae*) en los loci *HKT1;1* o *HKT1;2*, evaluándose el fenotipo de tolerancia a la salinidad para cada uno de los distintos genotipos generados (6 en total, ver Tabla M7).

D4.1. LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *HKT1;1* JUEGA UN PAPEL SECUNDARIO EN LA HOMEOSTASIS DE Na⁺/K⁺ DE LA PARTE AÉREA DE TOMATE

En este estudio, el silenciamiento de las variantes alélicas *SlHKT1;1* y/o *ScHKT1;1* no alteró la razón Na⁺/K⁺, ni inhibió de manera significativa el crecimiento de plantas cultivadas en sistema hidropónico o en macetas bajo condiciones salinas (Figs. R23, R24 y R25). Por lo tanto, la isoforma *HKT1;1*, que se expresaba en el mismo tipo de células vasculares que *HKT1;2* (Fig. R33), parece jugar un papel secundario en el transporte de Na⁺ y en la homeostasis de Na⁺/K⁺ en la parte aérea de la planta. De hecho, la expresión de *HKT1;1* fue siempre mucho más baja que la de *HKT1;2*, independientemente de la NIL y del tejido en cuestión (Figs. R17 y R18) (Almeida *et al.*, 2014b).

El alelo *ScHKT1;1* tenía una única sustitución en su secuencia aminoacídica (V222L, Val222Leu) en la región en hélice M_{1B}, en comparación con el alelo *SlHKT1;1* (Fig. R1). Sin embargo, esta sustitución no coincidía con aquellas reportadas que influían en la tolerancia a la salinidad, la selectividad para el K⁺ u otras propiedades funcionales de los

transportadores HKT cuando se expresaban en sistemas heterólogos (Corratgé-Faillie *et al.*, 2010; Asins *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2016). Todavía no está claro si dicha sustitución proporciona diferentes propiedades cinéticas, que puedan ocasionar un efecto fisiológico en la homeostasis de Na⁺/K⁺. De hecho, se analizaron los parámetros cinéticos de las variantes alélicas *SlHKT1;1/ScHKT1;1* (y también los de *SlHKT1;2/ScHKT1;2*) en mutantes de levaduras defectivos para los sistemas endógenos de transporte de K⁺ ($\Delta trk1$ y $\Delta trk2$), siguiendo el procedimiento indicado en el Apartado M4.4.2. Sin embargo, los datos obtenidos en relación con dichos parámetros (especialmente, la K_m aparente) de las variantes alélicas *SlHKT1;1/ScHKT1;1* fueron altamente variables (ver Tabla R5), lo que no permitió llevar a cabo un análisis estadístico fiable de sus diferentes propiedades cinéticas. En otro estudio, tampoco se pudo registrar ningún tipo de actividad de transporte en oocitos que expresaban *HKT1;1* de *S. lycopersicum* o de *S. pennellii* (Almeida *et al.*, 2014a). Esto podría ser debido a una serie de dificultades anteriormente mencionadas que ocurren cuando las proteínas de *HKT1* se expresan en sistemas heterólogos, tales como una expresión deficiente, una localización errónea o a un problema de regulación (Garcia-deblás *et al.*, 2003; Haro *et al.*, 2005). Sin embargo, el patrón de expresión de *ScHKT1;1* en NIL14 difería notablemente del encontrado para *SlHKT1;1* en NIL17 (Figs. R16 y R21). Al igual que para *HKT1;2*, las diferencias encontradas en la frecuencia de elementos específicos regulados en *cis* en sus respectivas secuencias promotoras podrían ser responsables de dicha expresión diferencial (Fig. R11 y Tabla R3).

Además, los datos sobre los niveles de expresión de *HKT1;1* en hojas de NIL14 sugieren que *S. cheesmaniae* presenta un patrón de expresión muy similar al de *S. pimpinellifolium* con respecto a *HKT1;1*, ya que este gen se expresa en las hojas de ambas especies silvestres de tomate, pero no en las de *S. lycopersicum* (Fig. R18). Por lo tanto, podemos decir que la especie cultivada de tomate ha divergido de ambas especies silvestres en cuanto a la regulación de la expresión de *HKT1;1*. La reducción de la expresión de *HKT1;1* en hojas (y posiblemente en raíces) y la fijación de un alelo *HKT1;2* hiperactivo se ha llevado a cabo durante la domesticación del tomate. NIL14 y NIL17 diferían en los cambios de expresión que ocurrían entre control y tratamiento salino para *ScNHX4* en raíz y para *ScSOS1* en hojas, tallos y raíces (Fig. R26), no existiendo estas diferencias en las líneas silenciadas para *ScHKT1*. Si estos cambios regulatorios tuvieron lugar durante la domesticación del tomate, y si fueron o no responsables de la falta de adaptabilidad a las variaciones medioambientales con respecto a la salinidad y/o a las concentraciones de nutrientes, resulta difícil de evaluar, siendo necesaria una investigación más exhaustiva al respecto. Curiosamente, hubo un aumento significativo en el crecimiento de las plantas de NIL14 silenciadas para *ScHKT1;1* con respecto al genotipo no silenciado (Figs. R23 y R24), que hizo que las plantas *ScHKT1;1-RNAi* fueran tan grandes como las de NIL17 en ausencia de tratamiento, lo cual no suele ocurrir en el hábitat de crecimiento natural de *S. cheesmaniae*.

D4.2. LA HOMEOSTASIS DE Na⁺/K⁺ EN LA PARTE AÉREA DEL TOMATE SE REGULA PRINCIPALMENTE POR EL TRANSPORTADOR DE Na⁺ CODIFICADO POR EL GEN *HKT1;2*

Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan fuertes evidencias de que la homeostasis de Na⁺/K⁺ en hojas está regulada principalmente por el locus *HKT1;2*, independientemente del alelo estudiado (*S. cheesmaniae* o *S. lycopersicum*). El crecimiento de ambas NILs (NIL14 y NIL17) silenciadas para *HKT1;2* mostró una gran sensibilidad a la salinidad en comparación con sus respectivas plantas no silenciadas, especialmente en condiciones de transpiración (Figs. R23 y R24). Ambas líneas silenciadas mostraron igualmente niveles elevados de Na⁺ y niveles de K⁺ más bajos, lo cual incrementó las razones Na⁺/K⁺ (Fig. R25). La mayor sensibilidad de las plantas silenciadas para *ScHKT1;2* y *SlHKT1;2* al estrés por salinidad podría ser, por lo tanto, una consecuencia de la alteración de las razones Na⁺/K⁺ debida a la pérdida de función de *ScHKT1;2* y *SlHKT1;2*, respectivamente. Este fenotipo de hipersensibilidad a la salinidad fue muy similar al encontrado en los mutantes *hkt1;1* de *Arabidopsis*, los cuales se caracterizaron por una hiperacumulación de Na⁺ y una reducción de K⁺ en la parte aérea en condiciones de transpiración (Figs. R30 y R32A; Mäser *et al.*, 2002; Berthomieu *et al.*, 2003; Sunarpi *et al.*, 2005; Davenport *et al.*, 2007). Esto indicaba que *HKT1;2* de tomate juega un papel similar al de *AtHKT1;1*, especialmente en raíces, tal y como se había sugerido anteriormente (Apartado D3.2; Asins *et al.*, 2013). También se ha reportado que las concentraciones de Na⁺ de hojas y tallos estaban correlacionadas positivamente con la expresión de *HKT1;2* en las raíces de 23 accesiones de tomate (Almeida *et al.*, 2014b).

Los alelos de *S. cheesmaniae* (o de *S. pimpinellifolium*) del QTL *lkc7.1* permiten el almacenamiento de más Na⁺ y menos K⁺ en la parte aérea de la planta, mientras que los alelos de *S. lycopersicum* tienen el efecto contrario (Villalta *et al.*, 2008). Este rasgo podría ser explicado sobre la base de la función de *HKT1;2*, cuya expresión se localiza en las células asociadas al xilema y posiblemente también en las células asociadas al floema de hojas y raíces (Fig. R33), lo que implicaría la retirada de Na⁺ del xilema en raíces, tal y como ocurre con otros transportadores de tipo HKT1 de mono- y dicotiledóneas (Hauser y Horie, 2010; Su *et al.*, 2015). Aunque la cinética del transporte iónico de *SlHKT1;2* y *ScHKT1;2* no pudo ser determinada en levaduras, dada su idéntica secuencia nucleotídica (Fig. R1), se podría descartar la existencia de distintas velocidades de transporte en base a diferencias en la afinidad de estos transportadores para el Na⁺, tal y como se sugería en el caso de *HKT1;2* de *S. pennellii* (*SpHKT1;2*) y *SlHKT1;2* (Almeida *et al.*, 2014a). Por lo tanto, las diferencias en el contenido de Na⁺ (y en el contenido de K⁺) en hojas estarían principalmente influenciadas por la abundancia del transcrito de *HKT1;2*. De hecho, las diferencias encontradas en la frecuencia de los elementos reguladores en *cis*, específicas de sus respectivas secuencias promotoras, podrían explicar la menor expresión de *ScHKT1;2* en las raíces de NIL14 en comparación con *SlHKT1;2* de NIL17 (Fig. R12 y Tabla R4). En las raíces, la baja expresión de *ScHKT1;2* en NIL14 (controlada por el hipoalelo *HKT1;2*) implicaría una menor retirada de Na⁺ del xilema y, por consiguiente, un mayor transporte de Na⁺ a través de la corriente de transpiración hacia la parte aérea en comparación con el

alelo *SIHKT1;2* (hiperalelo *HKT1;2*), más expresado en NIL17. Al mismo tiempo, una elevada expresión de *ScHKT1;2* y, en cierta medida, de *ScHKT1;1* en las hojas de NIL14 (Fig. R22) podría aumentar la retirada de Na⁺ del xilema de las hojas, causando de esta forma su acumulación intracelular en las células del mesófilo de las hojas. No obstante, al igual que sucedía anteriormente en las NILs no silenciadas (Tabla D3) (Asins *et al.*, 2013), a pesar de la aparente tendencia hacia la mayor acumulación de Na⁺ en las hojas de NIL14, y en consecuencia, hacia una mayor relación Na⁺/K⁺ en NIL17, no hubo diferencias significativas en las concentraciones de Na⁺ y K⁺ en hojas cuando las plantas fueron sometidas a tratamiento salino en condiciones de transpiración (Fig. R26), probablemente debido a que los tiempos de tratamiento salino empleados fueron relativamente cortos.

Se piensa que el daño producido por la salinidad en las hojas es causado por una acumulación de sal en el citoplasma o en los compartimentos del apoplasto, que ocurre cuando la velocidad del Na⁺ exportado desde la raíz a las hojas excede a la del nivel de entrada de Na⁺ a través de la membrana plasmática de las células de la hoja, o bien cuando la capacidad de almacenamiento de Na⁺ en la vacuola se satura (Munns y Tester, 2008). En *Arabidopsis*, la hipersensibilidad al estrés salino en los mutantes *athkt1;1* (*sas2*) se debía a una acumulación excesiva de Na⁺ en la parte aérea, especialmente, cuando las plantas se cultivaban bajo condiciones de transpiración, y a una reducción de K⁺ en la parte aérea (Mäser *et al.*, 2002; Berthomieu *et al.*, 2003). Además, se ha visto que la pérdida de función de *AtHKT1;1* afectaba negativamente, aunque de manera indirecta, a la carga en las vacuolas (Davenport *et al.*, 2007). Por lo tanto, la hipersensibilidad a la salinidad de las hojas de las plantas silenciadas para *Sc/SIHKT1;2* podría ser debida a una combinación entre la pérdida de función en las raíces, el aumento de la velocidad de salida de Na⁺ desde las raíces hacia las hojas y a la pérdida de función de *HKT1;2* en las células de los haces vasculares de la hoja, evitando la entrada de Na⁺ a través de la membrana plasmática y en consecuencia, la compartimentación de este catión en las vacuolas. Esta explicación también fue propuesta para los mutantes de *Arabidopsis sas1* (Nublat *et al.*, 2001).

Curiosamente, la reducción del crecimiento de la parte aérea causada por la salinidad fue incluso mayor cuando se silenciaba el alelo hipoactivo *ScHKT1;2* en NIL14 que cuando se silencia el alelo hiperactivo *SIHKT1;2* en NIL17 (Figs. R23 y R24), si bien ambas líneas silenciadas mostraron un incremento similar en la concentración de Na⁺ y una disminución en la de K⁺ y, en consecuencia, un aumento similar en las razones Na⁺/K⁺ en hojas (Fig. R25). Este efecto puede ser, en parte, debido a una fuerte reducción de la expresión de *HKT1;2* en las raíces por efecto del silenciamiento de *ScHKT1;2*, así como a la usualmente elevada expresión de *HKT1;2* en las hojas de las plantas de NIL14 (Fig. R22), lo que podría disminuir la descarga de Na⁺ procedente del xilema en hojas. Además, también podría verse afectada la carga floemática y la redistribución de Na⁺ hacia las raíces. Ello podría causar la acumulación de Na⁺ en el apoplasto de las células

del mesófilo de las hojas, lo cual podría afectar negativamente a la acumulación intracelular de Na^+ en las vacuolas.

En tomate, tanto el antiportador endosomal de K^+ y Na^+/H^+ de clase II, *LeNHX2*, como el antiportador vacuolar Na^+/H^+ de clase I, *LeNHX4*, previenen la toxicidad del Na^+ a nivel celular, mediante el secuestro eficiente de este catión en los mencionados compartimentos subcelulares (Venema *et al.*, 2003b; Gálvez *et al.*, 2012; Huertas *et al.*, 2012, 2013). En teoría, no se esperaría que hubiera diferencias en la expresión de estos genes entre NIL17 y NIL14 debidas a diferencias genómicas, ya que ambas NILs comparten los mismos alelos en ambos loci (ver apartado R2.4.4.5). Sin embargo, podría haber diferencias en las actividades antiportadoras Na^+/H^+ endosomales y vacuolares, debido a las diferencias en la concentración de Na^+ en el citosol o a diferencias en los niveles de transcrito entre las NILs. En nuestro estudio, la expresión de *LeNHX2* en hojas fue significativamente mayor en las líneas silenciadas para *SlHKT1;2* que en las líneas silenciadas para *ScHKT1;2* bajo condiciones salinas, mientras que la expresión de *ScNHX4* en hojas se redujo más en las líneas silenciadas para *ScHKT1;2* que en las silenciadas para *SlHKT1;2* en respuesta al tratamiento salino (Fig. R26). Por lo tanto, la capacidad de detoxificación de Na^+ en hojas, basada en el secuestro de este catión en las vacuolas, podría haberse reducido en las líneas silenciadas para *ScHKT1;2* cuando la velocidad de entrada de Na^+ en las hojas es excesivamente alta, debido tanto a la expresión reducida de *ScHKT1;2* en raíces y hojas, como a la de *ScNHX4* en hojas. Cabe destacar que el nivel de transcripción de *ScNHX4* en la raíz de plantas silenciadas para *SlHKT1;2* aumentó significativamente en comparación con el de la NIL17 no silenciada bajo condiciones salinas, mientras que los niveles de transcripción de *ScNHX4* en las raíces de las plantas silenciadas para *ScHKT1;2* no presentaron diferencias significativas con los de las plantas no silenciadas de NIL14 en estas mismas condiciones (Fig. R26).

Otra posible explicación para la mayor hipersensibilidad a la salinidad de las líneas silenciadas para *ScHKT1;2* en comparación con las líneas silenciadas para *SlHKT1;2* podría ser debida a la elevada expresión que suele tener *HKT1;1* en las hojas de las líneas silenciadas para *ScHKT1;2* (Fig. R21). Esto podría aumentar la descarga de Na^+ del xilema en las hojas, permitiendo así que su acumulación alcanzase niveles tóxicos en el citosol de las células del mesófilo de las hojas. Es importante tener en cuenta que la capacidad de detoxificación de Na^+ en hojas y la tolerancia a la salinidad (basada en el secuestro de este catión en las vacuolas de las hojas) podrían reducirse debido a la baja expresión de *ScNHX4* en las plantas silenciadas para *ScHKT1;2*.

Aparte de los transportadores de tipo *HKT1*, el antiportador Na^+/H^+ de la membrana plasmática, *SISOS1*, también está implicado en el transporte de Na^+ a larga distancia en tomate (Olías *et al.*, 2009a). Se ha sugerido que para el transporte de Na^+ a larga distancia, la función transportadora de *SISOS1* en la carga xilemática de Na^+ en las raíces estaría coordinada con la de los transportadores *HKT1* en la descarga xilemática en hojas (Pardo *et al.*, 2006; Belver *et al.*, 2012). En consecuencia, una perturbación en cualquiera de los dos sistemas podría alterar el transporte de Na^+ a larga distancia y la

correcta compartimentación del Na⁺, resultando en un fenotipo sensible a la salinidad. Por lo tanto, SOS1 también podría estar implicado, de manera directa o indirecta, en la alteración de la razón Na⁺/K⁺ en las hojas de las plantas silenciadas para *HKT1;2*.

En la época pregenómica del tomate, *SISOS1* se mapeó en el cromosoma 1 (Villalta *et al.*, 2008) y, como ya se había mencionado previamente, las NILs 14 y 17 tienen los mismos alelos de *S. cheesmaniae* (Asins *et al.*, 2013). Por tanto, como ocurría con los transportadores NHX, no deben esperarse diferencias en la expresión del gen *SOS1* entre NIL17 y NIL14 debidas a diferencias genómicas. Recientemente, se ha reportado que los loci *Nax*, tales como *Nax1*, funcionalmente soportado por TmHKT1;4-A2 (Huang *et al.*, 2006b), y *Nax2*, soportado por TmHKT1;5-A (Byrt *et al.*, 2007), regulan negativamente la actividad y los niveles de expresión de los antiportadores Na⁺/H⁺ de tipo SOS1 en los tejidos del xilema de trigo (Zhu *et al.*, 2015). Estos autores sugieren que los loci *Nax* confieren dos mecanismos altamente complementarios, los cuales contribuyen a reducir el contenido de Na⁺ del xilema. Uno de ellos es el incremento de la retirada de Na⁺ de vuelta a la estela de la raíz a través de *HKT1;4* o *HKT1;5*, mientras que el otro es la reducción de la velocidad de carga de Na⁺ en el xilema a través de *SOS1*. Sin embargo, en nuestro estudio, la expresión de *ScSOS1* sólo disminuyó en la raíz de NIL14, aumentando al mismo tiempo en la parte aérea (hojas y tallos) en respuesta al tratamiento salino, pero no se vio afectada en el tallo ni en la raíz de NIL17. De acuerdo con la hipótesis mencionada en Zhu *et al.* (2015), es posible que el alelo hipoactivo *ScHKT1;2* de las raíces de NIL14 permita el almacenamiento de más Na⁺ y menos K⁺ en la parte aérea de la planta, logrando así un rápido ajuste osmótico, mientras que se mantiene un crecimiento normal.

