



**UCAM**

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO  
Programa de Doctorado Ciencias de la Salud

Aspectos agronómicos y fisiológicos asociados a la  
tolerancia a la combinación de estreses abióticos en  
plantas de tomate

Autor:

María García Martí

Directores:

Dr. D. Vicente Martínez López

Dra. Dña. Rosa María Rivero Vargas

Dr. D. Antonio Cerdá Cerdá

Murcia, 30 enero de 2020





**UCAM**

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO  
Programa de Doctorado Ciencias de la Salud

Aspectos agronómicos y fisiológicos asociados a la  
tolerancia a la combinación de estreses abióticos en  
plantas de tomate

Autor:

María García Martí

Directores:

Dr. D. Vicente Martínez López

Dra. Dña. Rosa María Rivero Vargas

Dr. D. Antonio Cerdá Cerdá

Murcia, 30 enero de 2020





# UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

## AUTORIZACIÓN DE LO/S DIRECTOR/ES DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. D. Vicente Martínez López, la el Dra. Dña. Rosa María Rivero Vargas y el Dr. D. Antonio Cerdá Cerdá, como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Aspectos agronómicos y fisiológicos asociados a la tolerancia a la combinación de estreses abióticos en plantas de tomate” realizada por D. María García Martí en el Departamento de Nutrición Vegetal del CEBAS-CSIC, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al Real Decreto 99/2011, 1393/2007, 56/2005 Y 778/98, en Murcia a 30 de enero de 2020



Parte de los resultados expuestos en esta memoria de Tesis Doctoral han sido publicados en la siguiente revista internacional:

**García-Martí, M., Piñero, M. C., García-Sánchez, F., Mestre, T. C., López-Delacalle, M., Martínez, V., & Rivero, R. M. (2019).** Amelioration of the oxidative stress generated by simple or combined abiotic stress through the K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> supplementation in tomato plants. *Antioxidants*, 8(4), 81.





## RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

Las pérdidas económicas generadas en la agricultura debido a los estreses abióticos están estimadas entre 14-19 mil millones de euros anuales. Las predicciones actuales referentes al cambio climático indican un incremento en las temperaturas y una importante reducción de la calidad de las aguas de riego, que, junto con las estimaciones en el incremento de la población mundial, hacen urgente la necesidad de buscar alternativas en la generación de cultivos con una mayor tolerancia a los distintos estreses abióticos.

Para afrontar esta situación, se realizó un estudio en plantas de tomate de una variedad comercial para comprobar si una suplementación de la nutrición rica en  $K^+/Ca^{2+}$  podía conferirle a la planta protección frente a la combinación de los estreses abióticos de salinidad y temperatura. Los resultados mostraron que la aplicación de estos nutrientes, utilizados en concentraciones más altas de las recomendadas, ayudaron a controlar el daño oxidativo a través de la regulación transcripcional de las principales enzimas implicadas en la desintoxicación de ROS y la recuperación de la peroxidación de los lípidos de membrana, lo que se tradujo en un mejor rendimiento del aparato fotosintético y una mejor tasa de crecimiento.

Posteriormente, se estudió el efecto de los estreses combinados en una población de RILs (*Recombinant inbred lines*) obtenidas mediante el cruzamiento de una línea silvestre (*S. pimpinellifolium* L.), tolerante a condiciones abióticas extremas, y una línea comercial (*S. lycopersicum* L.), ya que estas plantas son una herramienta muy útil para el análisis de rasgos cualitativos de una especie. Una población inicial de 84 RILs distintas fue sometida a los estreses combinados de salinidad y temperatura para determinar el rango de tolerancia al estrés de cada una de ellas. La combinación de los estreses de salinidad y alta temperatura redujo el peso fresco de todas las líneas RILs estudiadas. No obstante, esa disminución de biomasa fue diferente en cada línea, por lo que es posible que algunas hubieran heredado características del parental silvestre *S. pimpinellifolium* L y otras, de la variedad comercial *S. lycopersicum* L. En base a los resultados obtenidos, se seleccionaron 5 líneas RILS que diferían en su rango de tolerancia a la combinación de estreses para la consecución del siguiente experimento.

Al estudiar las 5 líneas seleccionadas, se comprobó que el comportamiento de las RILs era reproducible, y que las líneas seleccionadas como más tolerantes

seguían teniendo una mejor respuesta al estrés combinado que las líneas que habían sido seleccionadas con menor rango de tolerancia. Por otro lado, se determinó que una mejor respuesta adaptativa de las plantas se correspondía con una alta relación  $K^+/Na^+$  tanto en las hojas como en la raíz, y que esta relación entre los componentes iónicos, estaba también relacionada con el potencial osmótico de la planta y el potencial de turgencia. Además, un aumento del peso seco de las plantas se relacionó con un aumento de la fluorescencia de las clorofilas y de la tasa fotosintética. En base a los resultados obtenidos, las dos líneas seleccionadas para el siguiente experimento fueron la línea RIL-76, definida como la línea más tolerante, y la línea RIL-18, definida como la línea más sensible.

Finalmente, se realizó un experimento agronómico para determinar el comportamiento de las líneas en condiciones de campo reales. Los resultados mostraron que la línea RIL-76 fue más tolerante que la RIL-18, ya que, ante el efecto de los estreses abióticos combinados a distintos niveles de salinidad y alta temperatura, un mayor número de plantas sobrevivió hasta el final del experimento. En cuanto al estado nutricional de las plantas en distintos estados de desarrollo, se comprobó que la homeostasis de determinados iones jugaba un papel fundamental en la respuesta adaptativa de las plantas a la combinación de estreses. En cambio, los resultados agronómicos del experimento no fueron los esperados, puesto que no se consiguieron unos datos de producción y de calidad del fruto dentro de los estándares actuales de mercado en ninguna de las RILs seleccionadas, por lo que se llegó a la conclusión final de que es probable que en la hibridación de las RILs seleccionadas, éstas hayan heredado las características agronómicas del parental silvestre *S. pimpinellifolium* L y no las características propias de la variedad *S. lycopersicum* L.

Estos ensayos demuestran que el estudio de los estreses abióticos debe centrarse en las combinaciones de estrés más relevantes para una región en particular, lo que permitirá a las plantas cultivadas en dichas zonas producir el mayor rendimiento posible mientras completa su ciclo de cultivo.

**Palabras clave:** Estrés, abiótico, salinidad, alta temperatura, tomate, RILs.

## ABSTRACT AND KEYWORDS

The annual economic losses generated in agriculture due to the different abiotic stresses are estimated to be between 14-19 billion euros. Current predictions regarding climate change indicate the increase in temperatures and the significant reduction in the quality of irrigation water, which, together with estimates of the increase in world population, make urgent the finding of alternatives in the creation new of crops with a greater tolerance to different abiotic stresses.

Firstly, a study was carried out on tomato plants of a commercial variety. The aim of this study was to investigate if an increase in potassium ( $K^+$ ) and calcium ( $Ca^{2+}$ ) concentration in the nutrient solution could have a positive effect on the amelioration of oxidative stress that occurs under the combination of salinity and heat in tomato plants. The results showed that the application of these nutrients, in higher concentrations than normally recommended, helped to control oxidative damage through the transcriptional regulation of the main enzymes involved in ROS detoxification and the recovery of lipid peroxidation of membrane lipids, which resulted in better photosynthetic apparatus performance and a better growth rate.

Subsequently, the effect of combined stresses in a population of RILs (*Recombinant inbred lines*) obtained by crossing a wild line (*S. pimpinellifolium* L.) and a commercial line (*S. lycopersicum* L.) was studied. These plants are a very useful tool for the analysis of qualitative traits of a species due to their genetic characteristics. An initial population of 84 different RILs was subjected to combined salinity and temperature stresses to determine their range of tolerance. The combination of salinity and high temperature stresses reduced the fresh weight of all the RILs studied. However, this decrease in biomass was different for each line, so that it is highly likely that some had inherited characteristics of the wild parental *S. pimpinellifolium* L., others had inherited them from the commercial variety *S. lycopersicum* L. Based on the results obtained, 5 RILS lines that differed in their tolerance range to the combination of stresses were selected for undertaking the experiment described below.

When studying the 5 selected lines, it was found that the behavior of the RILs was reproducible, and that the lines selected as more tolerant continued to have a better response to combined stress than the lines that had been selected with a

lower tolerance range. On the other hand, it was determined that a better adaptive response of the plants correlated with a high  $K^+/Na^+$  ratio in both the leaves and the root, and that this relationship between the ionic components decreased the osmotic potential of the plant and increased the potential of turgidity. In addition, an increase in the dry weight of the plants was correlated with an increase in the fluorescence of the chlorophylls and, consequently, in the photosynthetic rate of the plants. Based on the results obtained, the two lines selected for the following experiment were the RIL-76 line, defined as the most tolerant line, and the RIL-18 line, defined as the most sensitive line.

Lastly, an agronomic experiment was performed to determine the behavior of the lines in real field conditions. The results showed that the RIL-76 line was more tolerant than RIL-18, as a greater number of plants survived until the end of the experiment, given the effect of combined abiotic stresses at different levels of salinity and high temperature. Regarding the nutritional status of plants in different stages of development, it was found that homeostasis of certain ions played a fundamental role in the adaptive response of plants to the combination of stresses. On the other hand, the agronomic results of the experiment were not as expected, as production and fruit quality data were not within the current market standards in any of the RILs selected. Thus, the final conclusion reached was that it is probable that in the hybridization of the selected RILs, these have inherited the agronomic characteristics of the wild parental *S. pimpinellifolium* L and not the characteristics of the commercial *S. lycopersicum* L. variety.

These trials demonstrate that the study of abiotic stresses should focus on the most relevant stress combinations for a particular region; this will allow plants grown in these areas to produce the highest possible yield while completing their normal cultivation cycle.

**Keywords:** Stress, abiotic, salinity, high temperature, tomato, RILs.

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis del CEBAS-CSIC, Dr. Vicente Martínez López y Dra. Rosa M. Rivero Vargas, y, también, a mi director de Tesis de la UCAM Dr. Antonio Cerdá Cerdá por su supervisión, dirección y apoyo durante estos años.

También hacer extensa mi gratitud a los doctores Paco Rubio, Paco García y Teresa Mestre por haber estado siempre dispuestos a ofrecerme su ayuda y colaboración.

A mis compañeros de trabajo del CEBAS-CSIC, por los buenos ratos que pasamos tanto en la finca experimental como en el laboratorio.

A mis amigos, con los que he compartido momentos de desconexión, especialmente estos últimos meses.