Una vez que se logra el ajuste osmótico, sería ventajoso para las plantas de NIL14 evitar la excesiva acumulación de Na⁺ en los tejidos foliares (fotosintéticamente activos) mediante la reducción de la tasa de carga de Na⁺ en el xilema por *ScSOS1* hasta un mínimo absoluto, necesario para mantener el turgor de los tejidos en crecimiento. Por otro lado, en la parte aérea de NIL14 tratada con sal, el aumento en la expresión de *ScSOS1*, podría mediar el flujo de Na⁺ a través de la membrana plasmática de las células del mesófilo hacia el xilema, principalmente en hojas jóvenes, para prevenir la toxicidad de Na⁺ en células menos vacuoladas, desprovistas de un eficiente mecanismo de compartimentación iónica (Olías *et al.*, 2009a, b). Tales cambios en la expresión de *ScSOS1* están suprimidos en la línea *ScHKT1;2-RNAi* (Fig. R26), indicando algún tipo de relación funcional entre los dos tipos de transportadores de tomate. En este estudio, hemos conseguido evidencias de esta relación funcional, mediante el uso de plantas de tomate silenciadas para *SISOS1* (*S. lycopersicum* cv. Moneymaker), las cuales se habían caracterizado funcionalmente por mostrar un fenotipo hipersensible a la salinidad, un gradiente de distribución de Na⁺ desde la raíz a la hoja y una reducida capacidad para acumular Na⁺ en tallos (Olías *et al.*, 2009a, b). Así, estas plantas silenciadas para *SISOS1* también mostraron un gran aumento en los niveles de expresión de *SIHKT1;1* en todos sus tejidos, especialmente bajo condiciones salinas, al igual que una reducción en los niveles de transcrito de *SIHKT1;2* tras tres días de tratamiento salino (Fig. R34).

Es conveniente mencionar que bajo condiciones de no transpiración (en placas de Petri), el crecimiento de todas las plantas (tanto de las líneas silenciadas como de las no silenciadas) se vio afectado de igual forma por la salinidad (Fig. R22), mostrando un aumento similar en la concentración de Na^+ de las hojas y una disminución similar de los contenidos de K^+ en hoja (Fig. R25). Se obtuvieron resultados similares en mutantes *hkt1;1* de *Arabidopsis* que se cultivaron también en placas de Petri y en condiciones exentas de transpiración (Fig. R32). Esto podría ser debido a que, en ausencia de transpiración, el mecanismo de tolerancia a la salinidad de las plántulas de tomate probablemente dependa de la extrusión de Na^+ al medio externo de la raíz y/o de la acumulación de Na^+ en las vacuolas de la raíz y no del transporte de Na^+ a larga distancia y/o de la descarga de Na^+ del xilema mediante el sistema HKT1 (Shi *et al.*, 2002; Berthomieu *et al.*, 2003; Huertas *et al.*, 2012).

D5. PERSPECTIVAS Y OBSERVACIONES FINALES

Los resultados obtenidos proporcionan fundamentos básicos para futuras investigaciones sobre la mejora de la tolerancia a la sal en el tomate y otros cultivos hortícolas. Un importante aspecto derivado de este estudio es la existencia de una expresión diferencial de las variantes alélicas *Sl/ScHKT1;1-Sl/ScHKT1;2* en la raíz y en la parte aérea de NIL17 y NIL14. Es decir, la expresión de *ScHKT1;2* es mucho menor en raíz y mayor en la hoja, al contrario que la de *SlHKT1;2*, mientras que la expresión de *ScHKT1;1* es mayor tanto en hojas como en raíz que la de *SlHKT1;1*. Todo ello sugiere, entre otros, un importante aspecto básico a investigar: en qué tejido causa un mayor impacto la pérdida de función de cada variante alélica específica en la tolerancia de las plantas a la salinidad. Es decir, la contribución relativa de cada una de las variantes en la retirada de Na^+ de la corriente xilemática, a nivel de raíz, con respecto a la de la parte aérea en cada NIL, y eventualmente, su papel en la recarga floemática y, por tanto, su influencia en el contenido de los tejidos sumidero, como las hojas en desarrollo, frutos y su recirculación hacia la raíz.

Para ello, una propuesta a corto y medio plazo derivada de este estudio, es el ensayo de combinaciones recíprocas de patrón-injerto en relación al efecto del silenciamiento de los loci *HKT1;1* y *HKT1;2*, tanto simple como doble. Estas últimas líneas doblemente silenciadas se acaban de generar por hibridación de las líneas silenciadas simples, para las dos isoformas para cada alelo *lycopersicum* y *cheesmaniae* (en colaboración con grupo de Genética del IVIA). Esta información puede ser además relevante desde el punto de vista aplicado por la posibilidad de obtener con líneas silenciadas, prototipos hasta ahora nunca probados de portainjertos que podrían exhibir un fenotipo beneficioso bajo condiciones normales o salinas, útiles para la producción comercial de tomate.

VII. CONCLUSIONES

1. El análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas, los ensayos de transporte mediante expresión heteróloga en levaduras y los experimentos de localización mediante RT-PCR *in situ* han demostrado que los genes *HKT1;1* y *HKT1;2* aislados de tomate, son transportadores selectivos para el Na⁺, pertenecientes a la subfamilia 1 de transportadores HKT de plantas superiores. Dada su expresión en el sistema vascular de la raíz y parte aérea, incluyendo las células del xilema y quizás las del floema, así como su similaridad funcional a otros transportadores de Na⁺ ya caracterizados de esta subfamilia, podemos decir que *SlHKT1;1* y/o *SlHKT1;2* participan en la descarga/retirada de Na⁺ del xilema de la raíz y la parte aérea (y posiblemente en la carga floematica).
2. Los datos genéticos relacionados con la proximidad a la posición genética y física con el máximo LOD correspondiente, así como el análisis de expresión génica, apoyan la hipótesis de que los genes *HKT1;1* y/o *HKT1;2* son los principales responsables de un grupo de QTLs mayoritarios, particularmente del *lkc7.1*, localizados en el cromosoma 7, implicados en la homeostasis de Na⁺ y K⁺ de la parte aérea de tomate. En condiciones salinas, dicho QTL *lkc7.1* viene determinado por los alelos *HKT1* introgresados de *S. cheesmaniae*, que permiten el almacenamiento de más Na⁺ y menos K⁺ en la parte aérea de la planta de NIL14, mientras que los alelos *HKT1* de *S. lycopersicum* tienen el efecto contrario en la NIL17. Esto concuerda con el hecho de que la expresión de *SchKT1;2* en NIL14 fue mucho menor en raíz y mayor en la hoja, contrariamente a la de *SlHKT1;2* en NIL17, mientras que la de *SchKT1;1* fue mayor tanto en hoja como en raíz de NIL14 que la de *SlHKT1;1* en NIL17. Dado que los niveles de transcritos de *HKT1;2* fueron siempre mucho más altos que los de *HKT1;1* en todas las líneas y tejidos analizados, puede concluirse que dicho QTL es controlado esencialmente por un alelo *cheesmaniae* hipoactivo de *HKT1;2*, así como por un alelo hiperactivo *lycopersicum* de *HKT1;2* en la raíz.
3. Los estudios de genética reversa mediante RNA de interferencia han revelado el importante papel que *HKT1;2* juega la homeostasis de Na⁺ (y K⁺) y en la tolerancia a la salinidad del tomate. Así, el silenciamiento de *HKT1;2* alteró la razón Na⁺/K⁺ y aumentó la sensibilidad a la salinidad, a diferencia del silenciamiento de *HKT1;1*, que no afectó de manera significativa a estos parámetros. Esto confirma que el gen *HKT1;2* es responsable del principal QTL implicado en la homeostasis de Na⁺ y K⁺ en tomate. Además, el mayor efecto del silenciamiento del alelo de *cheesmaniae* de *HKT1;2* (hipoactivo), en comparación con el alelo de *lycopersicum* (hiperactivo) en el crecimiento de las NILs de tomate en condiciones salinas sugiere un papel más relevante del alelo silvestre de *HKT1;2* en la tolerancia a la salinidad.
4. La acción de este transportador *HKT1;2*, probablemente coordinada junto a la de otros transportadores de Na⁺, tales como SOS1 (que ejerce la función opuesta) y

NHX4, es requerida para regular las concentraciones internas de Na^+ en varios tejidos, e indirectamente las de K^+ , mediante procesos como la absorción/extrusión a través de la membrana plasmática, la compartimentación en las vacuolas de las células y la redistribución de iones a través de los órganos de la planta.

5. La isoforma *HKT1;1*, que se expresa en el mismo tipo de células vasculares que *HKT1;2*, parece jugar un papel secundario en el transporte de Na^+ y en la homeostasis de Na^+/K^+ en la parte aérea de la planta. Asimismo, el hecho de que *HKT1;1* se exprese mayormente en las hojas de las especies silvestres de tomate como *S. cheesmaniae* y *S. pimpinellifolium*, pero no en las de *S. lycopersicum*, sugiere que las especies cultivadas de tomate han divergido de ambas especies silvestres con respecto a la regulación de la expresión de *HKT1;1*. Ello apoya fuertemente la idea de que, durante el proceso de domesticación del tomate, se ha producido una reducción de la expresión de *HKT1;1* en hojas (y posiblemente en raíces) y la fijación de un alelo *HKT1;2* hiperactivo en las raíces.

VII. CONCLUSIONS

1. Phylogenetic analysis of aminoacid sequences, transport assays by heterologous expression in yeast and localization experiments by *in situ* RT-PCR have shown that *HKT1;1* and *HKT1;2* tomato genes are Na⁺-selective transporters belonging to HKT transporter subfamily 1 of higher plants. Given their expression in the vascular system of the root and aerial part, including xylem cells and perhaps phloem cells, as well as their functional similarity to other Na⁺ transporters already characterized from subfamily 1, *SIHKT1;1* and *SIHKT1;2* are involved in unloading Na⁺ from the xylem of the root and aerial part and possibly in phloem loading.
2. The genetic data related to the proximity to the genetic and physical position with the corresponding maximum LOD, as well as gene expression analysis support the hypothesis that the genes *HKT1;1* and *HKT1;2* are mainly responsible for a cluster of major QTLs, particularly *lkc7.1*, located in chromosome 7, involved in Na⁺ and K⁺ homeostasis in the aerial part of the tomato. The QTL *lkc7.1*, under salinity conditions, is determined by the introgressed *S. cheesmaniae* HKT1 alleles, which allow the storage of more Na⁺ and less K⁺ in the aerial part of NIL14 plants, while *S. lycopersicum* HKT1 alleles have the opposite effect. This is closely in line with the much lower *SchKT1;2* expression in roots and higher in leaves from NIL14, unlike *SIHKT1;2* expression in NIL17, while *SchKT1;1* expression is higher in both leaf and root from NIL14 than that of *SIHKT1;1* in NIL17. Given that *HKT1;2* transcript levels are always much higher than those of *HKT1;1* in all the lines and tissues analyzed, we concluded that QTL *lkc7.1* is mainly determined at the root by a hypoactive HKT1 *cheesmaniae* allele in NIL14 as well as a hyperactive *HKT1;2* *lycopersicum* allele in NIL17.
3. Reverse genetic studies by interference RNA have revealed the important role played by *HKT1* in Na⁺/K⁺ homeostasis and tomato salt tolerance. Thus, the silencing of *HKT1;2* altered the Na⁺/K⁺ ratio and increased sensitivity to salinity, unlike the silencing of *HKT1;1*, which did not significantly affect these parameters. This confirms that the *HKT1;2* gene is responsible for the main QTL involved in Na⁺/K⁺ homeostasis in tomato. In addition, the stronger silencing effect of the *HKT1;2* (hypoactive) *cheesmaniae* allele on the growth of tomato NILs under saline conditions as compared to the *lycopersicum* allele (hyperactive) suggests that the *HKT1;2* wild allele plays a more important role in salinity tolerance.
4. *HKT1;2* transporter activity is probably coordinated with other Na⁺ transporter activities, such as SOS1 in plasma membrane, which has an opposite effect, and NHX4 in tonoplast membrane. These coordinated activities are required to regulate the internal concentrations of Na⁺ in various tissues, and indirectly those of K⁺, through processes such as uptake/extrusion through the plasma membrane, compartmentalization in cellular vacuoles and of ion redistribution through the plant organs.

5. The isoform *HKT1;1*, expressed in the same type of vascular cells as *HKT1;2*, appears to play a secondary role in Na⁺ transport and Na⁺/K⁺ homeostasis in the aerial part of the plant. Likewise, given that *HKT1;1* is mostly expressed in the leaves of wild tomato species, such as *S. cheesmaniae* and *S. pimpinellifolium*, but not in those of *S. lycopersicum*, suggests that cultivated tomato species have diverged from both wild species with respect to the regulation of *HKT1;1* expression. This strongly supports the notion that there has been a reduction in *HKT1;1* expression in leaves, and possibly roots, and a establishment of a hyperactive *HKT1;2* allele in tomato roots during the tomato domestication process.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAPHY

- Abbas A, Khan S, Hussain N, Hanjra MA, Akbar S. (2013). Characterizing soil salinity in irrigated agriculture using a remote sensing approach. *Phys Chem Earth* **55-57**: 43-52.
- Abogadallah GM. (2010). Antioxidative defense under salt stress. *Plant Signal Behav* **5**: 369-374.
- Acquaah G. (2009). Horticulture : principles and practices. Pearson Prentice Hall.
- Adams E, Shin R. (2014). Transport, signaling, and homeostasis of potassium and sodium in plants: K⁺ and Na⁺ transport and signaling. *J Integr Plant Biol* **56**: 231-249.
- Aguilar M, Fernández-Ramírez JL, Aguilar-Blanes M, Ortiz-Romero C. (2017). Rice sensitivity to saline irrigation in Southern Spain. *Agric Water Manag* **188**: 21-28.
- Al-Doss A, Smith S, Busch R, McVey D, Linkert G, Wiersma J, *et al* . (1998). Registration of AZ-97MEC and AZ-97MEC-ST very nondormant alfalfa germplasm pools with increased shoot weight and differential response to saline irrigation. *Crop Sci* **38**: 568.
- Albaladejo I, Plasencia FA, Meco V, Egea MI, Bolarin MC, Flores FB. (2015). Different strategies used by domesticated tomato and wild-related species to confront salt stress. *Procedia Environ Sci* **29**: 91-92.
- Alcázar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, *et al* . (2010). Polyamines: Molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* **231**: 1237-1249.
- Alexandersson E, Saalbach G, Larsson C, Kjellbom P. (2004). *Arabidopsis* plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking. *Plant Cell Physiol* **45**: 1543-1556.
- Ali A, Raddatz N, Aman R, Kim S, Park HC, Jan M, *et al* . (2016). A single amino-acid substitution in the sodium transporter HKT1 associated with plant salt tolerance. *Plant Physiol* **171**: 2112-2126.
- Ali Z, Park HC, Ali A, Oh D-H, Aman R, Kropornicka A, *et al* . (2012). TsHKT1;2, a HKT1 homolog from the extremophile *Arabidopsis* relative *Thellungiella salsuginea*, shows K⁺ specificity in the presence of NaCl. *Plant Physiol* **158**: 1463-1474.
- Almeida DM, Margarida Oliveira M, Saibo NJM. (2017). Regulation of Na⁺ and K⁺ homeostasis in plants: Towards improved salt stress tolerance in crop plants. *Genet Mol Biol* **40**: 326-345.
- Almeida P, de Boer G-J, de Boer AH. (2014a). Differences in shoot Na⁺ accumulation between two tomato species are due to differences in ion affinity of HKT1;2. *J Plant Physiol* **171**: 438-447.
- Almeida P, Feron R, de Boer G-J, de Boer AH. (2014b). Role of Na⁺, K⁺, Cl⁻, proline and sucrose concentrations in determining salinity tolerance and their correlation with the expression of multiple genes in tomato. *AoB Plants* **6**: plu039.
- Almeida PMF, de Boer G-J, de Boer AH. (2014c). Assessment of natural variation in the first pore domain of the tomato HKT1;2 transporter and characterization of mutated versions of *SlHKT1;2* expressed in *Xenopus laevis* oocytes and via complementation of the salt sensitive *athkt1;1* mutant. *Front Plant Sci* **5**: 1-10.
- Almeida P, Katschnig D, de Boer AH. (2013). HKT transporters--state of the art. *Int J Mol Sci* **14**: 20359-20385.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, *et al* . (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-402.

- Amtmann A. (2009). Learning from evolution: Thellungiella generates new knowledge on essential and critical components of abiotic stress tolerance in plants. *Mol Plant* **2**: 3-12.
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* **285**: 1256-8.
- Apse MP, Blumwald E. (2007). Na⁺ transport in plants. *FEBS Lett* **581**: 2247-2254.
- Apse MP, Sottosanto JB, Blumwald E. (2003). Vacuolar cation/H⁺ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the *Arabidopsis* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter. *Plant J* **36**: 229-39.
- Aranda-Sicilia MN, Aboukila A, Armbruster U, Cagnac O, Schumann T, Kunz H-H, *et al* . (2016). Envelope K⁺/H⁺ Antiporters AtKEA1 and AtKEA2 Function in Plastid Development. *Plant Physiol* **172**: 441-449.
- Aranda-Sicilia MN, Cagnac O, Chanroj S, Sze H, Rodríguez-Rosales MP, Venema K. (2012). *Arabidopsis* KEA2, a homolog of bacterial KefC, encodes a K⁺/H⁺ antiporter with a chloroplast transit peptide. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1818**: 2362-2371.
- Arango M, Gévaudant F, Oufattole M, Boutry M. (2003). The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies. *Planta* **216**: 355-65.
- Ariño J, Aydar E, Drulhe S, Ganser D, Jorrín J, Kahm M, *et al* . (2014). Systems biology of monovalent cation homeostasis in yeast: The translucent contribution. In: *Advances in Microbial Physiology*. pp. 1-63.
- Ashraf M. (2009). Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnol Adv* **27**: 84-93.
- Ashraf M. (1994). Breeding for salinity tolerance in plants. *CRC Crit Rev Plant Sci* **13**: 17-42.
- Ashraf M, Akram NA. (2009). Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: An analytical comparison. *Biotechnol Adv* **27**: 744-752.
- Ashraf M, Ozturk M, Athar HR (2009) Salinity and water stress. improving crop efficiency. Springer-Verlag, Berlin.
- Ashraf M, Foolad MR. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot* **59**: 206-216.
- Ashraf M, O'leary JW. (1996). Responses of some newly developed salt-tolerant genotypes of spring wheat to salt stress. Yield components and ion distribution. *J Agron Crop Sci* **176**: 91-101.
- Asins MJ. (2002). Review Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant Breed* **121**: 281-291.
- Asins MJ, Bolarín MC, Pérez-Alfocea F, Estañ MT, Martínez-Andújar C, Albacete A, *et al* . (2010). Genetic analysis of physiological components of salt tolerance conferred by *Solanum* rootstocks. What is the rootstock doing for the scion? *Theor Appl Genet* **121**: 105-115.
- Asins MJ, Raga V, Roca D, Belver A, Carbonell EA. (2015). Genetic dissection of tomato rootstock effects on scion traits under moderate salinity. *Theor Appl Genet* **128**: 667-679.
- Asins MJ, Villalta I, Aly MM, Olías R, Álvarez de Morales P, Huertas R, *et al* . (2013). Two closely linked tomato HKT coding genes are positional candidates for the major tomato QTL involved in Na⁺ /K⁺ homeostasis. *Plant Cell Environ* **36**: 1171-1191.