Y, sobre todo, gracias a mi familia por todo su apoyo.



"La agricultura es la profesión del sabio, la más adecuada al sencillo y la ocupación más digna para todo hombre libre".  
Marco Tulio Cicerón (106-43 a.C.)





## ÍNDICE GENERAL

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>39</b>
1.1.	El cultivo del tomate .....	39
1.2.	Descripción botánica del tomate .....	43
1.3.	Valor nutricional del tomate .....	45
1.4.	Domesticación del tomate .....	46
1.4.1.	Variedad <i>Solanum pimpinellifolium</i> .....	48
1.4.2.	Líneas isogénicas recombinantes ( <i>Recombinant inbred lines, RILs</i> ) ....	49
1.5.	Estrés abiótico .....	50
1.5.1.	Salinidad.....	50
1.5.2.	Alta temperatura .....	54
1.5.3.	Combinación de estreses.....	55
1.6.	Respuesta fisiológica.....	57
1.6.1.	Nutrición .....	57
1.6.2.	Homeostasis redox y estrés oxidativo.....	58
1.6.3.	Sistema antioxidante.....	63
1.7.	Respuesta agronómica.....	65
1.7.1.	Calidad del fruto .....	65
<b>II.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>69</b>
<b>III.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>73</b>
3.1.	Objetivo principal.....	73
3.2.	Objetivos específicos .....	73
<b>IV.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>77</b>
4.1.	Material vegetal .....	77
4.2.	Material vegetal .....	77

4.2.1.	Descripción de los invernaderos.....	77
4.2.2.	Descripción de las cámaras de cultivo .....	78
4.3.	Solución nutritiva .....	79
4.4.	Experimentos .....	81
4.4.1.	Experimento 1: Optimización de la nutrición para aumentar la tolerancia a la combinación de estreses abióticos.....	81
4.4.2.	Experimento 2: Selección de líneas recombinantes de tomate con diferente tolerancia a la combinación de salinidad y alta temperatura	84
4.4.3.	Experimento 3: Respuesta fisiológica de 5 líneas recombinantes seleccionadas con diferente tolerancia a la combinación de estreses abióticos.....	87
4.4.4.	Experimento 4: Respuesta agronómica de líneas de tomate con diferente tolerancia a la combinación de estreses.....	89
4.5.	Determinaciones.....	91
4.5.1.	Parámetros biométricos.....	91
4.5.2.	Análisis nutricional.....	91
4.5.3.	Relaciones hídricas en las plantas.....	92
4.5.4.	Intercambio gaseoso y parámetros de fluorescencia de clorofilas....	93
4.5.5.	Parámetros de producción.....	94
4.5.6.	Parámetros físicos de calidad .....	94
4.5.7.	Determinaciones bioquímicas .....	96
4.5.8.	Concentración de proteínas en el extracto enzimático .....	99
4.5.9.	Extracción de RNA.....	99
4.5.10.	cDNA Y qPCR .....	100
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>105</b>
5.1.	Experimento 1: Optimización de la nutrición frente a la combinación de estreses abióticos .....	105
5.1.1.	Ensayo preliminar.....	105
5.1.2.	Ensayo principal.....	107

5.1.3.	Discusión .....	120
5.2.	Experimento 2: Selección de líneas recombinantes de tomate con diferente tolerancia a la combinación de salinidad y alta temperatura .....	127
5.2.1.	selección en invernadero.....	127
5.2.2.	selección en cámara de cultivo .....	138
5.2.3.	Discusión .....	142
5.3.	Experimento 3: Respuesta fisiológica de 5 líneas recombinantes seleccionadas con diferente tolerancia a la combinación de estreses abióticos	145
5.3.1.	Biomasa.....	145
5.3.2.	Tolerancia a los Estreses simples o combinados.....	150
5.3.3.	Estado nutricional de las plantas .....	153
5.3.4.	Estudio de las Relaciones hídricas.....	167
5.4.5.	Parámetros fotosintéticos y de fluorescencia de clorofilas.....	172
5.4.6.	Líneas seleccionadas.....	179
5.4.6.	Discusión .....	180
5.4.	Experimento 4: Diferencias en la respuesta agronómica entre plantas tolerantes y sensibles a la combinación de estreses abióticos .....	187
5.4.1.	Índice de supervivencia .....	188
5.4.2.	Biomasa.....	189
5.4.3.	Estado nutricional de las plantas .....	191
5.4.4.	Parámetros fotosintéticos.....	200
5.4.5.	Producción del fruto de tomate .....	204
5.4.6.	Parámetros de calidad de los frutos .....	208
5.4.7.	Discusión .....	218
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>235</b>
<b>VII.</b>	<b>LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>239</b>
<b>VIII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>243</b>



## SIGLAS Y ABREVIATURAS

<b>APX:</b>	Ascorbato peroxidasa
<b>AsA:</b>	Ascorbato
<b>ATP:</b>	Adenosín trifosfato
<b>CAT:</b>	Catalasa
<b>Cdna:</b>	ADN complementario, sintetizado a partir de ARN mensajero
<b>CE:</b>	Conductividad eléctrica
<b>DHA:</b>	Dehidroascorbato
<b>DHAR:</b>	Dehidroascorbato reductasa
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ETR:</b>	Índice de transporte electrónico (del inglés <i>electron transport rate</i> )
<b>EUFIC:</b>	Fondo Europeo de Información sobre la Alimentación
<b>FAO:</b>	Organización para la Alimentación y la Agricultura
<b>Fm:</b>	Valor máximo de fluorescencia en hojas adaptadas a la oscuridad
<b>Fm':</b>	Máxima fluorescencia en hojas adaptadas a la luz después de aplicar un pulso saturante de luz actínica
<b>Fo:</b>	Fluorescencia mínima de hojas adaptadas a la oscuridad)
<b>Fo':</b>	fluorescencia mínima en hojas adaptadas a luz después de un pulso de luz roja
<b>Fs:</b>	Fluorescencia estable a cualquier nivel de luz
<b>Fv/Fm:</b>	Máxima eficiencia cuántica de los centros de reacción del PSII.
<b>Fv:</b>	Componente variable de la fluorescencia (Fm-Fo)
<b>GR:</b>	Glutación reductasa
<b>GSA:</b>	Glutamil semialdehido
<b>GSH:</b>	Glutación
<b>GSSG:</b>	Glutación oxidado
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b>	Peróxido de hidrógeno
<b>ICP:</b>	Espectrofotómetro de iones acoplado a plasma

<b>IPCC:</b>	Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático
<b>MAGRAMA:</b>	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
<b>MDA:</b>	Malondialdehido
<b>MDHAR:</b>	Monodehidroascorbato reductasa
<b>mRNA:</b>	ARN mensajero
<b>NAD(P)H:</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida
<b>NAD<sup>+</sup>:</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
<b>NADH:</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
<b>PDX:</b>	Peroxidasas
<b>PF:</b>	Peso fresco
<b>PS:</b>	Peso seco
<b>PSII:</b>	Fotosistema II
<b>qPCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
<b>ROS:</b>	Especies reactivas de oxígeno (del inglés reactive <i>reactive oxygen species</i> )
<b>RILs:</b>	Líneas isogénicas recombinantes (del inglés <i>recombined inbred lines</i> )
<b>SOD:</b>	Superóxido dismutasa
<b>USDA:</b>	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
<b>WUE:</b>	Eficiencia del uso del agua (del inglés <i>water use efficiency</i> )
<b>ΨP:</b>	Potencial de turgor
<b>Ψπ:</b>	Potencial hídrico
<b>Ψπ:</b>	Potencial osmótico

## ÍNDICE DE FIGURAS, DE TABLAS E IMÁGENES

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribución de la producción de tomate entre los principales países productores (FAO, 2017).....	40
<b>Figura 2:</b> Domesticación del tomate desde el antecesor silvestre ( <i>S. pimpinellifolium</i> L.) hasta el tomate actual. Imagen modificada de Giovannoni, 2018. ....	47
<b>Figura 3:</b> Mapamundi que representa la distribución mundial de tomate desde Sudamérica a Europa y Asia durante los siglos XVI, XVII Y XVIII.....	48
<b>Figura 4:</b> Efectos del estrés producido por la salinidad y la respuesta de las plantas ante dicha condición. Esquema modificado de Munns y Tester, 2008. ....	53
<b>Figura 5:</b> Ruta de las especies reactivas del oxígeno. ....	59
<b>Figura 6:</b> Reacción en cadena de la peroxidación lipídica. ....	61
<b>Figura 7:</b> Esquema de las enzimas implicadas en el metabolismo oxidativo de la planta. ....	63
<b>Figura 8:</b> Peso fresco de las plantas cultivadas bajo los distintos tratamientos a 25°C y 35°C.....	106
<b>Figura 9:</b> Peso fresco de plantas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (S) (60 mM NaCl) y salinidad y mayor concentración de K <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> en la solución nutritiva a temperatura óptima (25°C) o temperatura elevada (35°C) (T).....	108
<b>Figura 10:</b> Peso seco de plantas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (S) (60 mM NaCl) y salinidad y mayor concentración de K <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> en la solución nutritiva a temperatura óptima (25°C) o temperatura elevada (35°C) (T).....	108
<b>Figura 11:</b> Concentración de Ca <sup>2+</sup> y relación en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (NaCl 60 mM) y salinidad combinada con una mayor concentración de K <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> en la solución nutritiva a temperatura óptima (25°C) o bajo temperatura elevada (35°C).....	110
<b>Figura 12:</b> Concentración de K <sup>+</sup> en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (NaCl 60 mM) y salinidad combinada con una mayor concentración de	

K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en la solución nutritiva a temperatura óptima (25°C) o bajo temperatura elevada (35°C)..... 110

**Figura 13:** Concentración de Na<sup>+</sup> en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (NaCl 60 mM) y salinidad combinada con una mayor concentración de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en la solución nutritiva a temperatura óptima (25°C) o bajo temperatura elevada (35°C)..... 111

**Figura 14:** Concentración de la relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (NaCl 60 mM) y salinidad combinada con una mayor concentración de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en la solución nutritiva a temperatura óptima (25°C) o bajo temperatura elevada (35°C)..... 112

**Figura 15:** Asimilación de CO<sub>2</sub> en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (NaCl 60 mM) y salinidad combinada con una mayor concentración de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en la solución de irrigación a temperatura óptima (25°C) o temperatura elevada (35°C)..... 113

**Figura 16:** Índice de transpiración en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (NaCl 60 mM) y salinidad combinada con una mayor concentración de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en la solución de irrigación a temperatura óptima (25°C) o temperatura elevada (35°C)..... 114

**Figura 17:** Conductancia estomática en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (NaCl 60 mM) y salinidad combinada con una mayor concentración de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en la solución de irrigación a temperatura óptima (25°C) o temperatura elevada (35°C)..... 114

**Figura 18:** Eficiencia del uso del agua en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (NaCl 60 mM) y salinidad combinada con una mayor concentración de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en la solución de irrigación a temperatura óptima (25°C) o temperatura elevada (35°C)..... 115

**Figura 19:** Concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (60 mM NaCl) y salinidad combinada con una mayor concentración de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en la solución nutritiva a temperatura óptima (25°C) o bajo temperatura elevada (35°C)..... 116

**Figura 20:** Tasa de peroxidación lipídica, medida como la concentración de MDA (B) en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (60 mM NaCl) y



salinidad combinada con una mayor concentración de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  en la solución nutritiva a temperatura óptima (25°C) o bajo temperatura elevada (35°C)..... 117

**Figura 21:** Expresión de los genes (A) y actividades enzimáticas (B) relacionados con el metabolismo oxidativo en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (60 mM NaCl) o salinidad y mayor concentración de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  en la solución nutritiva a temperatura óptima (25 ° C ) o temperatura elevada (35 ° C). ..... 119

**Figura 22:** Vigor de las distintas líneas de tomate en condiciones control. Los valores corresponden al promedio de peso fresco de las distintas plantas. .... 128

**Figura 23:** Vigor de las distintas líneas de tomate en condiciones de combinación de salinidad y alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). Los valores corresponden al promedio de peso fresco de las distintas plantas..... 129

**Figura 24:** Tolerancia a la combinación de salinidad y alta temperatura expresada en porcentaje de las líneas recombinantes de tomate definidas como “Muy tolerantes” a la combinación de salinidad y alta temperatura. .... 131

**Figura 25:** Peso fresco de las líneas de tomate definidas como “Muy tolerantes” en condiciones control y bajo la combinación de salinidad y alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). ..... 132

**Figura 26:** Tolerancia expresada en porcentaje de las líneas de tomate definidas como de “Tolerancia intermedia” a la combinación de salinidad y alta temperatura..... 133

**Figura 27:** Peso fresco de las líneas de tomate definidas como de “Tolerancia intermedia” en condiciones control y en condiciones de estrés combinado de salinidad y alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). ..... 134

**Figura 28:** Tolerancia expresada en porcentaje de las líneas de tomate definidas como “Poco tolerantes” a la combinación de salinidad y alta temperatura. .... 136

**Figura 29:** Peso fresco de las líneas de tomate definidas como de “Poco tolerantes” en condiciones control y bajo combinación de salinidad y alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). ..... 137

<b>Figura 30:</b> Tolerancia expresada en porcentaje a los estreses combinados de salinidad y alta temperatura de las 12 líneas de tomate seleccionadas en este experimento. ....	140
<b>Figura 31:</b> Peso fresco de las 12 líneas de tomate seleccionadas en condiciones control y bajo combinación de salinidad y alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). ....	141
<b>Figura 32:</b> Peso fresco de las plantas cultivadas bajo los tratamientos control (25°C), Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). ....	147
<b>Figura 33:</b> Peso seco de las plantas cultivadas bajo los tratamientos control (25°C), Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). ....	149
<b>Figura 34:</b> Porcentaje de tolerancia de las distintas líneas de tomate sometidas a estrés de salinidad simple (75 mM NaCl). ....	151
<b>Figura 35:</b> Porcentaje de tolerancia de las distintas líneas de tomate sometidas al estrés de alta temperatura simple (35°C). ....	152
<b>Figura 36:</b> Porcentaje de tolerancia de las distintas líneas de tomate sometidas a la combinación de salinidad y alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). ....	153
<b>Figura 37:</b> Concentración de Ca <sup>2+</sup> en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). ....	156
<b>Figura 38:</b> Concentración de K <sup>+</sup> en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C) .....	158
<b>Figura 39:</b> Concentración de Na <sup>+</sup> en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). ....	160
<b>Figura 40:</b> Relación de K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C).. ....	161

<b>Figura 41:</b> Concentración de $\text{Ca}^{2+}$ en las raíces de las distintas líneas de tomate en los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Temperatura (35°C) y Salinidad + Temperatura (75 mM NaCl + 35°C)..	163
<b>Figura 42:</b> Concentración de $\text{K}^{+}$ en las raíces de las distintas líneas de tomate en los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C).	165
<b>Figura 43:</b> Concentración de $\text{Na}^{+}$ en las raíces de las distintas líneas de tomate en los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C).	166
<b>Figura 44:</b> Relación de $\text{K}^{+}/\text{Na}^{+}$ en las raíces de las distintas líneas de tomate en los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C).	167
<b>Figura 45:</b> Potencial hídrico ( $\psi_w$ ). de las distintas líneas de tomate sometidas a los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Temperatura (35°C) y Salinidad + Temperatura (75 mM NaCl + 35°C).	169
<b>Figura 46:</b> Potencial osmótico ( $\psi_s$ ) de las distintas líneas de tomate sometidas a los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C).	170
<b>Figura 47:</b> Potencial de turgor ( $\psi_p$ ) de las distintas líneas de tomate sometidas a los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C).	171
<b>Figura 48:</b> Asimilación de $\text{CO}_2$ de las distintas líneas de tomate sometidas a los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C).	173
<b>Figura 49:</b> Conductancia estomática de las distintas líneas de tomate sometidas a los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C).	174
<b>Figura 50:</b> Índice de transpiración de las distintas líneas de tomate sometidas a los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C).	175

<b>Figura 51:</b> Eficiencia del uso del agua de las distintas líneas de tomate sometidas a los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). .....	176
<b>Figura 52:</b> Rendimiento cuántico máximo del PSII en las distintas líneas de tomate sometidas a los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). .....	177
<b>Figura 53:</b> Eficiencia del PSII de las distintas líneas de tomate sometidas a los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C).....	178
<b>Figura 54:</b> índice de transporte electrónico de las distintas líneas de tomate sometidas a los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). .....	179
<b>Figura 55:</b> Índice de supervivencia de las líneas RIL-18 y RIL-76 cultivadas a diferentes temperaturas (25°C y 35°C) y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM).....	189
<b>Figura 56:</b> Peso fresco de las plantas de tomate en estado vegetativo de las líneas RIL-18 y RIL-76 cultivadas a diferentes temperaturas (25°C y 35°C) y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM). .....	190
<b>Figura 57:</b> Peso fresco de las plantas de tomate en estado de reproducción de las líneas RIL-18 y RIL-76 cultivadas a diferentes temperaturas (25°C y 35°C) y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM).....	191
<b>Figura 58:</b> Concentración de Ca <sup>2+</sup> en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25 °C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. ....	193
<b>Figura 59:</b> Concentración de K <sup>+</sup> en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25 °C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. ....	194
<b>Figura 60:</b> Concentración de Na <sup>+</sup> en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25°C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C.....	195

<b>Figura 61:</b> Concentración de P en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25 °C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C.....	196
<b>Figura 62:</b> Concentración de B en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25 °C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C.....	197
<b>Figura 63:</b> Concentración de Fe en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25 °C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C.....	198
<b>Figura 64:</b> Concentración de Mn en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25°C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C.....	199
<b>Figura 65:</b> Concentración de Zn en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25 °C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C.....	200
<b>Figura 66:</b> Asimilación de CO <sub>2</sub> de las plantas de tomate de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C.....	202
<b>Figura 67:</b> Conductancia estomática de las plantas de tomate de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C.....	203
<b>Figura 68:</b> Tasa de transpiración de las plantas de tomate de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. ....	204
<b>Figura 69:</b> Producción de tomate de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. ....	206
<b>Figura 70:</b> Biomasa total (parte aérea + producción) de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C.....	207

<b>Figura 71:</b> Promedio del peso de los frutos de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C.....	209
<b>Figura 72:</b> Promedio del diámetro longitudinal de los frutos de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. ....	210
<b>Figura 73:</b> Promedio del diámetro ecuatorial de los frutos de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. ....	210
<b>Figura 74:</b> Conductividad eléctrica de los frutos de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C.....	211
<b>Figura 75:</b> °Brix de los frutos de las líneas 18 y en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. Los datos representan medias ± SE (n=6).....	212
<b>Figura 76:</b> pH de los frutos de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C.. Los datos representan medias ± SE (n=6).....	213
<b>Figura 77:</b> Acidez del fruto de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. La acidez del fruto está expresada en gramos de ácido cítrico. ....	214
<b>Figura 78:</b> Concentración de Ca <sup>2+</sup> en los frutos de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25 °C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C.....	215
<b>Figura 79:</b> Concentración de K <sup>+</sup> en los frutos de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25 °C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C.....	216
<b>Figura 80:</b> Concentración de Mg <sup>2+</sup> en los frutos de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25 °C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. ....	217

**Figura 81:** Concentración de Na<sup>+</sup> en los frutos de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25 °C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C..... 218





## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Principales países productores de tomate en el mundo (FAO, 2017). La producción total se estima en millones de toneladas y el área cultivada en miles de hectáreas.....	40
<b>Tabla 2:</b> Regiones productoras de tomate en España (FAO, 2017). La producción total se estima en miles de toneladas y el área cultivada en hectáreas. ....	42
<b>Tabla 3:</b> Valores nutricionales del tomate USDA, 2018.....	46
<b>Tabla 4:</b> Diferentes tipos de agua de riego dependiendo de su salinidad (FAO, 2019). ....	51
<b>Tabla 5:</b> Concentración de sales y macronutrientes utilizadas para la preparación de la solución nutritiva.....	80
<b>Tabla 6:</b> Concentración de sales y micronutrientes utilizadas para la preparación de la solución nutritiva.....	80
<b>Tabla 7:</b> Tratamientos aplicados a las plantas de tomate en el experimento preliminar con el fin de seleccionar el más significativo para el siguiente experimento. La concentración está expresada en mM. ....	82
<b>Tabla 8:</b> Tratamientos aplicados a las plantas de tomate en el experimento principal bajo condiciones de invernadero para las determinaciones fisiológicas, bioquímicas y moleculares. La concentración está expresada en mM. ....	83
<b>Tabla 9:</b> Disposición de los distintos tratamientos en las cámaras de cultivo durante el experimento 2. ....	87
<b>Tabla 10:</b> Disposición de los distintos tratamientos en las cámaras de cultivo durante el experimento 3. ....	88
<b>Tabla 11:</b> Secuencia de los primers utilizados en los análisis de PCR cuantitativa.....	102
<b>Tabla 12:</b> Grupos de tolerancia de las distintas líneas de tomate en base a la variación de peso fresco que se obtuvo en las plantas sometidas a estrés combinado respecto a las plantas control.....	130