- Assaha DVM, Ueda A, Saneoka H, Al-Yahyai R, Yaish MW. (2017). The role of Na⁺ and K⁺ transporters in salt stress adaptation in glycophytes. *Front Physiol* **8**. e-pub ahead of print, doi: 10.3389/fphys.2017.00509.
- Athman A, Tanz SK, Conn VM, Jordans C, Mayo GM, Ng WW, *et al* . (2014). Protocol: a fast and simple in situ PCR method for localising gene expression in plant tissue. *Plant Methods* **10**: 1-20.
- Axelsen KB. (2001). Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **126**: 696-706.
- Bai Y, Lindhout P. (2007). Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future? *Ann Bot* **100**: 1085-1094.
- Ballesteros E, Blumwald E, Donaire JP, Belver A. (1997). Na⁺/H⁺ antiport activity in tonoplast vesicles isolated from sunflower roots induced by NaCl stress. *Physiol Plant* **99**: 328-334.
- Ballesteros E, Donaire JP, Belver A. (1996). Effects of salt stress on H⁺-ATPase and H⁺-PPase activities of tonoplast-enriched vesicles isolated from sunflower roots. 259-268.
- Bañuelos MA, Haro R, Fraile-Escanciano A, Rodríguez-Navarro A. (2008). Effects of polylinker uATGs on the function of grass HKT1 transporters expressed in yeast cells. *Plant Cell Physiol* **49**: 1128-1132.
- Barrero-Gil J, Rodríguez-Navarro A, Benito B. (2007). Cloning of the PpNHAD1 transporter of *Physcomitrella patens*, a chloroplast transporter highly conserved in photosynthetic eukaryotic organisms. *J Exp Bot* **58**: 2839-2849.
- Bassil E, Blumwald E. (2014). The ins and outs of intracellular ion homeostasis: NHX-type cation/H⁺ transporters. *Curr Opin Plant Biol* **22**: 1-6.
- Bassil E, Coku A, Blumwald E. (2012). Cellular ion homeostasis: emerging roles of intracellular NHX Na⁺/K⁺ antiporters in plant growth and development. *J Exp Bot* **63**: 5727-5740.
- Batelli G, Verslues PE, Agius F, Qiu Q, Fujii H, Pan S, *et al* . (2007). SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H⁺-ATPase and upregulating its transport activity. *Mol Cell Biol* **27**: 7781-7790.
- Baulcombe D. (2005). RNA silencing. *Trends Biochem Sci* **30**: 290-293
- Baxter I, Brazelton JN, Yu D, Huang YS, Lahner B, Yakubova E, *et al* . (2010). A coastal cline in sodium accumulation in *Arabidopsis thaliana* is driven by natural variation of the sodium transporter AtHKT1;1. *PLoS Genet* **6**. e-1001193.
- Bedinger PA, Chetelat RT, McClure B, Moyle LC, Rose JKC, Stack SM, *et al* . (2011). Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: Opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. *Sex Plant Reprod* **24**: 171-187.
- Belver A, Olías R, Huertas R, Rodríguez-Rosales MP. (2012). Involvement of SISOS2 in tomato salt tolerance. *Bioengineered* **3**: 298-302.
- Benito B, Garciadeblás B, Fraile-Escanciano A, Rodríguez-Navarro A. (2011). Potassium and sodium uptake systems in fungi. The transporter diversity of *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet Biol* **48**: 812-822.
- Benito B, Haro R, Amtmann A, Cuin TA, Dreyer I. (2014). The twins K⁺ and Na⁺ in plants. *J Plant Physiol* **171**: 723-731.
- Bergougnoux V. (2014). The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnol Adv* **32**: 170-189.

- Berthomieu P, Conéjéro G, Nublat A, Brackenbury WJ, Lambert C, Savio C, *et al* . (2003). Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J* **22**: 2004-2014.
- Beyenbach KW, Wieczorek H. (2006). The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Biol* **209**: 577-589.
- Bhandal IS, Malik CP. (1988). Potassium estimation, uptake, and its role in the physiology and metabolism of flowering plants. *Int Rev Cytol* **110**: 205-254.
- Bhattacharya RC, Maheswari M, Dineshkumar V, Kirti PB, Bhat SR, Chopra VL. (2004). Transformation of *Brassica oleracea* var. capitata with bacterial *betA* gene enhances tolerance to salt stress. *Sci Hortic (Amsterdam)* **100**: 215-227.
- Blom-Zandstra M, Vogelzang SA, Veen BW. (1998). Sodium fluxes in sweet pepper exposed to varying sodium concentrations. *J Exp Bot* **49**: 1863-1868.
- Blumwald E, Aharon GS, Apse MP. (2000). Sodium transport in plant cells. *Biochim Biophys Acta* **1465**: 140-151.
- de Boer AH. (1999). Potassium translocation into the root xylem. *Plant Biol* **1**: 36-45.
- Bohnert HJ, Gong Q, Li P, Ma S. (2006). Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms - Getting genomics going. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 180-188.
- Bohnert HJ, Jensen RG. (1996). Metabolic engineering for increased salt tolerance--the next step. *Aust J Plant Physiol* **23**: 661-667.
- Bolarín MC, Fernández FG, Cruz V, Cuartero J. (1991). Salinity tolerance in four wild tomato species using vegetative yield-salinity response curves. *J Am Soc Hortic Sci* **116**: 286-290.
- Bonales-Alatorre E, Shabala S, Chen Z-H, Pottosin I. (2013). Reduced tonoplast fast-activating and slow-activating channel activity is essential for conferring salinity tolerance in a facultative halophyte, quinoa. *PLANT Physiol* **162**: 940-952.
- Bonnema G, Hontelez J, Verkerk R, Zhang YQ, Van Daelen R, Van Kammen A, *et al* . (1996). An improved method of partially digesting plant megabase DNA suitable for YAC cloning: Application to the construction of a 5.5 genome equivalent YAC library of tomato. *Plant J* **9**: 125-133.
- Bresler E, Hoffman GJ. (1986). Irrigation management for soil salinity control: Theories and Tests. *Soil Sci Soc Am J* **50**: 1552-1559.
- Brini F, Hanin M, Mezghani I, Berkowitz GA, Masmoudi K. (2007). Overexpression of wheat Na⁺/H⁺ antiporter TNH1 and H⁺-pyrophosphatase TVP1 improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. *J Exp Bot* **58**: 301-308.
- Brunelli JP, Pall ML. (1993). A series of yeast shuttle vectors for expression of cDNAs and other DNA sequences. *Yeast* **9**: 1299-1308.
- Budiman MA, Mao L, Wood TC, Wing RA. (2000). A deep-coverage tomato BAC library and prospects toward development of an STC framework for genome sequencing. *Genome Res* **10**: 129-136.
- Buller O, Manges HL, Stone LR, Williams JR. (1991). Modeled crop water use and soil water drainage. *Agric Water Manag* **19**: 117-134.
- Byrt CS, Platten JD, Spielmeier W, James RA, Lagudah ES, Dennis ES, *et al* . (2007). HKT1;5-Like Cation Transporters linked to Na⁺ exclusion loci in wheat, *Nax2* and *Kna1*. *PLANT Physiol* **143**: 1918-1928.
- Byrt CS, Xu B, Krishnan M, Lightfoot DJ, Athman A, Jacobs AK, *et al* . (2014). The Na⁺

- transporter, TaHKT1;5-D, limits shoot Na⁺ accumulation in bread wheat. *Plant J* **80**: 516-526.
- Byrt CS, Zhao M, Kourghi M, Bose J, Henderson SW, Qiu J, *et al* . (2017). Non-selective cation channel activity of aquaporin AtPIP2;1 regulated by Ca²⁺ and pH. *Plant Cell Environ* **40**: 802-815.
- Callaghan M V., Head FA, Cey EE, Bentley LR. (2017). Salt leaching in fine-grained, macroporous soil: Negative effects of excessive matrix saturation. *Agric Water Manag* **181**: 73-84.
- Cano EA, Pérez-Alfocea F, Moreno V, Bolarin MC. (1996). Responses to NaCl stress of cultivated and wild tomato species and their hybrids in callus cultures. *Plant Cell Rep* **15**: 791-794.
- Cao Y, Jin X, Huang H, Derebe MG, Levin EJ, Kabaleeswaran V, *et al* . (2011). Crystal structure of a potassium ion transporter, TrkH. *Nature* **471**: 336-341.
- Cao Y, Pan Y, Huang H, Jin X, Levin EJ, Kloss B, *et al* . (2013). Gating of the TrkH ion channel by its associated RCK protein TrkA. *Nature* **496**: 317-322.
- Capell T, Bassie L, Christou P. (2004). Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proc Natl Acad Sci* **101**: 9909-9914.
- Caro M. (1966). Suelos salinos y procesos de salinización en el Sureste español. Tesis Doctoral Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura.
- Cellier F, Conéjéro G, Ricaud L, Doan TL, Lepetit M, Gosti F, *et al* . (2004). Characterization of AtCHX17, a member of the cation/H⁺ exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in K⁺ homeostasis. *Plant J* **39**: 834-846.
- Cerón-Rojas JJ, Sahagún-Castellanos J. (2007). Estimating QTL biometrics parameters in F2 populations: a new approach. *Agrociencia* **41**: 57-73.
- Chamarro J. (1995). Anatomía y fisiología de la planta. In: *El cultivo del tomate*. pp. 43-91.
- Chanroj S, Wang G, Venema K, Zhang MW, Delwiche CF, Sze H. (2012). Conserved and diversified gene families of monovalent cation/H⁺ antiporters from algae to flowering plants. *Front Plant Sci* **3**: 1-18.
- Chaumont F, Tyerman SD. (2014). Aquaporins: Highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant Physiol* **164**: 1600-1618.
- Chevalier AS, Chaumont F. (2014). Trafficking of plant plasma membrane aquaporins: multiple regulation levels and complex sorting signals. *Plant Cell Physiol* **56**: 819-829.
- Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu J-K. (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci* **45**: 437-448.
- Chuang C-F, Meyerowitz EM. (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**: 4985-4990.
- Chung J-S, Zhu J-K, Bressan RA, Hasegawa PM, Shi H. (2008). Reactive oxygen species mediate Na⁺ -induced SOS1 mRNA stability in *Arabidopsis*. *Plant J* **53**: 554-565.
- Collins NC, Tardieu F, Tuberosa R. (2008). Quantitative Trait Loci and crop performance under abiotic stress: Where do we stand? *Plant Physiol* **147**: 469-486.
- Colmenero-Flores JM, Martínez G, Gamba G, Vázquez N, Iglesias DJ, Brumós J, *et al* . (2007). Identification and functional characterization of cation-chloride cotransporters in plants. *Plant J* **50**: 278-292.
- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Alfaro-Cuevas R, López-Bucio J. (2014).

- Trichoderma* spp. improve growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolite production, and Na⁺ elimination through root exudates. *Mol Plant-Microbe Interact* **27**: 503-514.
- Corratgé-Faillie C, Jabnourne M, Zimmermann S, Véry AA, Fizames C, Sentenac H. (2010). Potassium and sodium transport in non-animal cells: The Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cell Mol Life Sci* **67**: 2511-2532.
- Cortina C, Culiáñez-Macià FA. (2005). Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Sci* **169**: 75-82.
- Cotsaftis O, Plett D, Shirley N, Tester M, Hrmova M. (2012). A two-staged model of Na⁺ exclusion in rice explained by 3D modeling of HKT transporters and alternative splicing. *PLoS ONE* **7**: e39865.
- Cuartero J, Bolarín MC, Asíns MJ, Moreno V. (2006). Increasing salt tolerance in the tomato. *J Exp Bot* **57**: 1045-1058.
- Cuartero J, Fernandez-Muñoz R. (1999). Tomato and salinity. *Sci Hortic (Amsterdam)* **78**: 83-125.
- Cuartero J, Yeo AR, Flowers TJ. (1992). Selection of donors for salt-tolerance in tomato using physiological traits. *New Phytol* **121**: 63-69.
- Dajic Z. (2006). Salt stress. In: Madhava Rao KV, Raghavendra AS, Janardhan Reddy K (eds). *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer: Dordrecht, pp. 41-99.
- Darwin SC, Knapp S, Peralta IE. (2003). Taxonomy of tomatoes in the Galápagos Islands: native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (Solanaceae). *Syst Biodivers* **1**: 29-53.
- Davenport RJ, Muñoz-Mayor A, Jha D, Essah PA, Rus A, Tester M. (2007). The Na⁺ transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* **30**: 497-507.
- Davuluri GR, Tuinen A, Mustilli AC, Manfredonia A, Newman R, Burgess D, et al . (2004). Manipulation of DET1 expression in tomato results in photomorphogenic phenotypes caused by post-transcriptional gene silencing. *Plant J* **40**: 344-354.
- Deinlein U, Stephan AB, Horie T, Luo W, Xu G, Schroeder JI. (2014). Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends Plant Sci* **19**: 371-379.
- Delauney AJ, Verma DPS. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J* **4**: 215-223.
- Demidchik V, Davenport RJ, Tester M. (2002). Nonselective cation channels in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 67-107.
- Demidchik V, Maathuis FJM. (2007). Physiological roles of nonselective cation channels in plants: From salt stress to signalling and development. *New Phytol* **175**: 387-404.
- Demidchik V, Straltsova D, Medvedev SS, Pozhvanov GA, Sokolik A, Yurin V. (2014). Stress-induced electrolyte leakage: The role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *J Exp Bot* **65**: 1259-1270.
- Demidchik V, Tester M. (2002). Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol* **128**: 379-387.
- Devkota M, Gupta RK, Martius C, Lamers JPA, Devkota KP, Sayre KD, et al . (2015). Soil salinity management on raised beds with different furrow irrigation modes in salt-affected lands. *Agric Water Manag* **152**: 243-250.

- Diatloff E, Kumar R, Schachtman DP. (1998). Site directed mutagenesis reduces the Na⁺ affinity of HKT1, an Na⁺ energized high affinity K⁺ transporter. *FEBS Lett* **432**: 31-36.
- Dobrenz A. (1999). Salt Tolerant Alfalfa. *Agripro Seeds, Inc, Shawnee Mission Kans* 31-34.
- Dobrenz AK, Robinson DL, Smith SE, Poteet DC. (1989). Registration of AZ-GERM SALT-II nondormant alfalfa germplasm. *Crop Sci* **29**: 493.
- Drozdowicz YM, Kissinger JC, Rea PA. (2000). AVP2, a sequence-divergent, K⁺-insensitive H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **123**: 353-62.
- Dubcovsky J, María GS, Epstein E, Luo M-C, Dvořák J. (1996). Mapping of the K⁺/Na⁺ discrimination locus *Kna1* in wheat. *Theor Appl Genet* **92-92**: 448-454.
- Durell SR, Guy HR. 1999. Structural models of the KtrB, TrkH, and Trk1,2 symporters based on the structure of the KcsA K⁺ channel. *Biophys J* **77**:789-807.
- Dvořák J, Noaman MM, Goyal S, Gorham J. (1994). Enhancement of the salt tolerance of *Triticum turgidum* L. by the *Kna1* locus transferred from the *Triticum aestivum* L. chromosome 4D by homoeologous recombination. *Theor Appl Genet* **87**: 872-877.
- Ellul P, Garcia-Sogo B, Pineda B, Ríos G, Roig L, Moreno V. (2003). The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) is genotype and procedure dependent. *Theor Appl Genet* **106**: 231-238.
- Eltayeb AE, Kawano N, Badawi GH, Kaminaka H, Sanekata T, Shibahara T, *et al* . (2007). Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. *Planta* **225**: 1255-1264.
- Emery L, Whelan S, Hirschi KD, Pittman JK. (2012). Protein phylogenetic analysis of Ca²⁺/cation antiporters and insights into their evolution in plants. *Front Plant Sci* **3**: 1.
- Epstein E, Norlyn JD, Rush DW, Kingsbury RW, Kelley DB, Cunningham GA, *et al*. (1980). Saline culture of crops: a genetic approach. *Science* **210**: 399-404.
- Essah PA, Davenport R, Tester M. (2003). Sodium influx and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **133**: 307-318.
- Estañ MT, Martinez-Rodriguez MM, Perez-Alfocea F, Flowers TJ, Bolarin MC. (2005). Grafting raises the salt tolerance of tomato through limiting the transport of sodium and chloride to the shoot. *J Exp Bot* **56**: 703-712.
- Fagard M, Vaucheret H. (2000). (Trans)Gene silencing in plants: How many mechanisms? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**: 167-194.
- Fairbairn DJ, Liu W, Schachtman DP, Gomez-Gallego S, Day SR, Teasdale RD. (2000). Characterisation of two distinct HKT1-like potassium transporters from *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Mol Biol* **43**: 515-525.
- FAO. (2014). Statistics division of the food and agriculture organization of the united nations. <http://faostat3.fao.org>.
- FAO. (2011). The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW)-Managing systems at risk. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome and Earthscan, London.
- Feldmann KA. (1991). T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *Plant J* **1**: 71-82.

- Feng G, Zhang Z, Wan C, Lu P, Bakour A. (2017). Effects of saline water irrigation on soil salinity and yield of summer maize (*Zea mays* L.) in subsurface drainage system. *Agric Water Manag* **193**: 205-213.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- Flowers T, Yeo A. (1995). Breeding for salinity resistance in crop plants- Where next? *Aust J Plant Physiol* **22**: 875-884.
- Flowers TJ. (2004). Improving crop salt tolerance. *J Exp Bot* **55**: 307-319.
- Foolad MR. (2004). Recent advances in genetics of salt tolerance in tomato. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. **76**: 101-119.
- Foolad MR. (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *Int J Plant Genomics*. doi: 10.1155/2007/64358.
- Fosberg FR. (1987). *Solanum cheesmaniae* (L. Riley) Fosberg. *Phytologia* **62**: 181.
- Francia E, Tacconi G, Crosatti C, Barabaschi D, Bulgarelli D, Dall'Aglio E, *et al* . (2005). Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **82**: 317-342.
- Frodin DG. (2004). History and concepts of big plant genera. **53**: 753-776.
- Fuchs I, Stölzle S, Ivashikina N, Hedrich R. (2005). Rice K⁺ uptake channel OsAKT1 is sensitive to salt stress. *Planta* **221**: 212-221.
- Fuglsang AT, Paez-Valencia J, Gaxiola RA. (2011). Transporters and pumps in plant signaling. In: Geisler M, Venema K (eds) Vol. 7. Springer: Berlin, Germany, pp. 39-64.
- Furumoto T, Yamaguchi T, Ohshima-Ichie Y, Nakamura M, Tsuchida-Iwata Y, Shimamura M, *et al* . (2011). A plastidial sodium-dependent pyruvate transporter. *Nature* **476**: 472-475.
- Fusco C, Guidotti E, Zervos AS. (1999). In vivo construction of cDNA libraries for use in the yeast two-hybrid system. *Yeast Funct Anal Reports* **15**: 715-720.
- Gaash R, Elazar M, Mizrahi K, Avramov-Mor M, Berezin I, Shaul O. (2013). Phylogeny and a structural model of plant MHX transporters. *BMC Plant Biol* **13**: 75.
- Gálvez FJ, Baghour M, Hao G, Cagnac O, Rodríguez-rosales MP, Venema K. (2012). Expression of LeNHX isoforms in response to salt stress in salt sensitive and salt tolerant tomato species. *Plant Physiol Biochem* **51**: 109-115.
- Gao Z, Sagi M, Lips SH. (1998). Carbohydrate metabolism in leaves and assimilate partitioning in fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) as affected by salinity. *Plant Sci* **135**: 149-159.
- Garcia A, Rizzo CA, UdDin J, Bartos SL, Senadhira D, Flowers TJ, *et al* . (1997). Sodium and potassium transport to the xylem are inherited independently in rice, and the mechanism of sodium: Potassium selectivity differs between rice and wheat. *Plant Cell Environ* **20**: 1167-1174.
- Garcia-deblás B, Senn ME, Bañuelos MA, Rodríguez-Navarro A. (2003). Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *Plant J* **34**: 788-801.
- Gassman W, Rubio F, Schroeder JI. (1996). Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1. *Plant J* **10**: 869-882.
- Gaxiola RA, Palmgren MG, Schumacher K. (2007). Plant proton pumps. *FEBS Lett* **581**: 2204-

2214.

- Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL, Fink GR. (1999). The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1480-5.
- Gaxiola RA, Sanchez CA, Paez-Valencia J, Ayre BG, Elser JJ. (2012). Genetic manipulation of a «vacuolar» H⁺-PPase: From salt tolerance to yield enhancement under phosphorus-deficient soils. *Plant Physiol* **159**: 3-11.
- Ge LF, Chao DY, Shi M, Zhu MZ, Gao JP, Lin HX. (2008). Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene *OsTPP1* confers stress tolerance in rice and results in the activation of stress responsive genes. *Planta* **228**: 191-201.
- Gelburd DE. (1985). Managing salinity lessons from the past. *J Soil Water Conservation*. **40**: 329-331.
- Gietz RD, Woods RA. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **350**: 87-96.
- Gilliham M, Able JA, Roy SJ. (2017). Translating knowledge about abiotic stress tolerance to breeding programmes. *Plant J* **90**: 898-917.
- Gisbert C, Rus AM, Bolarín MC, López-Coronado JM, Arrillaga I, Montesinos C, *et al* . (2000). The yeast HAL1 gene improves salt tolerance of transgenic tomato. *Plant Physiol* **123**: 393-402.
- Gleave AP. (1992). A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol Biol* **20**: 1203-1207.
- Goel D, Singh AK, Yadav V, Babbar SB, Bansal KC. (2010). Overexpression of osmotin gene confers tolerance to salt and drought stresses in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Protoplasma* **245**: 133-141.
- Goffeau A. (2000). Four years of post-genomic life with 6000 yeast genes. *FEBS Lett* **480**: 37-41.
- Gorham J, Bristol A, Young EM, Wyn Jones RG, Kashour G. (1990). Salt tolerance in the Triticeae: K/Na Discrimination in barley. *J Exp Bot* **41**: 1095-1101.
- Gorham J, Hardy C, Wyn Jones RG, Joppa LR, Law CN. (1987). Chromosomal location of a K/Na discrimination character in the D genome of wheat. *Theor Appl Genet* **74**: 584-588.
- Greenway H, Munns R. (1980). Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu Rev Plant Physiol* **31**: 149-190.
- Griffiths AJ, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. (2000). Genetics and the organism. W. H. Freeman, New York.
- Gunn KM, Fausey NR, Shang Y, Shedekar VS, Ghane E, Wahl MD, *et al* . (2015). Subsurface drainage volume reduction with drainage water management: Case studies in Ohio, USA. *Agric Water Manag* **149**: 131-142.
- Guo Y, Xiong L, Song C-P, Gong D, Halfter U, Zhu J-K. (2002). A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Dev Cell* **3**: 233-244.
- Haferkamp I, Linka N. (2012). Functional expression and characterisation of membrane transport proteins. *Plant Biol* **14**: 675-690.
- Hall D, Evans AR, Newbury HJ, Pritchard J. (2006). Functional analysis of CHX21: a putative

- sodium transporter in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **57**: 1201-1210.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**: 950-952
- Hanitzsch M, Schnitzer D, Seidel T, Golldack D, Dietz KJ. (2007). Transcript level regulation of the vacuolar H⁺-ATPase subunit isoforms VHA-a, VHA-E and VHA-G in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Membr Biol* **24**: 507-518.
- Hannon GJ. (2002). RNA interference. *Nature* **418**: 244-251.
- Hansen BG, Halkier BA, Kliebenstein DJ. (2008). Identifying the molecular basis of QTLs: eQTLs add a new dimension. *Trends Plant Sci* **13**: 72-77.
- Hare PD, Cress WA, Van Staden J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell Environ* **21**: 535-553.
- Haro R, Bañuelos MA, Rodríguez-Navarro A. (2009). High-affinity sodium uptake in land plants. *Plant Cell Physiol* **51**: 68-79.
- Haro R, Bañuelos MA, Senn ME, Barrero-Gil J, Rodríguez-Navarro A. (2005). HKT1 mediates sodium uniport in roots. Pitfalls in the expression of HKT1 in yeast. *Plant Physiol* **139**: 1495-1506.
- Haro R, Rodríguez-Navarro A. (2002). Molecular analysis of the mechanism of potassium uptake through the TRK1 transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1564**: 114-122.
- Haro R, Rodríguez-Navarro A. (2003). Functional analysis of the M2D helix of the TRK1 potassium transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1613**: 1-6.
- Hasegawa PM. (2013). Sodium (Na⁺) homeostasis and salt tolerance of plants. *Environ Exp Bot* **92**: 19-31.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu J-K, Bohnert HJ. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Biol* **51**: 463-499.
- Hauser F, Horie T. (2010). A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: A mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K⁺/Na⁺ ratio in leaves during salinity stress. *Plant, Cell Environ* **33**: 552-565.
- Henderson SW, Dunlevy JD, Wu Y, Blackmore DH, Walker RR, Edwards EJ, *et al* . (2017). Functional differences in transport properties of natural HKT1;1 variants influence shoot Na⁺ exclusion in grapevine rootstocks. *New Phytol* **217**: 1113-1127
- Hershey DR. (1994). Solution Culture Hydroponics: History & Inexpensive Equipment. *Am Biol Teach* **56**: 111-118.
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* **27**: 297-300.
- Himabindu Y, Chakradhar T, Reddy MC, Kanygin A, Redding KE, Chandrasekhar T. (2016). Salt-tolerant genes from halophytes are potential key players of salt tolerance in glycophytes. Elsevier B.V.
- Hirsch RE. (1998). A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* **280**: 918-921.
- Hmida-Sayari A, Gargouri-Bouazid R, Bidani A, Jaoua L, Saviouré A, Jaoua S. (2005). Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. *Plant Sci* **169**: 746-752.

- Hoagland DR, Arnon DI. (1950). The water-culture method for growing plants. *California Agric Expt Stn Bull.* **47**.
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**: 179-180.
- Van der Hoeven R. (2002). Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant Cell Online* **14**: 1441-1456.
- Hollington PA. (2000). Technological breakthroughs in screening/breeding wheat varieties for salt tolerance. In: Gupta SK, Sharma SK, Tyagi NK, editors. *Proceedings of the National Conference 'Salinity Management in Agriculture'*. pp. 273-289.
- Horie T, Brodsky DE, Costa A, Kaneko T, Lo Schiavo F, Katsuhara M, *et al* . (2011). K⁺ transport by the OsHKT2;4 transporter from rice with atypical Na⁺ transport properties and competition in permeation of K⁺ over Mg²⁺ and Ca²⁺ Ions. *Plant Physiol* **156**: 1493-1507.
- Horie T, Costa A, Kim TH, Han MJ, Horie R, Leung H-Y, *et al* . (2007). Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na⁺ influx component into K⁺-starved roots for growth. *EMBO J* **26**: 3003-3014.
- Horie T, Hauser F, Schroeder JI. (2009). HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in *Arabidopsis* and monocot crop plants. *Trends Plant Sci* **14**: 660-668.
- Horie T, Schroeder JI. (2004). Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiol* **136**: 2457-2462.
- Horie T, Yoshida K, Nakayama H, Yamada K, Oiki S, Shinmyo A. (2001). Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *Plant J* **27**: 129-138.
- Huang S, Spielmeier W, Lagudah ES, James RA, Platten JD, Dennis ES, *et al* . (2006a). A sodium transporter (HKT7) is a candidate for *Nax1*, a gene for salt tolerance in durum wheat. *Plant Physiol* **142**: 1718-1727.
- Huang XQ, Cloutier S, Lycar L, Radovanovic N, Humphreys DG, Noll JS, *et al* . (2006b). Molecular detection of QTLs for agronomic and quality traits in a doubled haploid population derived from two Canadian wheats (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* **113**: 753-766.
- Huang Z, Zhao L, Chen D, Liang M, Liu Z, Shao H, *et al* . (2013). Salt stress encourages proline accumulation by regulating proline biosynthesis and degradation in jerusalem artichoke plantlets. *PLoS ONE* **8**. doi: 10.1371/journal.pone.0062085.
- Huertas R, Olías R, Eljakaoui Z, Gálvez FJ, Li J, De Morales PA, *et al* . (2012). Overexpression of *SISOS2* (*SlCIPK24*) confers salt tolerance to transgenic tomato. *Plant, Cell Environ* **35**: 1467-1482.
- Huertas R, Rubio L, Cagnac O, García-Sánchez MJ, Alché JDD, Venema K, *et al* . (2013). The K⁺/H⁺ antiporter LeNHX2 increases salt tolerance by improving K⁺ homeostasis in transgenic tomato. *Plant Cell Environ* **36**: 2135-2149.
- Hutvágner G, Zamore PD. (2002). RNAi: Nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* **12**: 225-232.
- Ijaz R, Ejaz J, Gao S, Liu T, Imtiaz M, Ye Z, *et al* . (2017). Overexpression of annexin gene *AnnSp2*, enhances drought and salt tolerance through modulation of ABA synthesis and scavenging ROS in tomato. *Sci Rep* **7**: 1-14.

- Ikeda M, Beitz E, Kozono D, Guggino WB, Agre P, Yasui M. (2002). Characterization of aquaporin-6 as a nitrate channel in mammalian cells. Requirement of pore-lining residue threonine 63. *J Biol Chem* **277**: 39873-39879.
- Imai T, Ohno T. (1995). The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3604-3608.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Isayenkov S, Isner JC, Maathuis FJM. (2010). Vacuolar ion channels: Roles in plant nutrition and signalling. *FEBS Lett* **584**: 1982-1988.
- Ishitani M, Majumder AL, Bornhouser A, Michalowski CB, Jensen RG, Bohnert HJ. (1996). Coordinate transcriptional induction of myo-inositol metabolism during environmental stress. *Plant J* **9**: 537-48.
- Jabnourne M, Espeout S, Mieulet D, Fizames C, Verdeil J-L, Conejero G, *et al* . (2009). Diversity in expression patterns and functional properties in the rice HKT transporter family. *PLANT Physiol* **150**: 1955-1971.
- Jaime-Pérez N, Pineda B, García-Sogo B, Atares A, Athman A, Byrt CS, *et al* . (2017). The sodium transporter encoded by the *HKT1;2* gene modulates sodium/potassium homeostasis in tomato shoots under salinity. *Plant Cell Environ* **40**: 658-671.
- James RA, Blake C, Byrt CS, Munns R. (2011). Major genes for Na⁺ exclusion, *Nax1* and *Nax2* (wheat *HKT1;4* and *HKT1;5*), decrease Na⁺ accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. *J Exp Bot* **62**: 2939-2947.
- James RA, Davenport RJ, Munns R. (2006). Physiological characterization of two genes for Na⁺ exclusion in durum wheat, *Nax1* and *Nax2*. *Plant Physiol* **142**: 1537-47.
- Janicka-Russak M, Kabała K. (2015). The role of plasma membrane H⁺-ATPase in salinity stress of plants. In: Lüttge U, Beyschlag W (eds). *Progress in Botany*. Cham: Springer, pp. 77-92.
- Jansen, R.C. (2001) Quantitative trait loci in inbred lines. In *Handbook of Statistical Genetics* (Balding, D. *et al.*, eds), pp. 567-597, John Wiley & Sons.
- Jha D, Shirley N, Tester M, Roy SJ. (2010). Variation in salinity tolerance and shoot sodium accumulation in *Arabidopsis* ecotypes linked to differences in the natural expression levels of transporters involved in sodium transport. *Plant Cell Environ.* **33**:793-804.
- Jia Z, Luo W, Xie J, Pan Y, Chen Y, Tang S, *et al* . (2011). Salinity dynamics of wetland ditches receiving drainage from irrigated agricultural land in arid and semi-arid regions. *Agric Water Manag* **100**: 9-17.
- Jiang X, Leidi EO, Pardo JM. (2010). How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance? *Plant Signal Behav* **5**: 792-795.
- Johnson DW, Smith SE, Dobrenz AK. (2001). Registration of AZ-90NDC-ST nondormant alfalfa germplasm with improved forage yield in saline environments. *Crop Sci* **31**: 1098-1099.
- Jones JB. (2005). *Hydroponics : a practical guide for the soilless grower*. CRC Press.
- Kasajima I, Ide Y, Ohkama-Ohtsu N, Hayashi H, Yoneyama T, Fujiwara T. (2004). A protocol for rapid DNA extraction from *Arabidopsis thaliana* for PCR analysis. *Plant Mol Biol Report* **22**: 49-52.
- Kato N, Akai M, Zulkifli L, Matsuda N, Kato Y, Goshima S, *et al* . (2007). Role of positively charged amino acids in the M2_D transmembrane helix of Ktr/Trk/HKT type cation

transporters. *Channels* **1**: 161-171.

- Kato Y, Sakaguchi M, Mori Y, Saito K., Nakamura T, Bakker EP, *et al* . (2001). Evidence in support of a four transmembrane-pore-transmembrane topology model for the *Arabidopsis thaliana* Na⁺/K⁺ translocating AtHKT1 protein, a member of the superfamily of K⁺ transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 6488-6493.
- Katschnig D, Bliet T, Rozema J, Schat H. (2015). Constitutive high-level *SOS1* expression and absence of *HKT1;1* expression in the salt-accumulating halophyte *Salicornia dolichostachya*. *Plant Sci* **234**: 144-154.
- Kishor P, Hong Z, Miao GH, Hu C, Verma D. (1995). Overexpression of [delta]-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol* **108**: 1387-1394.
- Kitazono AA. (2009). Improved gap-repair cloning method that uses oligonucleotides to target cognate sequences. *Yeast* **26**: 497-505.
- Kitazono AA. (2011). Optimized protocols and plasmids for in vivo cloning in yeast. *Gene* **484**: 86-89.
- Kleinboelting N, Huep G, Appelhagen I, Viehoveer P, Li Y, Weisshaar B. (2015). The structural features of thousands of T-DNA insertion sites are consistent with a double-strand break repair-based insertion mechanism. *Mol Plant* **8**: 1651-1664.
- Kleinboelting N, Huep G, Kloetgen A, Viehoveer P, Weisshaar B. (2012b). GABI-Kat SimpleSearch: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Res* **40**: D1211-D1215.
- Koch A, Kogel KH. (2014). New wind in the sails: Improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. *Plant Biotechnol J* **12**: 821-831.
- Koch KE. (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 509-540.
- Krebs M, Beyhl D, Gorlich E, Al-Rasheid KAS, Marten I, Stierhof Y-D, *et al* . (2010). *Arabidopsis* V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 3251-3256.
- Krishnamurthy P, Mohanty B, Wijaya E, Lee DY, Lim TM, Lin Q, *et al* . (2017). Transcriptomics analysis of salt stress tolerance in the roots of the mangrove *Avicennia officinalis*. *Sci Rep* **7**: 1-19.
- Kronzucker HJ, Britto DT. (2011). Sodium transport in plants: A critical review. *New Phytol* **189**: 54-81.
- Kronzucker HJ, Coskun D, Schulze LM, Wong JR, Britto DT. (2013). Sodium as nutrient and toxicant. *Plant Soil* **369**: 1-23.
- Krysan PJ, Young JC, Sussman MR. (1999). T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**: 2283-2290.
- Kumar A, Snyder M. (2001). Emerging technologies in yeast genomics. *Nat Rev Genet* **2**: 302-312.
- Ladizinsky G. (1985). Founder effect in crop-plant evolution. *Econ Bot* **39**: 191-199.
- Lakhdar A, Rabhi M, Ghnaya T, Montemurro F, Jedidi N, Abdelly C. (2009). Effectiveness of compost use in salt-affected soil. **171**: 29-37.
- Lal S, Gulyani V, Khurana P. (2008). Overexpression of *HVA1* gene from barley generates tolerance to salinity and water stress in transgenic mulberry (*Morus indica*). *Transgenic Res* **17**: 651-663.

- Lan W-Z, Wang W, Wang S-M, Li L-G, Buchanan BB, Lin H-X, *et al* . (2010). A rice high-affinity potassium transporter (HKT) conceals a calcium-permeable cation channel. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 7089-7094.
- Lander ES, Botstein S. (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* **121**: 185.
- Laurie S, Feeney KA, Maathuis FJM, Heard PJ, Brown SJ, Leigh RA. (2002). A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *Plant J* **32**: 139-149.
- Leidi EO, Barragán V, Rubio L, El-Hamdaoui A, Ruiz MT, Cubero B, *et al* . (2010). The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *Plant J* **61**: 495-506.
- Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Peer Y Van De, *et al* . (2002). PlantCARE , a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. **30**: 325-327.
- Letey J, Hoffman GJ, Hopmans JW, Grattan SR, Suarez D, Corwin DL, *et al* . (2011). Evaluation of soil salinity leaching requirement guidelines. *Agric Water Manag* **98**: 502-506.
- Li G, Santoni V, Maurel C. (2014). Plant aquaporins: Roles in plant physiology. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* **1840**: 1574-1582.
- Li Y, Rosso MG, Strizhov N, Viehoveer P, Weisshaar B. (2003). GABI-Kat SimpleSearch: A flanking sequence tag (FST) database for the identification of T-DNA insertion mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics* **19**: 1441-1442.
- Lin SM, Tsai JY, Hsiao CD, Huang YT, Chiu CL, Liu MH, *et al* . (2012). Crystal structure of a membrane-embedded H⁺-translocating pyrophosphatase. *Nature* **484**: 399-403.
- Linnaeus C v. (1753). Species Plantarum. *Laurentii Salvii, Stock* **1**.
- Liu J, Ishitani M, Halfter U, Kim CS, Zhu JK. (2000). The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3730-3734.
- Liu J, Zhu JK. (1997). Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **114**: 591-596.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* **25**: 402-408.
- De Luca A, Pardo JM, Leidi EO. (2017). Pleiotropic effects of enhancing vacuolar K/H exchange in tomato. *Physiol Plant*. doi: 10.1111/ppl.12656.
- Ma Q, Li Y-X, Yuan H-J, Hu J, Wei L, Bao A-K, *et al* . (2013). ZxSOS1 is essential for long-distance transport and spatial distribution of Na⁺ and K⁺ in the xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum*. *Plant Soil*. **374**: 661-676.
- Maas E V, Grieve CM. (1990). Spike and leaf development of sal-stressed wheat. *Crop Sci* **30**: 1309.
- Maathuis FJM, Ahmad I, Patishtan J. (2014). Regulation of Na⁺ fluxes in plants. *Front Plant Sci* **5**: 1-9.
- Maathuis FJM, Amtmann A. (1999). K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity : The basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. *Ann Bot* **84**: 123-133.
- Mansour MMF. (2014). The plasma membrane transport systems and adaptation to salinity. *J Plant Physiol* **171**: 1787-1800.

- Maresova L, Sychrova H. (2005). Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae kha1* deletion mutants. *Mol Microbiol* **55**: 588-600.
- Mäser P, Eckelman B, Vaidyanathan R, Horie T, Fairbairn DJ, Kubo M, *et al* . (2002). Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na⁺ transporter *AtHKT1*. *FEBS Lett* **531**: 157-161.
- Mäser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, *et al* . (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **126**: 1646-67.
- Mason MG, Jha D, Salt DE, Tester M, Hill K, Kieber JJ, *et al* . (2010). Type-B response regulators ARR1 and ARR12 regulate expression of *AtHKT1;1* and accumulation of sodium in *Arabidopsis* shoots. *Plant J* **64**: 753-763.
- Mateo-Sagasta J, Burke J. (2010). Agriculture and water quality interactions: a global overview. *SOLAW Background Thematic Report - TR08*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Matsumoto H, Chung GC. (1988). Increase in proton-transport activity of tonoplast vesicles as an adaptive response of barley roots to NaCl stress. *Plant Cell Physiol* **29**: 1133-1140.
- McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S. (2000). Targeted screening for induced mutations. *Nat Biotechnol* **18**: 455-457.
- McManus MT, Sharp PA. (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* **3**: 737-747.
- Mian A, Oomen RJFJ, Isayenkov S, Sentenac H, Maathuis FJM, Véry A-A. (2011). Over-expression of an Na⁺- and K⁺-permeable HKT transporter in barley improves salt tolerance. *Plant J* **68**: 468-479.
- Mickelbart M V., Hasegawa PM, Bailey-Serres J. (2015). Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nat Rev Genet* **16**: 237-251.
- Miller JC, Tanksley SD. (1990). RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor Appl Genet* **80**: 437-48.
- Miller P. (1754). The gardeners dictionary: Containing the methods of cultivating and improving all sorts of trees, plants, and flowers, for the kitchen, fruit, and pleasure gardens; as also those which are used in medicine. With directions for the culture of vineyards, an. *Print author* Vol. 3.
- Mitsuda N, Enami K, Nakata M, Takeyasu K, Sato MH. (2001). Novel type *Arabidopsis thaliana* H⁺-PPase is localized to the Golgi apparatus. *FEBS Lett* **488**: 29-33.
- Mittler R, Blumwald E. (2010). Genetic engineering for modern agriculture: Challenges and perspectives. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 443-462.
- Mizrahi Y. (1982). Effect of salinity on tomato fruit ripening. *Plant Physiol* **69**: 966-970.
- Møller IS, Gilliam M, Jha D, Mayo GM, Roy SJ, Coates JC, *et al* . (2009). Shoot Na⁺ exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na⁺ transport in *Arabidopsis*. *Plant Cell Online* **21**: 2163-2178.
- Moore S, Payton P, Wright M, Tanksley S, Giovannoni J. (2005). Utilization of tomato microarrays for comparative gene expression analysis in the Solanaceae. **56**: 2885-2895.

- Morris J, Tian H, Park S, Sreevidya CS, Ward JM, Hirschi KD. (2008). AtCCX3 is an *Arabidopsis* endomembrane H⁺-dependent K⁺ transporter. *Plant Physiol* **148**: 1474-1486.
- Moyle LC, Muir CD. (2010). Reciprocal insights into adaptation from agricultural and evolutionary studies in tomato. *Evol Appl* **3**: 409-421.
- Muchate NS, Nikalje GC, Rajurkar NS, Suprasanna P, Nikam TD. (2016). Plant salt stress: Adaptive responses, tolerance mechanism and bioengineering for salt tolerance. *Bot Rev* **82**: 371-406.
- Müller M, Kunz HH, Schroeder JI, Kemp G, Young HS, Ekkehard Neuhaus H. (2014). Decreased capacity for sodium export out of *Arabidopsis* chloroplasts impairs salt tolerance, photosynthesis and plant performance. *Plant J* **78**: 646-658.
- Munns R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* **25**: 239-250.
- Munns R. (2005). Genes and Salt Tolerance. *New Phytol* **167**: 645-663.
- Munns R, Gilliam M. (2015). Salinity tolerance of crops - what is the cost ? *New Phytol* **208**: 668-673.
- Munns R, Guo J, Passioura JB, Cramer GR. (2000). Leaf water status controls day-time but not daily rates of leaf expansion in salt-treated barley. *Aust J Plant Physiol* **27**: 949-957.
- Munns R, James RA, Gilliam M, Flowers TJ, Colmer TD. (2016). Tissue tolerance: an essential but elusive trait for salt-tolerant crops. *Funct Plant Biol* **43**: 1103-1113.
- Munns R, James RA, Xu B, Athman A, Conn SJ, Jordans C, *et al* . (2012). Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na⁺ transporter gene. *Nat Biotechnol* **30**: 360-364.
- Munns R, Tester M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 651-81.
- Munns R, Tonnet LM, Shennan C, Gardner PA. (1988). Effect of high external NaCl concentration on ion transport within the shoot of *Lupinus albus*. II. Ions in phloem sap. *Plant Cell Environ* **11**: 291-300.
- Muñoz-Mayor A, Pineda B, Garcia-Abellán JO, Antón T, Garcia-Sogo B, Sanchez-Bel P, *et al* . (2012). Overexpression of dehydrin tas14 gene improves the osmotic stress imposed by drought and salinity in tomato. *J Plant Physiol* **169**: 459-468.
- Murashige T, Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473.
- Nanjo T, Kobayashi M, Yoshida Y, Sanada Y, Wada K, Tsukaya H, *et al* . (1999). Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **18**: 185-193.
- Navarro JM, Garrido C, Flores P, Martinez V. (2010). The effect of salinity on yield and fruit quality of pepper grown in perlite. *Spanish J Agric Res* **8**: 142-150.
- Nevo E, Chen G. (2010). Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. *Plant, Cell Environ* **33**: 670-685.
- Nieves-Cordones M, Alemán F, Martínez V, Rubio F. (2010). The *Arabidopsis thaliana* HAK5 K⁺ transporter is required for plant growth and K⁺ acquisition from low K⁺ solutions under saline conditions. *Mol Plant* **3**: 326-333.
- Nieves-Cordones M, Martínez V, Benito B, Rubio F. (2016). Comparison between *Arabidopsis* and Rice for Main Pathways of K⁺ and Na⁺ Uptake by Roots. *Front Plant Sci* **7**: 1-14.

- Nublat A, Desplans J, Casse F, Berthomieu P. (2001). *sas1*, an *Arabidopsis* mutant overaccumulating sodium in the shoot, shows deficiency in the control of the root radial transport of sodium. **13**: 125-137.
- Nuez F, Prohens J, Blanca JM. (2004). Relationships, origin, and diversity of galapagos tomatoes: Implications for the conservation of natural populations. *Am J Bot* **91**: 86-99.
- Nuez VF. (1995). Desarrollo de nuevos cultivares. In: *El Cultivo del Tomate*. Mundi-Prensa: Madrid, España, pp. 625-669.
- O'Malley RC, Ecker JR. (2010). Linking genotype to phenotype using the *Arabidopsis* unimutant collection. *Plant J* **61**: 928-940.
- Oh D-H, Leidi E, Zhang Q, Hwang S-M, Li Y, Quintero FJ, *et al* . (2009). Loss of halophytism by interference with SOS1 expression. *Plant Physiol* **151**: 210-222.
- Oh DH, Lee SY, Bressan RA, Yun DJ, Bohnert HJ. (2010). Intracellular consequences of SOS1 deficiency during salt stress. *J Exp Bot* **61**: 1205-1213.
- Olías R, Eljakaoui Z, Li J, Álvarez de Morales P, Marín-Manzano MC, Pardo JM, *et al* . (2009a). The plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na⁺ between plant organs. **32**:904-916.
- Olías R, Eljakaoui Z, Pardo JM, Belver A. (2009b). The Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger SOS1 controls extrusion and distribution of Na⁽⁺⁾ in tomato plants under salinity conditions. *Plant Signal Behav* **4**: 973-976.
- Oomen RJFJ, Benito B, Sentenac H, Rodríguez-Navarro A, Talón M, Véry AA, *et al* . (2012). HKT2;2/1, a K⁺-permeable transporter identified in a salt-tolerant rice cultivar through surveys of natural genetic polymorphism. *Plant J* **71**: 750-762.
- Osakabe Y, Arinaga N, Umezawa T, Katsura S, Nagamachi K, Tanaka H, *et al* . (2013). Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 609-624.
- Padmanaban S, Chanroj S, Kwak JM, Li X, Ward JM, Sze H. (2007). Participation of endomembrane cation/H⁺ exchanger AtCHX20 in osmoregulation of guard cells. *Plant Physiol* **144**: 82-93.
- Panagos P, Karydas CG, Gitas IZ, Montanarella L. (2012). Monthly soil erosion monitoring based on remotely sensed biophysical parameters: A case study in Strymonas river basin towards a functional pan-European service. *Int J Digit Earth*, **5** (6) pp. 461-487
- Panagos P, Liedekerke M Van, Jones A, Montanarella L. (2012). European soil data centre : Response to European policy support and public data requirements. *Land use policy*, **29** (2) pp. 329-338
- Pardo JM. (2010). Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Curr Opin Biotechnol* **21**: 185-196.
- Pardo JM, Cubero B, Leidi EO, Quintero FJ. (2006). Alkali cation exchangers: Roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J Exp Bot* **57**: 1181-1199.
- Pardo JM, Rubio F. (2011). Na⁺ and K⁺ transporters in plant signalling. In: Geisler M, Venema K (eds) *Signaling and Communication in Plants. Transporters and Pumps in Plant Signaling*. Springer-Verlag: Berlin, Germany, pp. 65-99.
- Passioura JB, Munns R. (2000). Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Aust J Plant Physiol* **27**: 941-948.

- Pearson WR, Lipmant DJ. (1988). Biochemistry Improved tools for biological sequence comparison. **85**: 2444-2448.
- Pedersen JT, Palmgren M. (2017). Why do plants lack sodium pumps and would they benefit from having one? *Funct Plant Biol* **44**: 473-479.
- Peralta EG, Ream LW. (1985). T-DNA border sequences required for crown gall tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 5112-5116.
- Peralta IE, Knapp S, Spooner DM. (2005). New species of wild tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: *Solanaceae*) from Northern Peru. *Syst Bot* **30**: 424-434.
- Peralta IE, Spooner DM, Knapp S. (2008). Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon* ; *Solanaceae*). *Systematic Botany Monographs*. **84**: 1-186.
- Pérez-Alfocea F, Balibrea ME, Alarcón JJ, Bolarín MC. (2000). Composition of xylem and phloem exudates in relation to the salt-tolerance of domestic and wild tomato species. *J Plant Physiol* **156**: 367-374.
- Pérez-Alfocea F, Santa-Cruz A, Guerrier G, Bolarín MC. (1994). NaCl stress-induced organic solute changes on leaves and calli of *Lycopersicon esculentum*, *L. pennellii* and their interspecific hybrid. *J Plant Physiol* **143**: 106-111.
- Pérez-Alfocea F, Estañ MT, Caro M, Guerrier G. (1993). Osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *L. Pennellii* under NaCl and polyethylene glycol 6000 iso-osmotic stresses. *Physiol Plant* **87**: 493-498.
- Pessarakli M, Szabolcs I. (1994). Soil salinity and sodicity as particular plant/crop stress factors. In: *Handbook of Plant and Crop Stress*. pp. 1-15 New York: Marcel Dekker
- Petrusa L, Winicov I. (1997). Proline status in salt-tolerant and salt-sensitive alfalfa cell lines and plants in response to NaCl. *Plant Physiol Biochem* **35**: 303-310.
- Pilon-Smits E, Ebskamp M, Paul MJ, Jeuken M, Weisbeek PJ, Smeekens S. (1995). Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol* **107**: 125-130.
- Platten JD, Cotsaftis O, Berthomieu P, Bohnert H, Davenport RJ, Fairbairn DJ, *et al* . (2006). Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends Plant Sci* **11**: 372-374.
- Plett D, Safwat G, Gilliam M, Møller IS, Roy S, Shirley N, *et al* . (2010). Improved salinity tolerance of rice through cell type-specific expression of ATHKT1;1. *PLoS ONE* **5**: 1-8.
- Plett DC, Møller IS. (2010). Na⁺ transport in glycophytic plants: What we know and would like to know. *Plant, Cell Environ* **33**: 612-626.
- Pons R, Cornejo MJ, Sanz A. (2011). Differential salinity-induced variations in the activity of H⁺-pumps and Na⁺/H⁺ antiporters that are involved in cytoplasm ion homeostasis as a function of genotype and tolerance level in r. *Plant Physiol Biochem* **49**: 1399-1409.
- Pottosin I, Dobrovinskaya O. (2014). Non-selective cation channels in plasma and vacuolar membranes and their contribution to K⁺ transport. *J Plant Physiol* **171**: 732-742.
- Prasad KVSK, Sharmila P, Kumar P a., Saradhi PP. (2000). Transformation of *Brassica juncea* (L.) Czern with bacterial *codA* gene enhances its tolerance to salt stress. *Mol Breed* **6**: 489-499.
- Prashanth SR, Sadhasivam V, Parida A. (2008). Over expression of cytosolic copper/zinc superoxide dismutase from a mangrove plant *Avicennia marina* in indica Rice var

- Pusa Basmati-1 confers abiotic stress tolerance. *Transgenic Res* **17**: 281-291.
- Praveen S, Ramesh S V., Mishra AK, Koundal V, Palukaitis P. (2010). Silencing potential of viral derived RNAi constructs in *Tomato leaf curl virus-AC₄* gene suppression in tomato. *Transgenic Res* **19**: 45-55.
- Price AH. (2006). Believe it or not, QTLs are accurate! *Trends Plant Sci* **11**: 213-216.
- Prohens J, Nuez F. (2008). Handbook of Plant Breeding. Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae and Umbelliferae, Vol. 2. *Springer Science*; New York; 30-40
- Qi Z, Spalding EP. (2004). Protection of plasma membrane K⁺ transport by the Salt Overly Sensitive1 Na⁺-H⁺ antiporter during salinity stress. *Plant Physiol.* **136**: 2548-2555.
- Qing DJ, Lu HF, Li N, Dong HT, Dong DF, Li YZ. (2009). Comparative profiles of gene expression in leaves and roots of maize seedlings under conditions of salt stress and the removal of salt stress. *Plant Cell Physiol* **50**: 889-903.
- Qiu L, Wu D, Ali S, Cai S, Dai F, Jin X, *et al* . (2011). Evaluation of salinity tolerance and analysis of allelic function of *HvHKT1* and *HvHKT2* in Tibetan wild barley. *Theor Appl Genet* **122**: 695-703.
- Qiu Q-S, Guo Y, Dietrich MA, Schumaker KS, Zhu J-K. (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 8436-8441.
- Qiu Q-S, Guo Y, Quintero FJ, Pardo JM, Schumaker KS, Zhu J-K. (2004). Regulation of vacuolar Na⁺/H⁺ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *J Biol Chem* **279**: 207-15.
- Qiu QS. (2016). Plant endosomal NHX antiporters: Activity and function. *Plant Signal Behav* **11**: 1-3.
- Quan R, Lin H, Mendoza I, Zhang Y, Cao W, Yang Y, *et al* . (2007). SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress. *Plant Cell Online* **19**: 1415-1431.
- Quintero FJ, Blatt MR, Pardo JM. (2000). Functional conservation between yeast and plant endosomal Na⁺ /H⁺ antiporters 1. *Plant Physiol* **471**: 224-228.
- Quintero FJ, Ohta M, Shi H, Zhu J-K, Pardo JM. (2002). Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 9061-6.
- Radhamony RN, Mohan Prasad A, Srinivasan R. (2005). T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Electron J Biotechnol* **8**: 82-106.
- Ratajczak R. (2000). Structure, function and regulation of the plant vacuolar H⁺-translocating ATPase. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1465**: 17-36.
- Ratajczak R, Hinz G, Robinson DG. (1999). Localization of pyrophosphatase in membranes of cauliflower inflorescence cells. *Planta* **208**: 205-211.
- Reina-Sánchez A, Romero-Aranda R, Cuartero J. (2005). Plant water uptake and water use efficiency of greenhouse tomato cultivars irrigated with saline water. *Agric Water Manag* **78**: 54-66.
- Ren Z-H, Gao J-P, Li L-G, Cai X-L, Huang W, Chao D-Y, *et al* . (2005). A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat Genet* **37**: 1141-1146.
- Rentsch D, Laloi M, Rouhara I, Schmelzer E, Delrot S, Frommer WB. (1995). *NTR1* encodes a high affinity oligopeptide transporter in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* **370**: 264-268.