<b>Tabla 13:</b> Líneas seleccionadas en base a su rango de tolerancia para la consecución de los siguientes experimentos. ....	138
<b>Tabla 14:</b> Líneas seleccionadas en base a su rango de tolerancia para la consecución de los siguientes experimentos. ....	142
<b>Tabla 15:</b> Estadística de los macronutrientes estudiados en las hojas de las plantas en los distintos estados fenológicos del cultivo. ....	196
<b>Tabla 16:</b> Estadística de los micronutrientes estudiados en las hojas de las plantas en los distintos estados fenológicos del cultivo. ....	200

## ÍNDICE DE IMÁGENES

<b>Imagen 1:</b> Flor del tomate.....	43
<b>Imagen 2:</b> Fotografía de los invernaderos.....	78
<b>Imagen 3:</b> Detalle de una de las cámaras de cultivo.....	79
<b>Imagen 4:</b> Detalle de las plantas de tomate cultivadas en los cubos de 120 litros durante la consecución del experimento. ....	83
<b>Imagen 5:</b> Detalle de las plantas en uno de los módulos del invernadero... ..	85
<b>Imagen 6:</b> Distintas líneas RILs de tomate cultivadas en la cámara de cultivo. ....	87
<b>Imagen 7:</b> Las dos líneas seleccionadas para el último experimento. ....	90
<b>Imagen 8:</b> Detalle de los racimos de las líneas RIL-18 y RIL-76.....	227
<b>Imagen 9:</b> Tomates recolectados de cada uno de los tratamientos de ambas líneas RILs estudiadas RIL-18 y RIL-76.....	228



# **I - INTRODUCCIÓN**



## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. EL CULTIVO DEL TOMATE

El tomate es el segundo fruto más consumido en el mundo, y representa uno de los cultivos hortícolas más importantes (Calvo-Polanco y col., 2016). Su demanda, producción y comercialización aumentan constantemente, lo que lo convierte en el cultivo de mayor valor económico (Foolad, 2004).

Según los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2017), la extensión total de hectáreas cultivadas en 2017 fue de 4,8 millones, y la producción mundial de tomate en para consumo fresco supuso 198 MMt. China es el principal productor de tomate a nivel mundial, con una producción de 59,62 MMt, seguido por India, con una producción total de 20,70 MMt y Turquía, con 12,75 MMt. España ocupa el octavo lugar, con 5,16 MMt, lo que supone un aumento del 24% de producción respecto a los datos registrados en 2016. España también es el segundo país de la Unión Europea que más tomate produce después de Italia. En la Figura 1 se muestra el porcentaje de producción de los principales países productores de tomate, y, en la Tabla 1, los datos de producción de dichos países en millones de toneladas y la superficie dedicada al cultivo del tomate en miles de hectáreas (Mha).

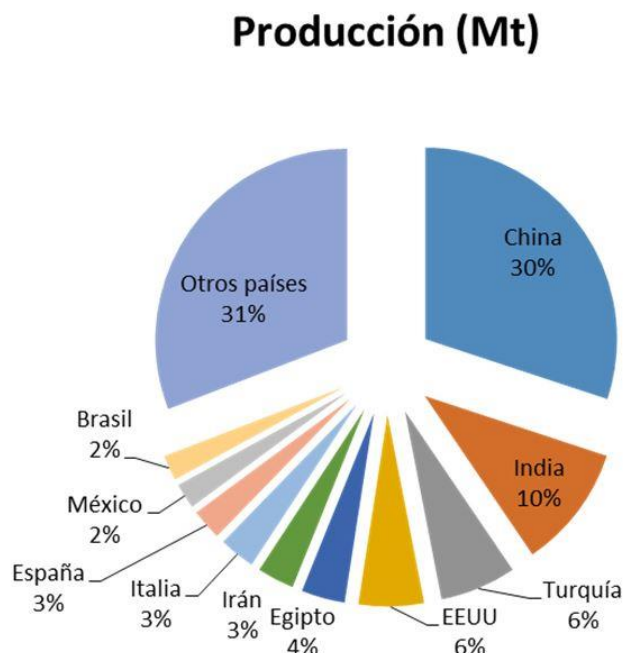


Figura 1: Distribución de la producción de tomate entre los principales países productores (FAO, 2017).

Tabla 1: Principales países productores de tomate en el mundo (FAO, 2017). La producción total se estima en millones de toneladas y el área cultivada en miles de hectáreas.

Posición	País	Producción (MMt)	Área Cultivada (Mha)
1	China	59,63	1033,28
2	India	20,71	797
3	Turquía	12,75	187,07
4	EEUU	10,91	126,07
5	Egipto	7,30	182,44
6	Irán	6,18	153,73
7	Italia	6,01	99,75
8	España	5,16	60,85
9	México	4,24	93,00
10	Brasil	4,23	61,53
	Otros países	61,20	2053,66



En España, el cultivo total de tomate ascendió a 5 millones de toneladas en el año 2017 (FAO, 2017), y se destina tanto para su consumo en fresco como para su transformación industrial. Las zonas que destinan su producción al consumo en fresco son Almería, la Región de Murcia, Alicante y Canarias. Además, estas regiones exportan el producto a otros países, lo que ha supuesto la modernización de muchas empresas del sector dedicadas a ello. En otras zonas como Navarra, Zaragoza y Extremadura, el cultivo del tomate está enfocado a la industria, donde se procesa y se convierte en zumos, pastas o salsas. Dependiendo del destino final del tomate, los agricultores adaptan sus técnicas de cultivo a las necesidades propias del sector y a la demanda del mercado (López Camelo y Gómez, 2004).

Según los datos estadísticos recogidos por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del año 2017, la comunidad autónoma con mayor producción de tomate es Andalucía, con una producción anual de 2229,9 Mt, seguida muy de cerca por Extremadura, con 2075,04 Mt. Los datos de producción de las distintas comunidades autónomas se recogen en la Tabla 2, así como la superficie de hectáreas cultivadas en cada comunidad. Tanto en Andalucía como en la Región de Murcia, el cultivo del tomate está presente durante todo el año, mientras que, en otras comunidades, el tomate tiene sus propios ciclos de recolección.

Tabla 2: Regiones productoras de tomate en España (FAO, 2017). La producción total se estima en miles de toneladas y el área cultivada en hectáreas.

<b>Comunidades Autónomas</b>	<b>Producción (MT)</b>	<b>Superficie (HA)</b>
Andalucía	2229,97	24834
Extremadura	2075,70	24090
R. de Murcia	228,78	2476
Navarra	146,82	2059
Galicia	95,56	1143
Castilla LA Mancha	82,93	1136
C. Valenciana	75,68	1259
Canarias	74,10	889
Aragón	56,67	704
Cataluña	46,47	1041
La Rioja	18,80	237
Baleares	10,71	367
País Vasco	6,87	289
Madrid	5,05	54
Castilla Y León	4,97	115
P. de Asturias	3,54	142
Cantabria	0,80	17
<b>Total España</b>	<b>5163,46</b>	<b>60852</b>

La agricultura del sureste español se caracteriza por la obtención de productos de alta calidad con un gran valor añadido, los cuales son comercializados en mercados nacionales y sobre todo internacionales, resultando en un gran beneficio económico para las regiones españolas que se dedican al cultivo del tomate. En España, la Región de Murcia se sitúa como la tercera productora de tomate a nivel nacional, donde se comercializan distintas variedades dependiendo de la época del año en la que se cultiven. La mayor parte de la producción la realizan empresas con gran capacidad de explotación, y se destinan tanto al consumo de la propia comunidad como a la exportación europea donde la producción es más baja. (MAGRAMA, 2011).

## 1.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL TOMATE

El tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) es una planta que comprende una especie dentro de la familia de las solanáceas, donde también se encuentran la patata, la berenjena, el pimiento y algunas otras especies de plantas decorativas como la petunia (Imagen 1). Es una planta dicotiledónea que pertenece a la familia Solanaceae, y suele cultivarse como una planta anual, aunque, con unas condiciones óptimas, su cultivo puede prolongarse durante más tiempo (Maroto, 1995).

La taxonomía aceptada es:

- Clase: *Dicotyledoneas*.
- Orden: *Solanales (Personatae)*.
- Familia: *Solanaceae*.
- Subfamilia: *Solanoideae*.
- Género: *Solanum*.
- Especie: *Lycopersicum*.



Imagen 1: Flor del tomate durante la etapa de floración de las plantas.

Es una planta perenne arbustiva, y su crecimiento puede ser determinado o indeterminado, dependiendo de la especie. La forma de crecimiento más común escogida por los agricultores es la indeterminada, y en ella los tallos presentan patrones uniformes de tres hojas o yemas y una inflorescencia de tipo racimoso, acabando con el ápice vegetativo, donde seguirá creciendo la planta (Chamarro, 1995). Estas variedades de crecimiento indeterminado se cultivan en invernadero, ya que, como producen inflorescencia de forma continua, son perfectas para el consumo fresco del tomate (Kinet y Peet, 1997). La planta determinada presenta menos hojas por inflorescencia y tiene un crecimiento limitado. En los primeros estadios de la planta el tallo tiene consistencia herbácea, pero en estado adulto es semileñoso y está cubierto de pelos glandulares y no glandulares. El sistema radicular es pivotante, y está compuesto por una raíz principal de la que salen raíces secundarias y raíces adventicias. Las hojas son compuestas e imparipinnadas, presentando un foliolo terminal y de 7 a 9 foliolos laterales (Chamarro, 1995).

La inflorescencia tiene de 4 a 12 flores, radiales y con cinco estambres cada una de ellas, agrupándose en racimos o ramilletes. Consta de 5 o más sépalos dispuestos de forma helicoidal e igual número de estambres soldados alternados entre los pétalos; todo ello forma un cono estaminal que envuelve al gineceo (Jaramillo y col., 2007). El ovario es súpero bicarpenal y contiene numerosos primordios seminales produciendo bayas polispermas. La flor está unida al eje floral por un pedicelo con un engrosamiento articulado que tiene una capa de abscisión. Posee una semilla lenticular comprimida y el embrión enrollado (Chamarro, 1995).