- Rhoades JD, Loveday J. (1990). Salinity in irrigated agriculture. In: Steward BA and Nielsen DR (eds). *American Society of Civil Engineers, Irrigation of Agricultural Crops*. American Society of Agronomists **30**: pp. 1089–1142.
- Rick CM. (1979). Potential improvement of tomatoes by controlled introgression of genes from wild species. In: *Proceedings of the conference Broadening the Genetic Base of Crops*. pp. 167-173.
- Rocha R, Barros E, Cruz C, Rosado A, Araujo E. (2007). Mapping of QTLs related with wood quality and developmental characteristics in hybrids (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). *Rev Arvore* **31**: 13-24.
- Rodríguez-Navarro A, Ramos J. (1984). Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **159**: 940–945.
- Rodríguez-Navarro A, Rubio F. (2006). High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. **57**: 1149-1160.
- Rodríguez-Rosales MP, Gálvez FJ, Huertas R, Aranda MN, Baghour M, Cagnac O, *et al* . (2009). Plant NHX cation/proton antiporters. *Plant Signal Behav* **4**: 265–276.
- Rodríguez-Rosales MP, Jiang X, Gálvez FJ, Aranda MN, Cubero B, Venema K. (2008). Overexpression of the tomato K⁺ /H⁺ antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. *New Phytol* **179**: 366-377.
- Rodríguez-Navarro A. (2000). Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta - Rev Biomembr* **1469**: 1-30.
- Romero-Aranda MR, Jurado O, Cuartero J. (2006). Silicon alleviates the deleterious salt effect on tomato plant growth by improving plant water status. *J Plant Physiol* **163**: 847-855.
- Romero-Aranda R, Soria T, Cuartero J. (2002). Greenhouse Mist Improves Yield of Tomato Plants Grown under Saline Conditions. *J Am Soc Hortic Sci* **127**: 644-648.
- Romero-Aranda R, Soria T, Cuartero J. (2001). Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Sci* **160**: 265-272.
- Ross JA, Herbert ME, Sowa SP, Frankenberger JR, King KW, Christopher SF, *et al* . (2016). A synthesis and comparative evaluation of factors influencing the effectiveness of drainage water management. *Agric Water Manag* **178**: 366-376.
- Roy SJ, Negrão S, Tester M. (2014). Salt resistant crop plants. *Curr Opin Biotechnol* **26**: 115-124.
- Rubio F, Gassmann W, Schroeder JI. (1995). Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science* (80-) **270**: 1660-1663.
- Rubio F, Schwarz M, Gassmann W, Schroeder JI. (1999). Genetic selection of mutations in the high affinity K⁺ transporter HKT1 that define functions of a loop site for reduced Na⁺ permeability and increased Na⁺ tolerance. *J Biol Chem* **274**: 6839-6847.
- Rus A, Baxter I, Muthukumar B, Gustin J, Lahner B, Yakubova E, *et al* . (2006). Natural variants of *AtHKT1* enhance Na⁺ accumulation in two wild populations of *Arabidopsis*. *PLoS Genet* **2**: 1964-1973.
- Rus A, Lee B, Muñoz-Mayor A, Sharkhuu A, Miura K, Zhu J-K, *et al* . (2004). *AtHKT1* facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition. *Plant Physiol* **136**: 2500-2511.
- Rus AM, Bressan RA, Hasegawa PM. (2005). Unraveling salt tolerance in crops. *Nat Genet* **37**: 1029-30.
- Rush DW, Epstein E. (1981). Comparative studies on the sodium, potassium, and chloride relations of a wild halophytic and a domestic salt-sensitive tomato species. *Plant*

Physiol **68**: 1308-1313.

- Sakakibara Y, Kobayashi H, Kasamo K. (1996). Isolation and characterization of cDNAs encoding vacuolar H⁺-pyrophosphatase isoforms from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol* **31**: 1029-1038.
- Salvi S, Tuberosa R. (2007). Cloning QTLs in plants. *Genomics-Assisted Crop Improv* **1**: 207-225.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Saneoka H, Nagasaka C, Hahn DT, Yang W-J, Premachandra GS, Joly RJ, *et al* . (1995). Salt tolerance of glycinebetaine-deficient and -containing maize lines. *Plant Physiol* **107**: 631-638.
- Sassi A, Mieulet D, Khan I, Moreau B, Gaillard I, Sentenac H, *et al* . (2012). The rice monovalent cation transporter OsHKT2;4: revisited ionic selectivity. *Plant Physiol* **160**: 498-510.
- Sawahel WA, Hassan AH. (2002). Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline. *Biotechnol Lett* **24**: 721-725.
- Schachtman D, Liu W. (1999). Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants. *Trends Plant Sci* **4**: 281-287.
- Schachtman DP, Schroeder JI. (1994). Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* **370**: 655-658.
- Schilling RK, Marschner P, Shavrukov Y, Berger B, Tester M, Roy SJ, *et al* . (2013). Expression of the *Arabidopsis* vacuolar H⁺ -pyrophosphatase gene (AVP1) improves the shoot biomass of transgenic barley and increases grain yield in a saline field. *Plant Biotechnol J* 1-9.
- Schneeberger K, Ossowski S, Lanz C, Juul T, Petersen AH, Nielsen KL, *et al* . (2009). SHOREmap: Simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. *Nat Methods* **6**: 550-551.
- Schroeder JI, Delhaize E, Frommer WB, Guerinot M Lou, Harrison MJ, Herrera-Estrella L, *et al* . (2013). Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production. *Nature* **497**: 60-66.
- Schwarz D, Thompson AJ, Kläring H-P. (2014). Guidelines to use tomato in experiments with a controlled environment. *Front Plant Sci* **5**: 625.
- Shabala S, Cuin TA. (2007). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiol Plant* **133**: 651-669.
- Shabala S, Demidchik V, Shabala L, Cuin T a, Smith SJ, Miller AJ, *et al* . (2006). Extracellular Ca²⁺ ameliorates NaCl-induced K⁺ loss from *Arabidopsis* root and leaf cells by controlling plasma membrane K⁺-permeable channels. **141**: 1653-1665.
- Shahin EA. (1985). Totipotency of tomato protoplasts. *Theor Appl Genet* **69**: 235-240.
- Shalata A, Mittova V, Volokita M, Guy M, Tal M. (2001). Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: increased activities of antioxidant enzymes in root plastids. *Physiol Plant* **112**: 487-494.
- Shalata A, Tal M. (1998). The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiologia Plantarum* **104**: 169-174.
- Sheng J, Ma L, Li B, Huang F, Wu H. (2010). Digital soil mapping to enable classification of

- the salt-affected soils in desert agro-ecological zones. *Agric Water Manag* **97**: 1944-1951.
- Sherman F. (2002). Getting started with yeast. In: Fink CGaGR (editor). *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*. San Diego: Academic Press pp. 3-21.
- Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu J-K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 6896-6901.
- Shi H, Quintero FJ, Pardo JM, Zhu JK. (2002). The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell* **14**: 465-477.
- Silva P, Gerós H. (2009). Regulation by salt of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase activities and Na⁺/H⁺ exchange. *Plant Signal Behav* **4**: 718-726.
- Smith N a, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk P a, Green a G, Waterhouse PM. (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**: 319-320.
- Sonneveld C, Voogt W. (2009). Nutrient Solutions for Soilless Cultures. In: *Plant Nutrition of Greenhouse Crops*. Springer Netherlands: Dordrecht, pp. 257-275.
- Sottosanto JB, Gelli A, Blumwald E. (2004). DNA array analyses of *Arabidopsis thaliana* lacking a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter: impact of AtNHX1 on gene expression. *Plant J* **40**: 752-771.
- Stoutjesdijk PA, Singh SP, Liu Q, Hurlstone CJ, Waterhouse PA, Green AG. (2002). hpRNA-mediated targeting of the *Arabidopsis* FAD2 gene gives highly efficient and stable silencing. *Plant Physiol* **129**: 1723-1731.
- Stracke R, Huep G, Weisshaar B. (2010). Use of mutants from T-DNA insertion populations generated by high-throughput screening. In: Meksem K, Kahl G (eds). *The Handbook of Plant Mutation Screening*. Meksem K, Kahl G, Wiley-VCH, Weinheim, Germany. pp. 31-54.
- Su H, Balderas E, Vera-Estrella R, Golldack D, Quigley F, Zhao C, *et al* . (2003). Expression of the cation transporter McHKT1 in a halophyte. *Plant Mol Biol* **52**: 967-980.
- Su J, Wu R. (2004). Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. *Plant Sci* **166**: 941-948.
- Su Y, Luo W, Lin W, Ma L, Kabir MH. (2015). Model of cation transportation mediated by high-affinity potassium transporters (HKTs) in higher plants. pp. 1-13.
- Sun J, Dai S, Wang R, Chen S, Li N, Zhou X, *et al* . (2009). Calcium mediates root K⁺/Na⁺ homeostasis in poplar species differing in salt tolerance. *Tree Physiol* **29**: 1175-1186.
- Sunarpi, Horie T, Motoda J, Kubo M, Yang H, Yoda K, *et al* . (2005). Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J* **44**: 928-938.
- Sundaresan V, Springer P, Volpe T, Haward S, Jones JD, Dean C, *et al* . (1995). Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes Dev* **9**: 1797-810.
- Suzuki K, Yamaji N, Costa A, Okuma E, Kobayashi NI, Kashiwagi T, *et al* . (2016). OsHKT1;4-mediated Na⁽⁺⁾ transport in stems contributes to Na⁽⁺⁾ exclusion from leaf blades of rice at the reproductive growth stage upon salt stress. *BMC Plant Biol* **16**: 22.
- Szabolcs I. (1989). Salt-affected soils. Boca Raton: CRC Press LLC.
- Taiz L, Zeiger E. (2010). Plant Physiology. 5th Edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland.

- Takai D, Jones PA. (2003). The CpG island searcher: a new WWW resource. *In Silico Biol* **3**: 235-40.
- Tal M, Shannon MC. (1983). Salt Tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: Responses of *Lycopersicon esculentum*, *L. cheesmanii*, *L. peruvianum*, *Solanum pennellii* and F1 hybrids to high salinity. *Aust J Plant Physiol* **10**: 109-117.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**: 1596-1599.
- Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, De Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, *et al* . (1992). High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* **132**: 1141-1160.
- Tao Y, Wang S, Xu D, Yuan H, Chen H. (2017). Field and numerical experiment of an improved subsurface drainage system in Huaibei plain. *Agric Water Manag* **194**: 24-32.
- Taylor CB. (1996). proline and water deficit: Ups, downs, ins, and outs. *Plant Cell Online* **8**: 1221-1224.
- Tester M, Davenport RJ. (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann Bot* **91**: 503-527.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.
- The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). (2016). Global status of commercialized biotech/GM Crops *ISAAA Briefs* 317.
- The Tomato Genome Consortium. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**: 635-641.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-80.
- Tissier AF, Marillonnet S, Klimyuk V, Patel K, Torres MA, Murphy G, *et al* . (1999). Multiple independent defective suppressor-mutator transposon insertions in *Arabidopsis*: A tool for functional genomics. *Plant Cell* **11**: 1841-1852.
- Tóth G, Adhikari K, Várallyay G, Tóth T, Bódis K, Stolbovoy V. (2008). Updated map of salt affected soils in the European Union. In: *Threats to Soil Quality in Europe*. Tóth G, Montanarella L, Rusco E (eds). *EC Joint Res. Centre, Institute for Environment and Sustainability*. Ispra pp. 65-77.
- Tuteja N. (2007). Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods Enzymol* **428**: 419-438.
- Undurraga SF, Santos MF, Paez-Valencia J, Yang H, Hepler PK, Facanha AR, *et al* . (2012). *Arabidopsis* sodium dependent and independent phenotypes triggered by H⁺-PPase up-regulation are SOS1 dependent. *Plant Sci* **183**: 96-105.
- Uozumi N, Kim EJ, Rubio F, Yamaguchi T, Muto S, Tsuboi a, *et al* . (2000). The *Arabidopsis* HKT1 gene homolog mediates inward Na⁺ currents in xenopus laevis oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol* **122**: 1249-1259.
- Vance V, Vaucheret H. (2001). RNA silencing in plants--defense and counterdefense. *Science* **292**: 2277-2280.
- Varsha-Wesley S, Helliwell CA, Smith NA, Wang M, Rouse DT, Liu Q, *et al* . (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in

- plants. *Plant J* **27**: 581–590.
- Vaucheret H, Fagard M. (2001). Transcriptional gene silencing in plants: Targets, inducers and regulators. *Trends Genet* **17**: 29-35.
- Venema K, Belver A, Marin-Manzano MC, Rodríguez-Rosales MP, Donaire JP. (2003). A novel intracellular K⁺/H⁺ antiporter related to Na⁺/H⁺ antiporters is important for K⁺ ion homeostasis in plants. *J Biol Chem* **278**: 22453-22459.
- Venema K, Quintero FJ, Pardo JM, Donaire JP. (2002). The *Arabidopsis* Na⁺/H⁺ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na⁺ and K⁺ transport in reconstituted liposomes. *J Biol Chem* **277**: 2413-8.
- Vieira-Pires RS, Szollosi A, Morais-Cabral JH. (2013). The structure of the KtrAB potassium transporter. *Nature* **496**: 323-328.
- Villalta I, Bernet GP, Carbonell EA, Asins MJ. (2007). Comparative QTL analysis of salinity tolerance in terms of fruit yield using two solanum populations of F7 lines. *Theor Appl Genet* **114**: 1001-1017.
- Villalta I, Reina-Sánchez A, Bolarín MC, Cuartero J, Belver A, Venema K, *et al* . (2008). Genetic analysis of Na⁺ and K⁺ concentrations in leaf and stem as physiological components of salt tolerance in Tomato. *Theor Appl Genet* **116**: 869-880.
- Vinocur B, Altman A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: Achievements and limitations. *Curr Opin Biotechnol* **16**: 123-132.
- Voinnet O. (2002). RNA silencing: Small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 444-451.
- Waie B, Rajam MV. (2003). Effect of increased polyamine biosynthesis on stress responses in transgenic tobacco by introduction of human S-adenosylmethionine gene. *Plant Sci* **164**: 727-734.
- Wang K, Herrera-Estrella L, Van Montagu M, Zambryski P, Barker RF, Idler KB, *et al* . (1984). Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from agrobacterium to the plant genome. *Cell* **38**: 455-62.
- Wang L, Wu X, Liu Y, Qiu Q-S. (2015a). AtNHX5 and AtNHX6 control cellular K⁺ and pH homeostasis in *Arabidopsis*: Three conserved acidic residues are essential for K⁺ transport. *PloS ONE*. 10. e0144716. 10.1371/journal.pone.0144716.
- Wang Q, Guan C, Wang P, Lv M-L, Ma Q, Wu G-Q, *et al* . (2015b). AtHKT1;1 and AtHAK5 mediate low-affinity Na⁺ uptake in *Arabidopsis thaliana* under mild salt stress. *Plant Growth Regul* **75**: 615-623.
- Wang Q, Guan C, Wang SM. (2014). Coordination of AtHKT1;1 and AtSOS1 facilitates Na⁺ and K⁺ homeostasis in *Arabidopsis thaliana* under salt stress. *J Plant Biol* **57**: 282-290.
- Wang R, Kang Y, Wan S, Hu W, Liu S, Jiang S, *et al* . (2012). Influence of different amounts of irrigation water on salt leaching and cotton growth under drip irrigation in an arid and saline area. *Agric Water Manag* **110**: 109-117.
- Waterhouse PM, Helliwell CA. (2003). Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat Rev Genet* **4**: 29-38.
- Waters S, Gilliam M, Hrmova M. (2013). Plant High-Affinity Potassium (HKT) Transporters involved in salinity tolerance: Structural insights to probe differences in ion selectivity. *Int J Mol Sci* **14**: 7660-7680.
- Watson JM, Fusaro AF, Wang M, Waterhouse PM. (2005). RNA silencing platforms in plants.

FEBS Lett **579**: 5982-5987.

- Weese TL, Bohs L. (2007). A three-gene phylogeny of the genus *Solanum* (Solanaceae). *Syst Bot* **32**: 445-463.
- Wegner LH, Sattelmacher B, Läuchli A, Zimmermann U. (1999). Trans-root potential, xylem pressure, and root cortical membrane potential of «low-salt» maize plants as influenced by nitrate and ammonium. *Plant, Cell Environ* **22**: 1549-1558.
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang M, Rouse DT, Liu Q, *et al* . (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* **27**: 581-590.
- Wicke B, Smeets E, Dornburg V, Vashev B, Gaiser T, Wim T, *et al* . (2011). The global technical and economic potential of bioenergy from salt-affected soils. *Energy Environ Sci* **8**: 2669-2681.
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson G V, Provart NJ. (2007). An “electronic fluorescent pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE*. **8**: e718.
- Wu Y, Hu Y, Xu G. (2009). Interactive effects of potassium and sodium on root growth and expression of K⁺/Na⁺ transporter genes in rice. *Plant Growth Regul* **57**: 271-280.
- Xiong A-S, Yao Q-H, Peng R-H, Li X, Han P-L, Fan H-Q. (2005). Different effects on ACC oxidase gene silencing triggered by RNA interference in transgenic tomato. *Plant Cell Rep* **23**: 639-646.
- Xiong L, Zhu J-K. (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ* **25**: 131-139.
- Xu B, Waters S, Byrt CS, Plett D, Tyerman SD, Tester M, *et al* . (2017). Structural variations in wheat HKT1;5 underpin differences in Na⁺transport capacity. *Cell Mol Life Sci*. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2716-5>. pp. 1-12.
- Xue S, Yao X, Luo W, Jha D, Tester M, Horie T, *et al* . (2011). AtHKT1;1 mediates nernstian sodium channel transport properties in *Arabidopsis* root stelar cells. *PLoS ONE* **6**. p. e24725.
- Yamaguchi T, Blumwald E. (2005). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Trends Plant Sci* **10**: 615-620.
- Yang Q, Chen Z-Z, Zhou X-F, Yin H-B, Li X, Xin X-F, *et al* . (2009). Overexpression of SOS (Salt Overly Sensitive) Genes Increases Salt Tolerance in Transgenic *Arabidopsis*. *Mol Plant* **2**: 22-31.
- Yang Y, Guo Y. (2017). Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses. *New Phytol*. **217**: 523-539.
- Yano K, Aoki K, Shibata D. (2007). Genomic databases for tomato. *Plant Biotechnol* **24**: 17-25.
- Yao X, Horie T, Xue S, Leung H-Y, Katsuhara M, Brodsky DE, *et al* . (2010). Differential sodium and potassium transport selectivities of the rice OsHKT2;1 and OsHKT2;2 transporters in plant cells. *Plant Physiol* **152**: 341-55.
- Yeo AR. (2007). Salinity. In: Yeo AR, Flowers TJ (eds). *Plant Solute Transport*. Blackwell Publishing Ltd: Oxford, UK, pp. 340-370.
- Yeo AR, Lee KS, Izard P, Boursier PJ, Flowers TJ. (1991). Short-term and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza-Sativa* L). *J Exp Bot* **42**: 881-889.
- Yeo AR, Yeo ME, Flowers TJ. (1987). The contribution of an apoplastic pathway to sodium uptake by rice roots in saline conditions. *J Exp Bot* **38**: 1141-1153.

VIII. Bibliografía

- Zhang H-X, Blumwald E. (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat Biotechnol* **19**: 765-768.
- Zhang HX, Hodson JN, Williams JP, Blumwald E. (2001). Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 12832-12836.
- Zhang M, Cao Y, Wang Z, Wang Z, Shi J, Liang X, *et al* . (2017a). A retrotransposon in an HKT1 family sodium transporter causes variation of leaf Na⁺ exclusion and salt tolerance in maize. *New Phytol* **217**: 1161-1176.
- Zhang W-D, Wang P, Bao Z, Ma Q, Duan L-J, Bao A-K, *et al* . (2017b). SOS1, HKT1;5, and NHX1 synergistically modulate Na⁺ homeostasis in the halophytic grass *Puccinellia tenuiflora*. *Front Plant Sci* **8**: 1-8.
- Zhao J, NH C, CM M, EB B, Moore M, Gonzales N, *et al* . (2008). AtCHX13 is a plasma membrane K⁺ transporter. *Plant Physiol* **148**: 796-807.
- Zhu JK. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 441-445.
- Zhu JK. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **53**: 247-273.
- Zhu JK. (2000). Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **124**: 941-948.
- Zhu J, Lee B-H, Dellinger M, Cui X, Zhang C, Wu S, *et al* . (2010). A cellulose synthase-like protein is required for osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J* **63**: 128-140.
- Zhu M, Shabala L, Cuin TA, Huang X, Zhou M, Munns R, *et al* . (2015). Nax loci affect SOS1-like Na⁺/H⁺ exchanger expression and activity in wheat. **67**: 835-844.