La planta del tomate es autógama: la polinización se produce con el polen de la misma flor. El fruto es una baya globular y presenta diversidad de tamaños, formas y colores dependiendo de la variedad de la que se trate. En el mismo racimo pueden darse a la vez frutos pequeños y flores abiertas que se van desarrollando progresivamente. El fruto del tomate está formado por el exocarpio, mesocarpio parenquimático y endocarpio, que rodea a los lóculos y a las semillas (Chamarro, 1995).

### 1.3. VALOR NUTRICIONAL DEL TOMATE

El tomate está catalogado como un alimento funcional a nivel nutricional y farmacológico, ya que produce efectos beneficiosos en la dieta y en la prevención de enfermedades crónicas gracias a su poder antioxidante (Bramley, 2000; Canene-Adams y col., 2005). Cuando se habla de la calidad nutritiva y funcional de un producto, se hace referencia a la utilidad que poseen dichos alimentos para satisfacer el correcto funcionamiento del organismo del ser humano o de animales. Actualmente, son muchos los estudios que se basan en mejorar la calidad de los productos hortícolas como el tomate, ya que el mercado y los consumidores son cada vez más exigentes y demandan productos que sean más saludables y nutritivos (Gruda, 2005).

El tomate es rico en licopeno,  $\beta$ -caroteno, vitamina C y compuestos fenólicos (Bhowmik y col., 2012; Dumas y col., 2003) y su consumo representa el 85% del licopeno total de la dieta del ser humano. El licopeno es un carotenoide específico del tomate con un gran poder antioxidante (Bramley, 2000; Canene-Adams y col., 2005), y se ha demostrado que induce las comunicaciones de célula a célula, regula funciones hormonales, interviene en el sistema inmunitario y participa en otras rutas metabólicas (Rao y Agarwal, 1999). El  $\beta$ -caroteno interviene en la formación de la vitamina A, que previene problemas de visión, potencia el sistema inmune y protege frente a ciertos tipos de cáncer relacionados con la piel y las mucosas (Martí y col., 2016; Sies, 1991). La vitamina C interviene en procesos antiinflamatorios y reduce el daño oxidativo, además de participar en la biosíntesis de hormonas, en la de colágeno y de presentar otras funciones biológicas (Aguirre y May, 2008). Los compuestos fenólicos están muy presentes en los vegetales, y por ello, en la dieta humana, y también desempeñan un papel importante en la prevención de ciertas enfermedades debido a su función antioxidante (Fernandez-Panchon y col., 2008). El tomate, además, es una fuente rica en folatos, potasio y vitamina E, aunque su disponibilidad puede variar dependiendo de los procesos y tratamientos a los que hayan sido sometidos los productos derivados de su transformación comercial (Willcox y col., 2003). Es por todo ello que su consumo es un indicador de una buena alimentación y un estilo de vida (George y col., 2004).

Según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), el tomate tiene un bajo aporte calórico (18 Kcal por 100g) y un alto contenido de agua

(95%), azúcares, minerales, vitaminas y lípidos que lo que lo convierte en un alimento con un gran valor nutricional (Tabla 3). La glucosa y la fructosa son los azúcares mayoritarios en el fruto del tomate, y representan casi el 50% de su materia seca. Por otro lado, el ácido málico y el ácido cítrico son los ácidos orgánicos mayoritarios, representando el 10% de la materia seca (Chamarro Lapuerta, 1995). Los azúcares y los ácidos no tienen un gran valor nutritivo en el tomate, pero sí desempeñan un gran papel en su sabor.

Tabla 3: Valores nutricionales del tomate USDA, 2018.

<b>Composición nutricional</b>	<b>Valor por 100g</b>
Agua	94,52 g
Energía	18 kcal
Proteínas	0,88 g
Lípidos totales	0,20 g
Carbohidratos	3,89 g
Fibra total	1,2 g
Azúcares	2,63 g
Vitaminas	96,79 mg
Calcio, Ca	10 mg
Hierro, Fe	0,27 mg
magnesio, Mg	11 mg
Fósforo, P	24 mg
Potasio, K	237 mg
Sodio, Na	5 mg
Zinc, Zn	0,17 mg

#### 1.4. DOMESTICACIÓN DEL TOMATE

La domesticación de los cultivos para conseguir comida, alimento o fibras resulta de la selección que hace el ser humano de rasgos deseables en las plantas para mejorar algunas condiciones, como la tolerancia a los estreses ambientales, la tolerancia a patógenos o mejorar la producción y la calidad (Bai y Lindhout, 2007).

Las diferentes condiciones agronómicas y climatológicas en las que el tomate es cultivado, han propiciado que el fruto haya ido evolucionando y formando una gran diversidad de fenotipos y variedades con diferencias en el tamaño (desde poco a cientos de gramos), la forma (achatado, redondeado, alargado o en forma de pera)

y el color (desde el amarillo a distintas tonalidades de rojo) (Rodríguez-Burruezo y col., 2005). La diversidad genética de las plantas hace que sean necesarios cruces más amplios para minimizar las características genéticas que no son deseables y potenciar los rasgos que son interesantes (Giovannoni, 2018).

El tomate es un ejemplo excelente de domesticación, ya que su antecesora silvestre, *Solanum pimpinellifolium* L., guarda ya pocas similitudes con la planta que actualmente se utiliza para producción de frutos de tomate: *Solanum lycopersicum* L. (Zuriaga y col., 2009).

Las especies originarias nativas se sitúan en América del Sur, concretamente en la cordillera andina, donde más tarde fueron cultivadas por gran parte de América central y Méjico (EUFIC, 2001). El tomate cherry (*S. lycopersicum* var. Cerasiforme) se considera el antepasado probable del tomate que conocemos hoy en día, que a su vez, fue domesticado de la especie silvestre de fruto rojo *Solanum pimpinellifolium* (Figura 2) (Ranc y col., 2008).

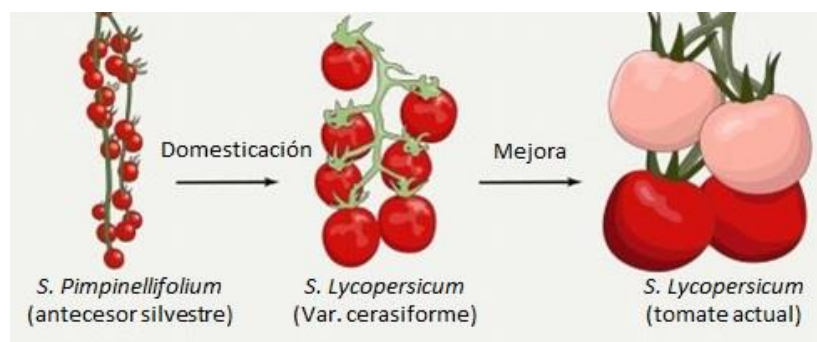


Figura 2: Domesticación del tomate desde el antecesor silvestre (*S. pimpinellifolium* L.) hasta el tomate actual. Imagen modificada de Giovannoni, 2018.

El fruto de tomate actual es unas 100 veces más grande que el tomate primigenio (Lin y col., 2014). La domesticación del tomate comenzó en la región andina, completándose la en Mesoamérica. Posteriormente, los españoles llevaron plantas de Mesoamérica a España y desde allí se exportaron al resto del mundo (Blanca y col., 2012). Los conquistadores trajeron los tomates a Europa en el siglo XVII (Rick y Fobes, 1975), y la migración posterior y la selección continua redujeron su diversidad genética. (Figura 3).

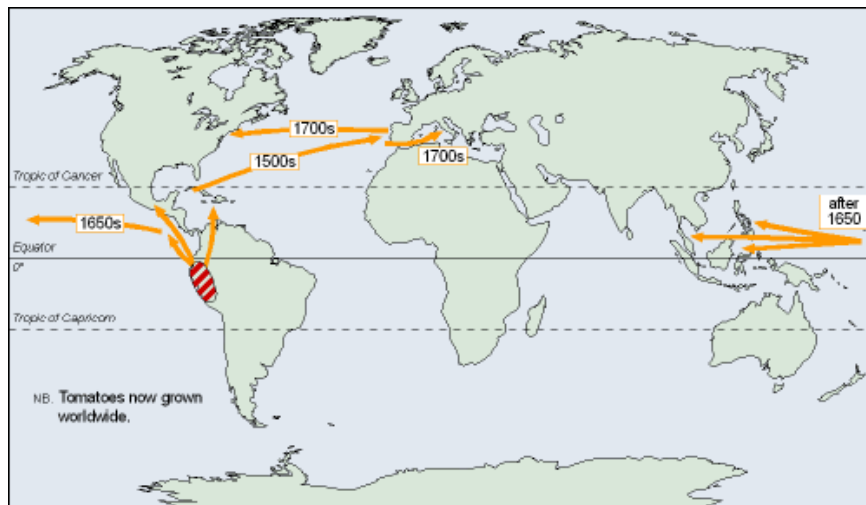


Figura 3: Mapamundi que representa la distribución mundial de tomate desde Sudamérica a Europa y Asia durante los siglos XVI, XVII Y XVIII.

En un estudio llevado a cabo por Zhu y col. (2018), se caracterizó una población con una gran diversidad de tomates y se presentó un mapa molecular de los datos genómicos de la mejora del tomate, lo que concluyó que ese proceso de domesticación de tomate ha ido alterando el fenotipo químico de los frutos en relación con el contenido de metabolitos. Además, se ha demostrado que la pérdida o la selección negativa de genes que se ha producido en el tomate durante su proceso de domesticación ha favorecido que se desarrollen rasgos más importantes, como la resistencia a enfermedades (Gao y col., 2019). Con el fin de aumentar el rendimiento de los cultivos, se ha estudiado el cruce de plantas silvestres con plantas comerciales, sin embargo, el mecanismo de cómo ha cambiado el genoma del tomate sigue siendo en gran parte desconocido.

#### 1.4.1. Variedad *Solanum pimpinellifolium*

*Solanum pimpinellifolium* L. pertenece al género *Lycopersicon* (Luckwill, 1943; Miller y J. Rivington, 1754), y está anidado dentro de la familia de las solanáceas (Bohs y Olmstead, 1997; Peralta y Spooner, 2000). Es un arbusto pequeño típico de las zonas costeras de Perú y Ecuador, donde crece a menos de 100 metros de altitud (Luckwill, 1943). Se encuentra en los valles poco profundos por los que fluyen los ríos que van desde la cordillera andina hasta el océano



Pacífico, áreas que hoy en día están muy cultivadas y urbanizadas (Taylor y col., 1988).