IX. APÉNDICES

IX. APPENDICES

APÉNDICE 1

Appendix 1. Known *cis*-elements in 5' UTR of *HKT1;1* genomic sequences of *S. lycopersicum* cv. Cerasiforme, NIL157-14 (CC) and NIL157-17 (LL) up to 1300bp upstream of the translation start site. Sequence corresponding to *S. lycopersicum* cv. Heinz 1709 (H) was used as a reference (Soly07g014690.2.1). Frequencies in each NIL/cultivar are indicated. Promoter sequences were searched against PLACE (Higo et al. 1999), PlantCare (Lescot et al. 2002) and NSITE-PL (<http://linux1.softberry.com>) databases and tools.

Regulatory Element	H	NIL1 7	NIL14	Sequence	Function
-10PEHVPSBD	2	2	2	TATTCT	Involved in the expression of the plastid gene <i>psbD</i> which encodes a photosystem II reaction center chlorophyll-binding protein that is activated by blue, white or UV-A light
ABRELATERD1	1	1	1	ACGTG	ABRE-like sequence (from -199 to -195) required for etiolation-induced expression of <i>erd1</i> (early responsive to dehydration) in <i>Arabidopsis</i>
ACGTATERD1	2	2	2	ACGT	ABRE-like sequence for etiolation-induced expression of <i>erd1</i> (early responsive to dehydration) in <i>Arabidopsis</i>
AGMOTIFNTMYB2	1	1	1	AGATCCAA	AG-motif found at -114 of the promoter of <i>NtMyb2</i> gene; <i>NtMyb2</i> is a regulator of the tobacco retrotransposon Tto1 and the defence-related gene phenylalanine ammonia lyase (PAL), which are induced by various stress such as wounding or elicitor treatment; AGP1 (GATA-type zinc finger protein) binding site
ANAERO1CONSENSUS	2	2	2	AAACAAA	Anaerobic genes involved in the fermentative pathway
ARE	1	1	2	TGGTTT	Anaerobic induction
ARR1AT	19	19	19	NGATT	ARR1-binding element" found in <i>Arabidopsis</i> ; ARR1 is a type-B <i>Arabidopsis</i> response regulator involved in cytokinin signaling
ASF1MOTIFCAMV	1	1	1	TGACG	Auxin and/or salicylic acid responsiveness; May be relevant to light regulation
AT1BOX	1	1	1	AATATTTT TATT	Found in the promoter region of the genes for tobacco (<i>N.t.</i>) chlorophyll a/b binding protein (<i>cab</i>) and small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (<i>rbcS</i>); light-regulated genes
ATHB6COREAT	2	2	2	CAATTATT A	Consensus binding sequence for <i>Arabidopsis</i> homeodomain-leucine zipper protein, ATHB6; ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses
BIHD1OS	1	1	1	TGTCA	Binding site of OsBIHD1, a rice BELL homeodomain transcription factor involved in disease resistance responses
BOXIINTPATPB	2	2	2	ATAGAA	Found in the tobacco (<i>N.t.</i>) plastid <i>atpB</i> gene promoter; Conserved in several NCII

					(nonconsensus type II) promoters of plastid genes; Important for the activity of this NCII promoter
BOXLCOREDCPAL	2	2	2	ACCWWCC	Consensus of the putative "core" sequences of box-L-like sequences in carrot PAL1 promoter region; DCMYB1 bound to these sequences <i>in vitro</i>
CAATBOX1	19	19	19	CAAT	Common cis-acting element in promoter and enhancer regions
CACTFTPPCA1	31	32	31	YACT	Key component of Mem1 (mesophyll expression module 1) found in the cis-regulatory element in the distal region of the phosphoenolpyruvate carboxylase (ppcA1) of the C4 dicot <i>F. trinervia</i>
CANBNNAPA	1	1	1	CNAACAC	Core of "(CA)n element" in storage protein genes in <i>Brassica napus</i> ; embryo- and endosperm-specific transcription of napin (storage protein) gene, <i>napA</i> ; seed specificity; activator and repressor
CAREOSREP1	1	1	1	CAACTC	Found in the promoter region of a cysteine proteinase (<i>REP-1</i>) gene in rice
CARGCW8GAT	6	6	6	CWWWWW WWWG	Binding site for AGL15 (AGAMOUS-like 15); W=A/T
CBFHV	1	1	1	RYCGAC	Binding site of barley (<i>H.v.</i>) CBF1, and also of barley CBF2; CBF= C-repeat (CRT) binding factors; CBFs are also known as dehydration-responsive element (DRE) binding proteins (DREBs); R=A/G; Y=C/
CIACADIANLELHC	4	3	4	CAANNNN ATC	Region necessary for circadian expression of tomato <i>Lhc</i> gene
CPBCSPOR	2	2	2	TATTAG	The sequence critical for Cytokinin-enhanced Protein Binding <i>in vitro</i> , found in -490 to -340 of the promoter of the cucumber (CS)POR (NADPH-protochlorophyllide reductase) gene
CURECORECR	6	6	6	GTAC	Core of a CuRE (copper-response element) found in <i>Cyc6</i> and <i>Cpx1</i> genes in <i>Chlamydomonas</i> ; Also involved in oxygen-response of these genes
DOFCOREZM	15	15	15	AAAG	Core site required for binding of Dof proteins in maize Dof proteins are DNA binding proteins, with presumably only one zinc finger, and are unique to plants; Four cDNAs encoding Dof proteins, Dof1, Dof2, Dof3 and PBF, have been isolated from maize; PBF is an endosperm specific Dof protein that binds to prolamin box; Maize Dof1 enhances transcription from the promoters of both cytosolic orthophosphate kinase (CyPPDK) and a non-photosynthetic <i>PEPC</i> gene; Maize Dof2 suppressed the C4PEPC promoter
DPBFCOREDCDC3	1	1	1	ACACNNG	A novel class of bZIP transcription factors, DPBF-1 and 2 (Dc3 promoter-binding factor-1 and 2) binding core sequence; Found in the

Homeostasis de Na⁺/K⁺ en tomate mediante transportadores HKT

					carrot <i>Dc3</i> gene promoter; <i>Dc3</i> expression is normally embryo-specific, and also can be induced by ABA; The <i>Arabidopsis</i> abscisic acid response gene <i>ABI5</i> encodes a bZIP transcription factor; <i>abi5</i> mutant have a pleiotropic defects in ABA response; <i>ABI5</i> regulates a subset of late embryogenesis-abundant genes; <i>GIA1</i> (growth-insensitivity to ABA) is identical to <i>ABI5</i>
EBOXBNNAPA	2	2	2	CANNTG	E-box of <i>napA</i> storage-protein gene of <i>Brassica napus</i> . This sequence is also known as RRE (R response element)
EECCRCAH1	4	4	4	GANTTNC	"EEC"; Consensus motif of the two enhancer elements, EE-1 and EE-2, both found in the promoter region of the <i>Chlamydomonas</i> <i>Cah1</i> (encoding a periplasmic carbonic anhydrase); Binding site of Myb transcription factor LCR1 N=A/G/C/T
GARE-motif	1	1	1	AAACAGA	Gibberellin-responsive element
GATABOX	15	15	15	GATA	Required for high level, light regulated, and tissue specific expression; Conserved in the promoter of all LHCII type I <i>Cab</i> genes
GT1CONSENSUS	16	16	16	GRWAAW	Consensus GT-1 binding site in many light-regulated genes R=A/G; W=A/T
GT1CORE	1	1	1	GGTTAA	Light responsive element
GT1GMSCAM4	3	3	3	GAAAAA	GT-1 motif" found in the promoter of soybean (<i>Glycine max</i>) CaM isoform, SCaM-4; Plays a role in pathogen- and salt-induced SCaM-4 gene expression
GTGANTG10	8	8	8	GTGA	Found in the promoter of the tobacco late pollen gene g10 which shows homology to pectate lyase and is the putative homologue of the tomato gene <i>lat56</i>
HEXMOTIFTAH3H4	1	1	1	ACGTCA	Hexamer motif" found in promoter of wheat histone genes <i>H3</i> and <i>H4</i> ; CaMV35S; NOS; Binding with HBP-1A and HBP-1B; Binding site of wheat (<i>T.a.</i>) nuclear protein HBP-1 (histone DNA binding protein-1); HBP-1 has a leucine zipper motif; "hexamer motif" in type 1 element may play important roles in regulation of replication- dependent but not of replication-independent expression of the wheat histone <i>H3</i> gene; Rice OBF1-homodimer-binding site
HSE	3	3	3	AAAAAATT TC	Heat stress responsiveness
IBOXCORE	7	7	7	GATAA	Conserved sequence upstream of light-regulated genes; Conserved sequence upstream of light-regulated genes of both monocots and dicots
INRNTPSADB	2	2	2	YTCANTYY	Inr (initiator)" elements found in the tobacco <i>psaDb</i> gene promoter without TATA boxes; Light-responsive transcription of <i>psaDb</i> depends on Inr, but not TATA box

VIII. Bibliografía

MARABOX1	1	1	1	AATAAAY AAA	Found in SAR (scaffold attachment region; or matrix attachment region, MAR)
MARTBOX	7	8	7	TTWTWTT WTT	Motif found in SAR (scaffold attachment region; or matrix attachment region, MAR)
MYB1AT	2	2	3	WAACCA	MYB recognition site found in the promoters of the dehydration-responsive gene <i>rd22</i> and many other genes in <i>Arabidopsis</i>
MYB2AT	0	1	1	TAACTG	MYB binding site involved in drought-inducibility
MYB1LEPR	1	1	1	GTTAGTT	Tomato Pti4(ERF) regulates defense-related gene expression via GCC box and non-GCC box cis elements Myb1 (GTTAGTT), G box (CACGTG)
MYB2CONSENSUSAT	1	2	2	YAACKG	MYB recognition site found in the promoters of the dehydration-responsive gene <i>rd22</i> and many other genes in <i>Arabidopsis</i> ; Y=C/T; K=G/T
MYBCORE	1	2	2	CNGTTR	Binding site for all animal MYB and at least two plant MYB proteins ATMYB1 and ATMYB2, both isolated from <i>Arabidopsis</i> ; ATMYB2 is involved in regulation of genes that are responsive to water stress in <i>Arabidopsis</i>
MYBCOREATCYCB1	2	2	2	AACGG	Myb "core" in the 18 bp sequence which is able to activate reporter gene without leading to M-phase-specific expression, found in the promoter of <i>Arabidopsis thaliana</i> cyclin B1:1 gene; the 18 bp sequence share homology with a sequence found in the <i>N. sylvestris</i> cyclin B1 promoter
MYBPLANT	1	1	1	MACCWAM C	Plant MYB binding site; consensus sequence related to box P in promoters of phenylpropanoid biosynthetic genes M=A/C; W=A/T
MYBPZM	2	2	2	CCWACC	Core of consensus maize P (myb homolog) binding site; W=A/T; 6 bp core; Maize P gene specifies red pigmentation of kernel pericarp, cob, and other floral organs; P binds to A1 gene, but not Bz1 gene; Maize C1 (myb homolog) activates both A1 and Bz1 genes
MYBST1	3	3	3	GGATA	Core motif of MybSt1 (a potato MYB homolog) binding site; MybSt1 cDNA clone was isolated by using CaMV 35S promoter domain A as a probe); The Myb motif of the MybSt1 protein is distinct from the plant Myb DNA binding domain described so far
MYCCONSENSUSAT	2	2	2	CANNTG	MYC recognition site found in the promoters of the dehydration-responsive gene <i>rd22</i> and many other genes in DE <i>Arabidopsis</i> ; Binding site of ATMYC2 (previously known as rd22BP1); N=A/T/G/C; MYC recognition sequence in CBF3 promoter; Binding site of ICE1 (inducer of CBF expression 1) that regulates the transcription of CBF/DREB1 genes in the cold in <i>Arabidopsis</i> ; This sequence

Homeostasis de Na⁺/K⁺ en tomate mediante transportadores HKT

					is also known as RRE (R response element)
NODCON1GM	3	2	2	AAAGAT	One of two putative nodulin consensus sequences
NODCON2GM	3	3	3	CTCTT	One of two putative nodulin consensus sequences
NTBBF1ARROLB	2	2	2	ACTTTA	NtBBF1 (Dof protein from tobacco) binding site in <i>Agrobacterium rhizogenes rolB</i> gene; Found in regulatory domain B (-341 to -306); Required for tissue-specific expression and auxin induction
OSE1ROOTNODULE	3	2	2	AAAGAT	One of the consensus sequence motifs of organ-specific elements (OSE) characteristic of the promoters activated in infected cells of root nodules
OSE2ROOTNODULE	3	2	2	CTCTT	One of the consensus sequence motifs of organ-specific elements (OSE) characteristic of the promoters activated in infected cells of root nodules
P1BS	2	2	2	GNATATNC	PHR1-binding sequence found in the upstream regions of phosphate starvation responsive genes from several plant species; <i>phr1</i> (phosphate starvation response 1) gene codes for PHR1 protein related to <i>PSR1</i> gene in <i>C. reinhardtii</i>
PIATGAPB	2	2	2	GTGATCAC	Found in the <i>Arabidopsis thaliana</i> GAPB gene promoter; Located between -157 and -150; Mutations in the "PI" resulted in reductions of light-activated gene transcription; GAPB encodes the B subunit of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) of A.T.
POLASIG3	23	22	24	AATAAT	Plant polyA signal; Consensus sequence for plant polyadenylation signal
POLLEN1LELAT52	10	10	10	AGAAA	One of two co-dependent regulatory elements responsible for pollen specific activation of tomato (L.e.) <i>lat52</i> gene; Also found in the promoter of tomato endo-beta-mannanase gene (<i>LeMAN5</i>) gene
PREATPRODHD	1	1	0	ACTCAT	PRE (Pro- or hypoosmolarity-responsive element) found in the promoter region of proline dehydrogenase (<i>ProDH</i>) gene in <i>Arabidopsis</i> ; Core of 9-bp sequence ACTCATCCT which is necessary for the efficient expression of <i>ProDH</i> in response to L-Pro and hypoosmolarity
PRECONSCRHSP70A	1	0	0	SCGAYNRN NNNNNNN NNNNNNN HD	Consensus sequence of PRE (plastid response element) in the promoters of HSP70A in <i>Chlamydomonas</i> ; Involved in induction of HSP70A gene by both MgProto and light
PYRIMIDINEBOXOSR AMY1	1	1	1	CCTTTT	Pyrimidine box found in rice alpha-amylase (<i>RAmy1A</i>) gene; Gibberellin-respons cis-element of GARE and pyrimidine box are partially involved in sugar repression; Found in the promoter of barley alpha-amylase

VIII. Bibliografía

					(<i>Amy2/32b</i>) gene which is induced in the aleurone layers in response to GA; BPBF protein binds specifically to this site
QELEMENTZMZM13	1	1	1	AGGTCA	"Q(quantitative)-element" in maize <i>ZM13</i> gene promoter; Found at -107 to -102; Involved in expression enhancing activity; <i>ZM13</i> is a maize homolog of tomato <i>LAT52</i> gene; <i>ZM13</i> is a pollen-specific maize gene
RAV1AAT	5	5	5	CAACA	Binding consensus sequence of <i>Arabidopsis</i> transcription factor, RAV1; RAV1 specifically binds to DNA with bipartite sequence motifs of RAV1-A (CAACA) and RAV1-B (CACCTG); RAV1 protein contain AP2-like and B3-like domains; The AP2-like and B3-like domains recognize the CAACA and CACCTG motifs, respectively
REALPHALGLHCB21	1	1	1	AACCAA	Found in <i>Lemna gibba</i> <i>Lhcb21</i> gene promoter; Located at -134 to -129; Binding site of proteins of whole-cell extracts; The DNA binding activity is high in etiolated plants but much lower in green plants; Required for phytochrome regulation
REBETALGLHCB21	1	1	1	CGGATA	Found in <i>Lemna gibba</i> <i>Lhcb21</i> gene promoter; Located at -114 to -109; A GATA sequence created at a position six nucleotides upstream could replace the function of REbeta; DE Required for phytochrome regulation
RHERPATEXPA7	1	1	1	KCACGW	Right part of RHEs (Root Hair-specific cis-Elements)" conserved among the <i>Arabidopsis thaliana</i> A7 (<i>AtEXPA7</i>) orthologous (and paralogous) genes from diverse angiosperm species with different hair distribution patterns; K=G/T; W=T/A
ROOTMOTIFTAPOX1	18	18	18	ATATT	Motif found both in promoters of rold
S1FBOXSORPS1L21	3	3	3	ATGGTA	S1F box conserved both in spinach <i>RPS1</i> and <i>RPL21</i> genes encoding the plastid ribosomal protein S1 and L21, respectively; negative element; might play a role in down-regulating <i>RPS1</i> and <i>RPL21</i> promoter activity
SEF4MOTIFGM7S	6	6	6	RTTTTTR	SEF4 binding site; Soybean (<i>G.m.</i>) consensus sequence found in 5' upstream region (-199) of beta-conglycinin (7S globulin) gene (<i>Gmg17.1</i>); Binding with SEF4 (soybean embryo factor 4)
SORLREP3AT	1	1	0	TGTATATA T	Sequences Over-Represented in Light-Repressed Promoters (SORLREPs) in <i>Arabidopsis</i> ; Computationally identified phyA-repressed motifs
SP8BFIBSP8BIB	1	1	1	TACTATT	One of SPBF binding site (SP8b); Found at -330, -220, and -200 of gSPO-B1 (sporamin) gene, and also at -80 of gB-Amy (beta-amylase) gene; SP8BF recognizes both SP8a and SP8b sequences; "SP8b" found in the 5' upstream region of three different genes coding for sporamin and beta-amylase; Binding site of SPF1