Existen diferencias marcadas entre las regiones ecuatoriana y peruana. Las mayores diversidades se encuentran en el norte del Perú, donde se considera que es del origen peruano de la especie. En la región ecuatoriana se encuentra mayor diversidad genética en la especie, lo que se correlaciona con la diversidad climática diferente que se encuentra en las áreas costeras de Ecuador y Perú. (Lin y col., 2019; Zuriaga y col., 2009).

El fruto de *S. pimpinellifolium* L. es conocido como el tomate cimarrón, y aunque no suele ser cultivado para el consumo humano como el tomate comercial, ambas especies están estrechamente relacionadas a pesar de que difieren principalmente en el tamaño de sus frutos, hojas y flores (Luckwill, 1943). Actualmente se considera que el *Solanum pimpinellifolium* es el antecesor de las especies que se cultivan hoy en día (Breto y col., 1993), ya que, el tomate actual, presenta características heredadas de la especie, como la resistencia a algunas cepas de patógenos (Bohn y Tucker, 1940; Langford, 1937), genes para el color de la fruta (Tanksley y col., 1982) y los rasgos que facilitan la cosecha del tomate (Luckwill, 1943). A día de hoy, el *S. pimpinellifolium* L. se suele usar en el ámbito de la investigación, ya que hibrida muy bien con *S. lycopersicum* L. (Zuriaga y col., 2009) y, además, porque tiene muchos rasgos económicamente importantes para las variedades comerciales de tomate (Mieslerova y col., 2000).

#### **1.4.2. Líneas isogénicas recombinantes (*Recombinant inbred lines*, RILs)**

En los últimos años se han desarrollado las conocidas como líneas isogénicas recombinantes (*recombinant inbred lines*, RILs), que son consideradas como herramientas muy útiles para el estudio de determinados genes y/o caracteres (Broman, 2005). Estas líneas son obtenidas mediante un primer cruzamiento de la línea silvestre con la línea comercial a mejorar, y, posteriormente, se llevan a cabo una serie de autofecundaciones o retrocruzamientos de la progenie F2 hasta que las líneas alcanzan la estabilidad genética. Las cepas parentales se seleccionan en función del fenotipo, la disponibilidad de marcadores y la compatibilidad, y pueden estar diseñadas genéticamente para eliminar las variaciones no deseadas o introducir genes reporteros (Pollard, 2012).

El uso de RILs posee ciertas ventajas sobre otras poblaciones usadas para mapas genéticos, ya que son líneas genéticamente homocigóticas que pueden ser propagadas sin necesidad de usar técnicas de segregación, utilizando selectivamente semillas viables (Colome-Tatche y Johannes, 2016). De esta manera, estas líneas pueden ser distribuidas y replicadas en distintos experimentos, en diferentes laboratorios y en diferentes ambientes. Esta característica es especialmente útil para el análisis de rasgos cualitativos de una especie, ya que permite la reducción de la componente medioambiental al total de la variabilidad fenotípica.

En algunos estudios realizados con RILs de plantas de tomate, se ha demostrado que la resecuenciación de la siguiente generación de las líneas parentales permite que la gran mayoría de los polimorfismos se caractericen y utilicen para progresar de QTL a gen causante (Kevei y col., 2015).

Así, las RILs pueden ser muy útiles en el estudio de la variedad fenotípica de una especie bajo ciertas condiciones de estrés ambiental, mostrando una gama de plantas tolerantes y sensibles a dicha condición.

## 1.5. ESTRÉS ABIÓTICO

El estrés se define como cualquier situación ambiental adversa que pueda afectar de manera fisiológica, bioquímica y/o molecular a las plantas. Los estreses bióticos son los que se producen por organismos patógenos, y pueden acentuarse debido a las condiciones climáticas en las que se produzca la infección. Por otro lado, los estreses también pueden ser abióticos, como la temperatura (por encima o por debajo de la óptima de crecimiento para una especie), la falta de agua (total o parcial), o la salinidad de suelos y/o aguas de riego, entre otras. Los estreses pueden actuar individualmente o de forma combinada, de manera que dos o más estreses actúan de manera simultánea sobre las plantas (Choudhury y col., 2017; Mittler, 2006; Mittler y Blumwald, 2010; Suzuki y col., 2014).

### 1.5.1. Salinidad

La salinidad en el suelo es un problema que afecta, sobre todo, a las zonas áridas y semiáridas del mundo, como la cuenca mediterránea, a consecuencia de

las escasas precipitaciones y recursos hídricos y el mal uso de fertilizantes. En estas regiones, la evaporación y la extracción de agua por las raíces de las plantas hacen que la solución del suelo se concentre y que los niveles de sal cerca de la superficie aumenten, lo que también, ligado a la escasez hídrica de estas zonas, afecta al crecimiento de las plantas y a la productividad de las mismas (Bai y col., 2019).

La idoneidad del agua para regadío depende de sus condiciones de uso, incluidos el tipo de cultivo, el clima, el suelo y el método de riego. En líneas generales, la Tabla 4 recoge una clasificación de las aguas de riego dependiendo del nivel de salinidad que posean (FAO, 2019). Tal clasificación se proporciona en términos de concentración total de sal, que es el principal factor que limita el uso de aguas salinas para la producción de cultivos.

Tabla 4: Diferentes tipos de agua de riego dependiendo de su salinidad (FAO, 2019).

<b>Agua</b>	<b>Conductividad eléctrica (dS/m)</b>	<b>Concentración salina (mg/l)</b>	<b>Uso del agua</b>
<b>No salina</b>	<0,7	<500	Agua de uso doméstico y agua de riego
<b>Ligeramente salina</b>	0,7-2	500-1.500	Agua de riego
<b>Moderadamente salina</b>	2-10	1.500-7000	Drenajes primarios y aguas subterráneas
<b>Altamente salina</b>	10-25	7.000-15.000	Drenajes secundarios y aguas subterráneas
<b>Muy altamente salina</b>	25-45	15.000-35.000	Aguas subterráneas muy salinas
<b>Salmuera</b>	>45	>45.000	

Pocas aguas de riego de uso general exceden aproximadamente 2 dS/m en conductividad eléctrica (CE). Muchas aguas de drenaje, incluidas las aguas subterráneas poco profundas que subyacen a las tierras irrigadas, caen en el rango de 2-10 dS/m en la CE. Estas aguas suministran muchas de las zonas irrigadas, y tienen un buen potencial para mantener la producción de determinados cultivos.

La reutilización de aguas de drenaje de segunda generación para irrigación también es posible y útil. Tales aguas generalmente tendrán una CE en el rango de 10-25 dS/m. Solo los cultivos muy tolerantes (casi ningún cultivo convencional) pueden desarrollarse y producir con éxito con aguas que superan los 10 dS/m. Las aguas muy salinas (25-45 dS/m en CE) y salmuera (> 45 dS/m en CE) están fuera del alcance de estas directrices y, por lo tanto, sus usos para la producción de cultivos no son factibles (FAO, 2019).

Los suelos salinos tienen un alto contenido en sales solubles, lo que produce cambios en la composición mineral y en el vigor de las plantas una vez absorbidas por éstas junto con el agua de riego. Las principales sales que afectan negativamente a la producción vegetal son: cloruros ( $\text{Cl}^-$ ) y sulfatos de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ), siendo para las plantas los principales iones tóxicos sodio ( $\text{Na}^+$ ), cloruros ( $\text{Cl}^-$ ) y los sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) (Munns y Tester, 2008).

La salinidad reduce la producción de los cultivos y tiene un impacto devastador para la expansión de las hojas de las plantas, la síntesis de proteínas, la producción de energía, el metabolismo de los lípidos y la apertura de los estomas. Además, la fotosíntesis también se ve afectada debido al estrés osmótico causado por la deficiencia de agua, la acumulación de iones tóxicos para las células y el mal balance de nutrientes (Parida y Das, 2005).

Dado que la salinidad es una característica común de las tierras áridas y semiáridas, las plantas han desarrollado mecanismos para tolerar el bajo potencial hídrico del suelo causado por la salinidad y la sequía (Hanin y col., 2016). Debido a que el  $\text{NaCl}$  es la sal más soluble y extendida, uno de esos mecanismos es la exclusión por parte de las raíces de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , favoreciendo la acumulación en la planta de otros nutrientes comúnmente presentes en bajas concentraciones, como  $\text{K}^+$  y  $\text{NO}_3^-$  (Munns, 2005).

La salinidad produce dos tipos de estrés en las plantas: el estrés osmótico y el estrés iónico (Horie y col., 2012). El estrés osmótico (Figura 4) es el primero que se produce debido al aumento de la concentración de sal fuera de la raíz, lo que conduce a inhibir la captación de agua por parte de la planta, la expansión celular y el consiguiente desarrollo vegetativo (Munns y Tester, 2008). El estrés iónico se produce después, cuando los iones de  $\text{Na}^+$  se acumulan en la planta, especialmente

en las hojas, y causa toxicidad, incluyendo un aumento de la mortalidad de las hojas con clorosis y necrosis y disminuyendo la actividad de las rutas metabólicas esenciales (Yeo y Flowers, 1986).



Figura 4: Efectos del estrés producido por la salinidad y la respuesta de las plantas ante dicha condición. Esquema modificado de Munns y Tester, 2008.

El ajuste osmótico permite a las plantas adaptarse a las situaciones de estrés osmótico producido por la sequía o la salinidad. Bajo estrés osmótico, las plantas acumulan solutos osmóticamente compatibles para disminuir el potencial osmótico y mantener la turgencia celular y los procesos fisiológicos, lo que permite el movimiento del agua desde las raíces al interior de la célula. (Gebre y col., 1994; Turner, 2018).

En las plantas hay dos tipos de osmolitos que median el ajuste osmótico: los solutos orgánicos, como la sacarosa, los polioles, la glicina betaína y la prolina y, por otro lado, los iones inorgánicos, como  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Cl^-$  (Chen y Jiang, 2010). Cabe destacar que la síntesis de osmolitos orgánicos consume una cantidad considerable de energía en las plantas (Bai y col., 2019), y su acumulación y

translocación masivas interfieren y reorientan los procesos metabólicos de las plantas para, posteriormente, interrumpir el crecimiento y reducir su productividad (Sun y col., 2015).