Homeostasis de Na⁺/K⁺ en tomate mediante transportadores HKT

SREATMSD	2	2	2	TTATCC	Sugar-repressive element (SRE)" found in 272 of the 1592 down-regulated genes after main stem decapitation in Arabidopsis
TAAAGSTKST1	4	4	4	TAAAG	TAAAG motif found in promoter of <i>Solanum tuberosum KST1</i> gene; Target site for trans-acting StDof1 protein controlling guard cell-specific gene expression; <i>KST1</i> gene encodes a K ⁺ influx channel of guard cells
TATABOX	16	15	17	TATTAAT/ TATATAA/ TTATTT/	TATA box, sequence and spacing of TATA box elements are critical for accurate initiation
TATABOXOSPAL	2	2	2	TATTTAA	Binding site for OsTBP2, found in the promoter of rice pal gene encoding phenylalanine ammonia-lyase; OsTFIIB stimulated the DNA binding and bending activities of OsTBP2 and synergistically enhanced OsTBP2-mediated transcription from the pal promoter
TATAPVTRNALEU	1	1	1	TTTATATA	TATA-like motif"; A TATA-like sequence found in Phaseolus vulgaris tRNA ^{Leu} gene promoter; Frequently observed upstream of plant tRNA genes; Found in maize glycolytic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 4 (GapC4) gene promoter; Binding site of TATA binding protein (TBP)
TATCCACHVAL21	1	1	1	TATCCAC	TATCCAC box" is a part of the conserved cis-acting response complex (GARC) that most often contain three sequence motifs, the TAACAAA box, or GA-responsive element (GARE); the pyrimidine box, CCTTTT; and the TATCCAC box, which are necessary for a full GA response
TATCCAOSAMY	1	1	1	TATCCA	Found in alpha-amylase promoters of rice at positions ca.90 to 150bp upstream of the transcription start sites; Binding sites of OsMYBS1, OsMYBS2 and OsMYBS3 which mediate sugar and hormone regulation of alpha-amylase gene expression
TATCCAYMOTIFOSRAMY3D	1	1	1	TATCCAY	Found in rice RAmY3D alpha-amylase gene promoter; Y=T/C; a GATA motif as its antisense sequence; TATCCAY motif and G motif (see S000130) are responsible for sugar repression
TBOXATGAPB	1	1	1	ACTTTG	Found in the <i>Arabidopsis thaliana</i> GAPB gene promoter; Located between -94 and -89 (T1) and also between -84 and -79 (T2); Mutations in the "Tbox" resulted in reductions of light-activated gene transcription; GAPB encodes the B subunit of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GADPH) of <i>A.t.</i> ;
TCA-element	0	0	1	CCATCTTT TT	Cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness
TGACGTVMAMY	1	1	1	TGACGT	TGACGT motif" found in the <i>Vigna mungo</i> alpha-Amylase(Amy) gene promoter; Located between -128 and -123; Required for high level expression of alpha-Amylase in the

VIII. Bibliografía

					cotyledons of the germinated seeds
WBOXATNPR1	2	2	2	TTGAC	W-box" found in promoter of <i>Arabidopsis thaliana</i> NPR1 gene; Located between +70 and +79 in tandem; They were recognized specifically by salicylic acid (SA)-induced WRKY DNA binding proteins; cluster of WRKY binding sites act as negative regulatory elements for the inducible expression of AtWRKY18
WBOXHVIS01	2	2	2	TGACT	SUSIBA2 bind to W-box element in barley iso1 (encoding isoamylase1) promoter
WBOXNTERF3	3	3	3	TGACY	W box" found in the promoter region of a transcriptional repressor ERF3 gene in tobacco; May be involved in activation of ERF3 gene by wounding; Y=C/T
WRKY71OS	5	5	5	TGAC	A core of TGAC-containing W-box" of, e.g., Amy32b promoter; Binding site of rice WRKY71, a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway; Parsley WRKY proteins bind specifically to TGAC-containing W box elements within the Pathogenesis-Related Class10 (PR-10) genes
WUSATAg	2	2	2	TTAATGG	Target sequence of WUS in the intron of AGAMOUS gene in <i>Arabidopsis</i>

APÉNDICE 2

Appendix 2. Known *cis*-elements in tomato HKT1;2 promoter regions up to 814 bp upstream of the translation start site. Legend as in Table S4.

Regulatory Element	H	NIL1 7	NIL1 4	Sequence	Function
-10PEHVPSBD	2	2	2	TATTCT	Involved in the expression of the plastid gene <i>psbD</i> which encodes a photosystem II reaction center chlorophyll-binding protein that is activated by blue, white or UV-A light
AACACOREOSGLUB	1	1	1	AACAAAC	Core of AACA motifs found in rice glutelin genes, involved in controlling the endosperm-specific expression; AACA is also closely associated with the GCN4 motif in all rice glutelin genes and together have been shown to confer endosperm-specific enhancement to the truncated -90 CaMV 35S promoter
ABRELATERD1	1	1	1	ACGTG	ABRE-like sequence (from -199 to -195) required for etiolation-induced expression of <i>erd1</i> (early responsive to dehydration) in <i>Arabidopsis</i>
ABRERATCAL	1	1	1	MACGYGB	ABRE-related sequence" or "Repeated sequence motifs" identified in the upstream regions of 162 Ca ²⁺ -responsive upregulated genes; M=C/A; Y=T/C; B=T/C/G
ACGTABOX	4	4	4	TACGTA	Found in <i>ocs</i> gene; RITA-1 binding site "G motif" G motif and TATCCAY motif (a GATA motif as its antisense sequence); are responsible for sugar repression
ACGTATERD1	6	6	6	ACGT	Etiolation-induced expression of <i>erd1</i> (early responsive to dehydration) in <i>Arabidopsis</i>
AMYBOX1	1	1	1	TAACARA	"Amylase box"; Conserved sequence found in 5'-upstream region of alpha-amylase gene of rice, wheat, barley
ANAERO1CONSENS	1	1	1	AAACAAA	One of 16 motifs found in silico in promoters of 13 anaerobic genes involved in the fermentative pathway (anaerobic set 1)
ARFAT	1	1	1	TGTCTC	ARF (auxin response factor) binding site found in the promoters of primary/early auxin response genes of <i>Arabidopsis thaliana</i> AuxRE; Binding site of <i>Arabidopsis</i> ARF1 (Auxin response factor1); Sequence found in NDE element in Soybean SAUR (Small Auxin-Up RNA) 15A gene promoter; Found in D1 or D4 element in Soybean GH3promoter; This element was enriched in the 5'-flanking region of genes up-regulated by both IAA and BL
ARR1AT	13	13	12	NGATT	ARR1-binding element" found in <i>Arabidopsis</i> ; ARR1 is a type-B <i>Arabidopsis</i> response regulator involved in cytokinin signalling
BIHD1OS	1	1	1	TGTCA	Binding site of OsBIHD1, a rice BELL homeodomain transcription factor involved

VIII. Bibliografía

					in disease resistance responses
BOXIINTPATPB	1	1	1	ATAGAA	Box II" found in the tobacco plastid atpB gene promoter; Conserved in several NCII (nonconsensus type II) promoters of DE plastid genes; Important for the activity of this NCII promoter
CAATBOX1	7	7	8	CAAT	Common cis-acting element in promoter and enhancer regions
CACTFTPPCA1	18	18	17	YACT	Key component of Mem1 (mesophyll expression module 1) found in the cis-regulatory element in the distal region of the phosphoenolpyruvate carboxylase (ppcA1) of the C4 dicot <i>F. trinervia</i>
CARGCW8GAT	6	6	6	CWWWWW WWWG	A variant of CArG motif with a longer A/T-rich core; Binding site for AGL15 (AGAMOUS-like 15); W=A/T
CATATGGMSAUR	4	4	4	CATATG	Sequence found in NDE element in soybean SAUR (Small Auxin-Up RNA) 15A gene promoter; Involved in auxin responsiveness
CCA1ATLHCB1	1	1	1	AAMAATCT	CCA1 binding site; CCA1 protein (myb-related transcription factor) interact with two imperfect repeats of AAMAATCT in Lhcb1*3 gene of <i>Arabidopsis thaliana</i> ; Related to regulation by phytochrome;
CCAATBOX1	2	2	2	CCAAT	Common sequence found in the 5'-non-coding regions of eukaryotic genes; "CCAAT box" found in the promoter of heat shock protein genes; Located immediately upstream from the most distal HSE of the promoter; "CCAAT box" act cooperatively with HSEs to increase the hs promoter activity;
CURECORECR	6	6	6	GTAC	Core of a CuRE (copper-response element) found in Cyc6 and Cpx1 genes in <i>Chlamydomonas</i> ; Also involved in oxygen-response of these genes
DOFCOREZM	8	8	8	AAAG	Core site required for binding of Dof proteins in maize Dof proteins are DNA binding proteins, with presumably only one zinc finger, and are unique to plants; Four cDNAs encoding Dof proteins, Dof1, Dof2, Dof3 and PBF, have been isolated from maize; PBF is an endosperm specific Dof protein that binds to prolamin box; Maize Dof1 enhances transcription from the promoters of both cytosolic orthophosphate kinase (CyPPDK) and a non-photosynthetic PEPC gene; Maize Dof2 suppressed the C4PEPC promote
EBOXBNNAPA	8	8	8	CANNTG	E-box of napA storage-protein gene of <i>Brassica napus</i> . This sequence is also known as RRE (R response element)
EECCRCAH1	1	1	1	GANTTNC	Consensus motif of the two enhancer elements, EE-1 and EE-2, both found in the promoter region of the <i>Chlamydomonas</i> Cah1 (encoding a periplasmic carbonic

Homeostasis de Na⁺/K⁺ en tomate mediante transportadores HKT

					anhydrase); Binding site of Myb transcription factor LCR1; N=A/G/C/T
ELRECOREPCRPI	1	1	1	TTGACC	EIRE (Elicitor Responsive Element) core of parsley PR1 genes; consensus sequence of elements W1 and W2 of parsley PR1-1 and PR1-2 promoters; Box W1 and W2 are the binding site of WRKY1 and WRKY2, respectively; ERE; "WA box"; One of the W boxes found in the Parsley WRKY1 gene promoter; Required for elicitor responsiveness; "WC box" WB box and WC box constitute a palindrome; WRKY1 protein binding site; W-box found in thioredoxin h5 gene in Arabidopsis
GAREAT	1	1	1	TAACAAR	GA-responsiveness
GATABOX	6	6	6	GATA	Required for high level, light regulated, and tissue specific expression; Conserved in the promoter of all LHCII type I Cab genes
GT1CONSENSUS	8	8	8	GRWAAW	Consensus GT-1 binding site in many light-regulated genes R=A/G; W=A/T
GT1GMSCAM4	3	3	3	GAAAAA	Consensus GT-1 binding site in many light-regulated genes, Binding of GT-1-like factors to the PR-1a promoter influences the level of SA-inducible gene expression
GTGANTG10	9	9	8	GTGA	Found in the promoter of the tobacco late pollen gene g10 which shows homology to pectate lyase and is the putative homologue of the tomato gene lat56
HSE	1	1	2	AAAAAATT TC	Heat stress responsiveness
IBOX	1	1	1	GATAAG	Conserved sequence upstream of light-regulated genes; Sequence found in the promoter region of rbcS of tomato and Arabidopsis; Binding site of LeMYB1, that is a member of a novel class of myb-like proteins; LeMYBI act as a transcriptional activator
IBOXCORE	3	3	3	GATAA	Conserved sequence upstream of light-regulated genes; Conserved sequence upstream of light-regulated genes of both monocots and dicots
IBOXCORENT	1	1	1	GATAAGR	"I-box core motif" in the CAMs (conserved DNA modular arrays) associated with light-responsive promoter regions
INRNTPSADB	3	3	3	YTCANTYY	"Inr (initiator)" elements found in the tobacco psaDb gene promoter without TATA boxes; Light-responsive transcription of psaDb depends on Inr, but not TATA box
MYBGAHV	1	1	1	TAACAAA	Central element of gibberellin (GA) response complex (GARC) in high-pI alpha-amylase gene in barley; Similar to c-myb and v-myb consensus binding site; GAmYb binds specifically to the TAACAAA box <i>in vitro</i> ; GAmYb is the sole

VIII. Bibliografía

					GA-regulated transcriptional factor required for transcriptional activation of the high-pI alpha-amylase; GARC consist of the pyrimidine, TAACAAA and TATCCAC boxes; GARE in RAmY1A gene; GARE and pyrimidine box in RAmY1A are partially involved in sugar repression
MYCATERD1	1	1	1	CATGTG	MYC recognition sequence (from -466 to -461) necessary for expression of <i>erd1</i> (early responsive to dehydration) in dehydrated Arabidopsis; NAC protein bound specifically to the CATGTG motif; NAC protein bound specifically to the CATGTG motif
MYCATRD22	1	1	1	CACATG	Binding site for MYC (rd22BP1) in Arabidopsis dehydration-responsive gene, <i>rd22</i> ; MYC binding site in <i>rd22</i> gene of Arabidopsis thaliana; ABA-induction; Located at ca. -200 of <i>rd22</i> gene
MYCCONSENSUSAT	8	8	8	CANNTG	MYC recognition site found in the promoters of the dehydration-responsive gene <i>rd22</i> and many other genes in Arabidopsis; Binding site of ATMYC2 (previously known as <i>rd22BP1</i>); N=A/T/G/C; MYC recognition sequence in CBF3 promoter; Binding site of ICE1 (inducer of CBF expression 1) that regulates the transcription of CBF/DREB1 genes in the cold in Arabidopsis; This sequence is also known as RRE (R response element)
NODCON2GM	3	3	3	CTCTT	One of two putative nodulin consensus sequences
NTBBF1ARROLB	1	1	1	ACTTTA	NtBBF1(Dof protein from tobacco) binding site in Agrobacterium rhizogenes <i>rolB</i> gene; Found in regulatory domain B (-341 to -306); Required for tissue-specific expression and auxin induction
OSE2ROOTNODULE	1	1	1	CTCTT	One of the consensus sequence motifs of organ-specific elements(OSE) characteristic of the promoters activated in infected cells of root nodules
P1BS	2	2	2	GNATATNC	PHR1-binding sequence found in the upstream regions of phosphate starvation responsive genes from several plant species; <i>phr1</i> (phosphate starvation response 1) gene codes for PHR1 protein related to PSR1 gene in <i>C. reinhardtii</i>
POLASIG3	9	9	9	AATAAT	Plant polyA signal; Consensus sequence for plant polyadenylation signal
POLLEN1LELAT52	1	1	1	AGAAA	One of two co-dependent regulatory elements responsible for pollen specific activation of tomato (L.e.) <i>lat52</i> gene; Also found in the promoter of tomato endo-beta-mannanase gene (LeMAN5) gene
PREATPRODH	1	1	1	ACTCAT	PRE (Pro- or hypoosmolarity-responsive element) found in the promoter region of proline dehydrogenase (ProDH) gene in

Homeostasis de Na⁺/K⁺ en tomate mediante transportadores HKT

					Arabidopsis; Core of 9-bp sequence ACTCATCCT which is necessary for the efficient expression of ProDH in response to L-Pro and hypoosmolarity
PRECONSCRHSP70A	1	1	2	SCGAYNRN NNNNNNN NNNNNNN HD	Consensus sequence of PRE (plastid response element) in the promoters of HSP70A in Chlamydomonas; Involved in induction of HSP70A gene by both MgProto and light
PYRIMIDINEBOXOS	2	2	2	CCTTTT	Pyrimidine box found in rice alpha-amylase (RAmy1A) gene; Gibberellin-response cis-element of GARE and pyrimidine box are partially involved in sugar repression; Found in the promoter of barley alpha-amylase (Amy2/32b) gene which is induced in the aleurone layers in response to GA; BPBF protein binds specifically to this site
QARBNEXTA	1	1	1	AACGTGT	QAR (quantitative activator region)" in promoter region of Brassica napus extA extensin gene
RAV1AAT	6	6	6	CAACA	Binding consensus sequence of Arabidopsis transcription factor, RAV1; RAV1 specifically binds to DNA with bipartite sequence motifs of RAV1-A (CAACA) and RAV1-B (CACCTG); RAV1 protein contain AP2-like and B3-like domains; The AP2-like and B3-like domains recognize the CAACA and CACCTG motifs, respectively
ROOTMOTIFTAPOX1	6	6	6	ATATT	Motif found both in promoters of rolD
S1FBOXSORPS1L21	2	2	2	ATGGTA	S1F box conserved both in spinach RPS1 and RPL21 genes encoding the plastid ribosomal protein S1 and L21, respectively; Negative element; Might play a role in down-regulating RPS1 and RPL21 promoter activity
SEBFCONSSTPR10A	1	1	1	YTGTCWC	Binding site of the potato silencing element binding factor (SEBF) gene found in promoter of pathogenesis-related gene (PR-10a); Located between -45 and -39; Similar to the auxin response element; W=A/T
SEF4MOTIFGM7S	2	2	2	RTTTTTR	SEF4 binding site; Soybean (G.m.) consensus sequence found in 5'upstream region (-199) of beta-conglycinin (7S globulin) gene (Gmg17.1); Binding with SEF4 (soybean embryo factor 4)
SORLIP1AT	1	1	1	GCCAC	One of Sequences Over-Represented in Light-Repressed Promoters(SORLREPs)in Arabidopsis; Computationally identified phyA-repressed motifs
SORLIP5AT	1	1	1	GAGTGAG	One of "Sequences Over-Represented in Light-Induced Promoters (SORLIPs) in Arabidopsis; Computationally identified phyA-induced motifs; Over-represented in both light-induced cotyledon-specific and root-specific genes
SURECOREATSULTR	1	1	1	GAGAC	Sulfur-responsive element (SURE) found in the promoter of SULTR1;1 high-affinity

VIII. Bibliografía

					sulfate transporter gene in Arabidopsis
SV40COREENHAN	1	1	1	GTGGWWH G	SV40 core enhancer; W=A/T
T/GBOXATPIN2	1	1	1	AACGTG	"T/G-box" found in tomato proteinase inhibitor II (pin2) and leucine aminopeptidase (LAP) genes; Involved in jasmonate (JA)induction of these genes; bHLH-Leu zipper JAMYC2 and JAMYC10 proteins specifically recognize this motif
TAAAGSTKST1	2	2	2	TAAAG	TAAAG motif found in promoter of Solanum tuberosum KST1 gene; Target site for trans-acting StDof1 protein controlling guard cell-specific gene expression; KST1 gene encodes a K ⁺ influx channel of guard cells
TATABOX	6	6	6	TATAAAT/ TTATTT	TATA box, sequence and spacing of TATA box elements are critical for accurate initiation
TBOXATGAPB	1	1	1	ACTTGT	Found in the Arabidopsis thaliana GAPB gene promoter; Located between -94 and -89 (T1) and also between -84 and -79 (T2); Mutations in the "Tbox" resulted in reductions of light-activated gene transcription; GAPB encodes the B subunit of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GADPH) of A.T.
WBBOXPCWRKY1	1	1	1	TTTGACY	"WB box"; WRKY proteins bind specifically to the DNA sequence DE motif (T)(T)TGAC(C/T), which is known as the W box; Found in amylase gene in sweet potato, alpha-Amy2 genes in wheat, barley, and wild oat, PR1 gene in parsley, and a transcription factor gene in Arabidopsis; Y=C/T
WBOXATNPR1	2	2	2	TTGAC	W-box" found in promoter of Arabidopsis thaliana NPR1 gene; Located between +70 and +79 in tandem; They were recognized specifically by salicylic acid (SA)-induced WRKY DNA binding proteins; cluster of WRKY binding sites act as negative regulatory elements for the inducible expression of AtWRKY18
WBOXNTERF3	2	2	2	TGACY	W box" found in the promoter region of a transcriptional repressor ERF3 gene in tobacco; May be involved in activation of ERF3 gene by wounding; Y=C/T
WRKY71OS	3	3	3	TGAC	A core of TGAC-containing W-box" of, e.g., Amy32b promoter;Binding site of rice WRKY71, a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway; Parsley WRKY proteins bind specifically to TGAC-containing W box elements within the Pathogenesis-Related Class10 (PR-10) genes
WUSATAg	1	1	1	TTAATGG	Target sequence of WUS in the intron of AGAMOUS gene in Arabidopsis