La absorción y la consecuente acumulación masiva de iones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  en concentraciones tóxicas causada por la salinidad produce el llamado “efecto específico”, que causa desequilibrios iónicos en las células. La acumulación de los iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  produce un desequilibrio nutricional, vinculado a la menor absorción de iones esenciales para el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Yokoi y col., 2002). La homeostasis celular permite que las células acumulen una elevada concentración de iones esenciales como  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , pero, debido al antagonismo entre el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$ , el equilibrio entre estos dos iones es esencial en la célula para mantener las distintas funciones celulares (Munns, 2005). La salinidad y la elevada concentración de  $\text{Na}^+$  en la solución externa disminuye las concentraciones de  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en los tejidos (Hu y Schmidhalter, 1997), por lo que las plantas han desarrollado diferentes mecanismos fisiológicos, metabólicos y moleculares para contrarrestar los efectos que produce la absorción y acumulación de  $\text{Na}^+$ . Estos mecanismos son descritos más adelante.

### 1.5.2. Alta temperatura

En los próximos años, se espera que el incremento de temperatura debido al cambio climático afecte a las plantas silvestres y a las especies cultivadas (Balfagon y col., 2019), lo que podría tener consecuencias devastadoras para producción y calidad de los alimentos, la conservación de la agricultura y el riego de los cultivos (IPCC, 2019). El incremento en las temperaturas estacionales también tendrá un gran impacto en la economía del sector y en la seguridad alimentaria, ya que podría convertirse en una situación prolongada en el tiempo para la que todavía no hay suficiente adaptación. El futuro de la agricultura será desalentador en regiones cálidas, a no ser que se realicen importantes inversiones en desarrollar variedades de cultivos que sean tolerantes a la alta temperatura y al consecuente estrés hídrico (Battisti y Naylor, 2009).

La temperatura óptima del cultivo del tomate está en el rango de  $25^{\circ}\text{C}$  a  $30^{\circ}\text{C}$  durante el día y en el rango de  $18^{\circ}\text{C}$ - $20^{\circ}\text{C}$  durante la noche (Camejo y col., 2005). El cultivo en condiciones de temperatura por encima de la óptima puede producir

efectos adversos en el crecimiento de las plantas (Sato y col., 2000; Zhang y col., 2014), deteriorando el funcionamiento del fotosistema II (PSII) y reduciendo el contenido total de clorofilas, lo que acaba afectando a la producción final y al rendimiento de las plantas (Lesk y col., 2016; Prasch y Sonnewald, 2015). Además de los cambios fisiológicos, el estrés por alta temperatura provoca también cambios a nivel, bioquímico y molecular (Tiroli-Cepeda y Ramos, 2010).

El estrés por alta temperatura suele ir ligado al estrés por déficit hídrico, por lo que, bajo esas condiciones, la planta responde cerrando los estomas para intentar mantener su estado hídrico (Wahid y col., 2007), lo que reducirá la cantidad de CO<sub>2</sub> disponible. Esto induce un descenso en la relación CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> en los cloroplastos, lo que puede afectar a la eficiencia del aparato fotosintético, ya que es un proceso sensible a las altas temperaturas (Wise y col., 2004). Recientemente, se ha demostrado que las plantas más tolerantes a las altas temperaturas mantienen tanto la fotosíntesis neta como la conductancia estomática en valores más altos que las que las menos tolerantes, lo que puede ser una medida determinante de selección de especies tolerantes y mejorar así la producción de los cultivos (Poudyal y col., 2019).

Como organismos sésiles, las plantas han desarrollado sistemas complejos y diversos para hacer frente al estrés producido por la alta temperatura (Ohama y col., 2017) como la acumulación de compuestos osmoprotectores (Rivero y col., 2001), el aumento en la eficacia del intercambio gaseoso (Rashid y col., 2018) o la activación de cascadas enzimáticas y transcripcionales encargadas de señalar y activar otros mecanismos de tolerancia celulares, como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), cuyos componentes de señalización todavía siguen siendo en gran parte desconocidos (Ohama y col., 2017).

### 1.5.3. Combinación de estreses

Debido al cambio climático, los cultivos se enfrentan a las crecientes amenazas de múltiples estreses abióticos, por lo que los estudios basados en la respuesta de las plantas a la combinación de estreses cada vez son más relevantes (Baral, 2019). Aunque no han sido profundamente estudiados todavía, investigar los efectos de la combinación de estreses es mucho más interesante que hacerlo de manera individual, ya que es la condición de combinación de estreses la que realmente se da en los campos de cultivo (Rivero y col., 2014). Además, se ha

demostrado que los efectos observados en plantas sometidas a la combinación de varios estreses abióticos no puede deducirse de los efectos que provocan en las plantas dichos estreses aplicados de forma individual, sino que, estos efectos son específicos de la combinación de esos estreses (Mittler y Blumwald, 2010).

El estrés combinado puede afectar de manera diferente a las plantas dependiendo del estado de desarrollo en el que se encuentren. La germinación, el crecimiento vegetativo, la floración o la reproducción pueden ser afectadas de manera diferente ante el mismo estrés, y, además, puede afectar también de manera diferente a los distintos tejidos que componen la planta (Rivero y col., 2019).

Desafortunadamente, en zonas semiáridas como el sureste peninsular, las condiciones ambientales tales como la salinidad (aguas de baja calidad para el riego y suelos salinizados) y las altas temperaturas, afectan negativamente a la producción agrícola, y reducen estos beneficios económicos considerablemente, ya que producen un impacto negativo en el desarrollo de la planta. Estas condiciones ambientales suelen actuar conjuntamente, y pueden dar lugar a devastadoras pérdidas económicas en la agricultura mundial (Rivero y col., 2014). Esas pérdidas, sumadas a las predicciones climáticas previstas por el IPCC (2012) (International Panel for Climate Change) para dentro de 50-80 años, que indican un empeoramiento de las condiciones de estrés actuales y un importante aumento de la población mundial, hacen urgente la necesidad de obtener cultivos con mayor tolerancia a condiciones de estrés abiótico.

Las diferentes condiciones de estrés medioambiental dan lugar a una reducción del crecimiento y de la producción de las plantas, debido, fundamentalmente, a una importante inhibición de la actividad fotosintética. El exceso de electrones generado por esta reducción en la fotosíntesis reaccionan con el oxígeno molecular dando lugar a la sobreproducción de ROS (Miller y col., 2008). Esta producción excesiva de ROS da lugar a múltiples disfunciones celulares como son una inhibición de las enzimas y una alteración de la eficiencia de reacciones enzimáticas dentro de la célula (Laluk y col., 2011) que participan en el metabolismo y afectan a la estabilidad de proteínas, membranas, especies de RNA y el citoesqueleto (Lugan y col., 2010; Peleg y col., 2011; Shulaev y col., 2008).

Por otro lado, las plantas tienen múltiples mecanismos de respuesta fisiológicos, metabólicos y moleculares ante los estreses de salinidad y



temperatura, que se integran entre sí para producir una respuesta final específica que haga que la planta se aclimate al medio que le rodea. Estos mecanismos son, entre otros, la regulación del potencial osmótico mediante la acumulación de solutos orgánicos denominados osmolitos o la alteración de genes que participen en la respuesta al estrés (Rivero y col., 2013). Como se indicó anteriormente, la investigación sobre la combinación de estrés debe centrarse en las combinaciones de estrés más relevantes para una región en particular, lo que permitirá a las plantas cultivadas en dichas zonas producir el mayor rendimiento posible mientras completa su ciclo de cultivo (Rivero y col., 2019).

## 1.6. RESPUESTA FISIOLÓGICA

### 1.6.1. Nutrición

El crecimiento y el metabolismo de las plantas también dependen del estado nutricional de las mismas, donde el potasio ( $K^+$ ) y el calcio ( $Ca^{2+}$ ) juegan un papel fundamental. La mayoría de los procesos bioquímicos y fisiológicos, como la síntesis de proteínas, la regulación de los estomas de las plantas, el uso del agua, el control del equilibrio iónico, la activación de enzimas y muchos otros procesos, se ven afectados por la concentración de  $K^+$ , la cual contribuye positivamente a la supervivencia de las plantas expuestas a los distintos estreses abióticos (Nieves-Cordones y col., 2019). Como se ha mencionado anteriormente, en plantas sometidas a estrés por salinidad, y debido al antagonismo entre el  $Na^+$  y el  $K^+$ , es común encontrar una deficiencia de  $K^+$  (Qu y col., 2012; Shabala y Cuin, 2008), lo que puede llevar a la formación y acumulación de ROS y al consecuente daño celular (Gong y col., 2011). Además del  $K^+$ , también se ha demostrado que el  $Ca^{2+}$  es esencial para el transporte selectivo de las células vegetales. Un aporte adicional de  $Ca^{2+}$  puede contribuir a la integridad de la pared celular y de la membrana plasmática, y por lo tanto, puede reducir los efectos negativos de la salinidad en las plantas (Martínez y Lauchli, 1993). También se ha demostrado que cuando se aplica  $Ca^{2+}$  de manera externa, la nutrición de  $K^+$  mejora en plantas crecidas en condiciones de estrés salino (Bacha y col., 2015).

Se sabe que las ROS, aparte de ser perjudiciales para el metabolismo celular, juegan un papel fundamental en la señalización de la deficiencia nutricional en

plantas. Así, la falta de  $K^+$ , produjo la acumulación de ROS en *Arabidopsis* (Bacha y col., 2015; Hernandez y col., 2012; Nieves-Cordones y col., 2019) y raíces de tomate. Por lo tanto, es interesante estudiar los efectos beneficiosos de un aumento en la concentración de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  en la solución de riego para ver sus efectos sobre el estrés oxidativo generado por la combinación de los estreses de salinidad y alta temperatura.

### 1.6.2. Homeostasis redox y estrés oxidativo

Tanto el efecto de los estreses abióticos de manera individual como de manera combinada inducen desequilibrios en la homeostasis de las células debido a la acumulación de ROS y de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Kaur y col., 2018). A pesar de su potencial para causar daño celular, se ha demostrado que, en concentraciones no tóxicas, el  $H_2O_2$  desempeña un papel clave en los mecanismos de transducción de señales, que a su vez activan respuestas de defensa a diversos factores estresantes (Zheng y col., 2018).

Para eliminar el exceso de ROS y mantener la homeostasis redox celular, las plantas tienen un sistema de defensa antioxidante bien integrado que consta de compuestos antioxidantes (como el ascorbato, glutatión,  $\beta$ -caroteno, etc.), y enzimas antioxidantes (como la superóxido dismutasa, SOD, catalasa, CAT, y aquellas involucrados en el ciclo de ascorbato-glutatión) (Ahmad y col., 2018). Cuando dos o más estreses abióticos confluyen, éstos pueden dar lugar al llamado estrés oxidativo, el cual es la consecuencia de una sobreproducción y acumulación en las células vegetales de ROS inducida por el exceso de electrones generados en los fotosistemas debido a su malfuncionamiento o daño por esos estreses abióticos. Este exceso de electrones reaccionan con el oxígeno molecular dando lugar a el anión superóxido ( $O_2^-$ ) e hidroxilo (OH), dos de las ROS más tóxicas conocidas por los daños que generan a las membranas y DNA celular (Miller y col., 2010).

Bajo condiciones óptimas, las enzimas y compuestos antioxidantes están estrictamente regulados para lograr una alta eficiencia en la detoxificación de las ROS. Sin embargo, los estreses abióticos también causan la inhibición de estas enzimas a nivel transcripcional y postranscripcional, así como modificaciones postraduccionales en las mismas que inhabilitan su función, lo que se traduce en una disminución de la eficacia de la detoxificación y, por lo tanto, una sobre-

acumulación de ROS y un daño perjudicial, irreversible en muchos casos, a las células (Kaur y col., 2018).

### *Especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species, ROS)*

Las ROS, derivados de oxígeno parcialmente reducidos o activados, son altamente reactivas y tóxicas para el entorno celular y pueden conducir a la destrucción oxidativa de la célula (Figura 5) (Garg y Manchanda, 2009).

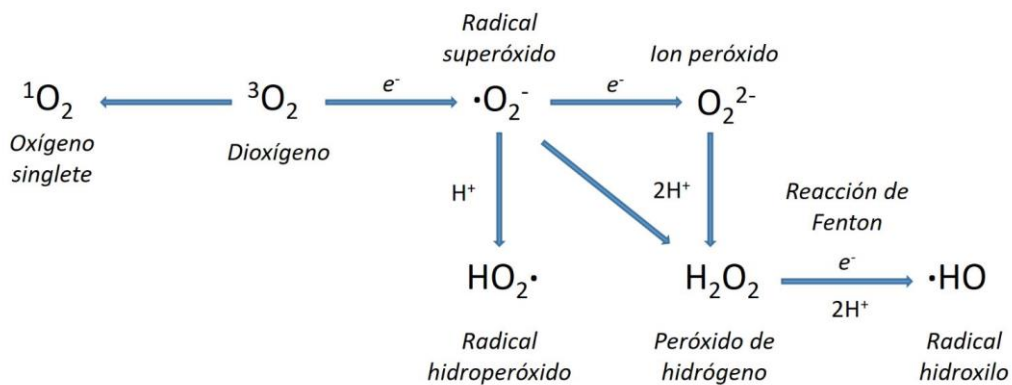


Figura 5: Ruta de las especies reactivas del oxígeno.

La producción de ROS aumenta cuando las plantas están expuestas a diferentes tipos de estrés. El principal efecto tóxico del radical superóxido  $\text{O}_2^-$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  reside en su capacidad para iniciar reacciones en cascada que dan como resultado la producción del radical hidroxilo y otras especies destructivas como el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ), que son altamente tóxicos y reactivos y causan un daño celular considerable a través de la oxidación de lípidos, proteínas y ADN (Pitzschke y col., 2006).

Las ROS han demostrado ser altamente tóxicas cuando son acumuladas en las células, pero también funcionan como moléculas de señalización de numerosos e importantes procesos biológicos cuando estas concentraciones son controladas por las enzimas y compuestos antioxidantes. Así, intervienen en los procesos de señalización implicados en el crecimiento celular, la homeostasis hormonal y la respuesta al estrés.

Las vías que regulan la homeostasis de las ROS son cruciales para mitigar su toxicidad, ya que son mecanismos altamente específicos que forma la base de la eliminación de radicales oxidativos y regulan finamente los sistemas de señalización de las ROS (D'Autreaux y Toledano, 2007). Además, desencadenan la activación de factores de transcripción que facilitan a las plantas mantener un nivel basal de ROS en el cloroplasto y en la mitocondria bajo condiciones estresantes, sitios donde la producción de oxígeno es más alta y, por lo tanto, más sensibles a la sobreproducción de estas ROS (Saini y col., 2018).

La acumulación descontrolada de ROS por la presencia de condiciones estresantes reduce la producción en la mayoría de los cultivos, y, en muchos casos, termina con la muerte prematura de la planta (Foyer y Noctor, 2005). La alta temperatura afecta a la estabilidad de proteínas, membranas, especies de ARN y a la estructura del citoesqueleto, lo que provoca un estado de desequilibrio metabólico que puede causar la acumulación de subproductos tóxicos para la célula, como las ROS (Mittler y col., 2012). La salinidad, aparte de causar los denominados estreses osmótico e iónico descritos anteriormente, también altera el balance iónico celular provocando una sobreproducción de ROS, lo que causa el descenso del crecimiento vegetal, la deficiencia de minerales y el desajuste de los parámetros fotosintéticos de la planta (Dugasa y col., 2019). Durante condiciones óptimas de crecimiento, el equilibrio entre la formación de ROS y su consumo está controlado por el sistema antioxidante de las plantas (Ahmed y col., 2013), por lo que en condiciones de estrés abiótico, las plantas que presentan mayor actividad de las enzimas antioxidantes, han demostrado ser más resistentes al daño oxidativo (Gapinska y col., 2008; Silva y col., 2013).

### *Peroxidación lipídica*

Bajo condiciones de estrés, la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducida, primeramente, por una activación de la enzima SOD que detoxifica las especies O<sub>2</sub><sup>-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y posteriormente por una previa inhibición de las principales enzimas implicadas en su detoxificación (CAT, POD y las enzimas del ciclo AsA-GSH) en las células provoca la peroxidación de los lípidos de las membranas, tanto de la membrana plasmática, como de las membranas que envuelven a los distintos orgánulos celulares. Este proceso es considerado como el más perjudicial que se conoce en un organismo vivo, ya que conlleva inevitablemente a la muerte celular. La

peroxidación lipídica (Figura 6) es una reacción en cadena que se inicia cuando los radicales libres reaccionan con los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares (Fam y Morrow, 2003). A nivel global, la peroxidación lipídica causa un incremento en la fluidez de la membrana de la célula y en su porosidad, un incremento en el paso de sustancias a través de la membrana que en condiciones normales no la atravesarían y daños en las proteínas de membrana, lo que conlleva a la inactivación de receptores, enzimas y canales iónicos (Gill y Tuteja, 2010).

Éste es un proceso que implica la formación y propagación de radicales lipídicos, la captación de oxígeno, un reordenamiento de los dobles enlaces en los lípidos insaturados y la destrucción final de los lípidos de la membrana, produciendo una variedad de productos de degradación, incluidos alcoholes, cetonas, aldehídos y éteres. (Buege y Aust, 1978).

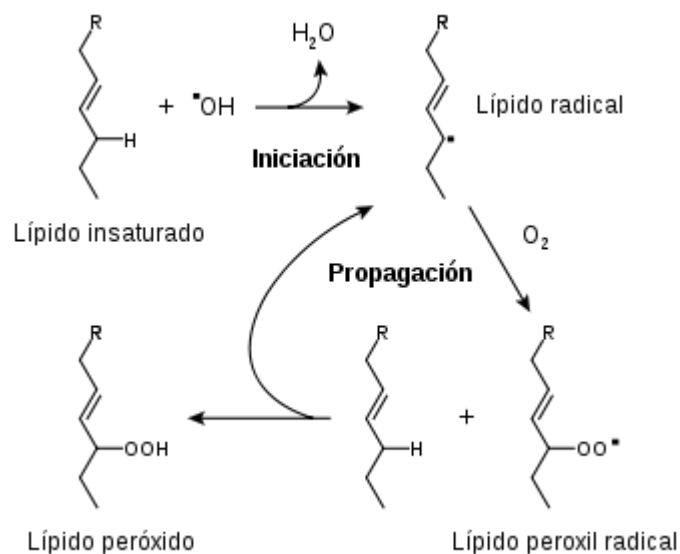


Figura 6: Reacción en cadena de la peroxidación lipídica.

Uno de esos productos de degradación es el manodialdehído (MDA), el cual es capaz de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) produciendo compuestos coloreados, por lo que analizar la concentración total de MDA será una manera de medir el daño a las membranas celulares causado por el estrés oxidativo (Davis y Swanson, 2001). La peroxidación lipídica está asociada con el daño celular

causado por diversas condiciones de estrés ambiental (Huang y col., 2009). La sequía y la salinidad inducen la acumulación de  $H_2O_2$  con el consiguiente aumento de la peroxidación de los lípidos, lo que provoca la inestabilidad de la membrana y la muerte celular junto a una reducción significativa de la biomasa vegetal (Nxele y col., 2017). El estrés por alta temperatura también produce daños en las membranas celulares de las plantas debido a la acción de la peroxidación lipídica, especialmente en plantas que son más sensibles a dicho estrés. (Xu y col., 2006)

Como la peroxidación lipídica es el síntoma más atribuido al daño celular, a menudo se usa como un marcador del estrés oxidativo en las plantas (Hernandez y col., 2000; Khan y Panda, 2008). Babu y Devaraj (2008) demostraron que el contenido de MDA aumentaba en plantas que crecían bajo condiciones salinas, por lo que las plantas que mostraban un mejor crecimiento bajo dichas condiciones presentaban menor contenido de MDA, lo que indica que la tolerancia a la sal está relacionada con una peroxidación lipídica menos activa (Taibi y col., 2016; Torun, 2019). Torun (2019) también demostró recientemente que los niveles más bajos de peroxidación lipídica en la raíz sugieren una mejor protección contra el daño oxidativo causado por los estreses combinados de salinidad, sequía y alta temperatura, ya que las raíces que obtenían mejor crecimiento, presentaban un sistema antioxidante más eficiente.

Por otro lado, se ha demostrado que la aplicación externa de ciertos compuestos con función antioxidante puede reducir la peroxidación de los lípidos de membrana y, de esta manera, el daño oxidativo. Así, nuestro grupo demostró que una aplicación exógena de melatonina en las plantas de tomate reduce el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica causados por la combinación de los estreses de salinidad y alta temperatura (Martinez y col., 2018). En otro estudio, la aplicación externa de nanopartículas de ZnO en cilantro incrementó la fotosíntesis y redujo la peroxidación lipídica (Pullagurala y col., 2018). La aplicación, también externa, de ácido alfalipoico indujo el sistema antioxidante y mejoró la peroxidación lipídica (Terzi y col., 2018). Evitar el daño celular causado por la peroxidación lipídica es un campo de estudio muy actual.

### 1.6.3. Sistema antioxidante

Como se ha mencionado anteriormente, el estrés abiótico provoca estrés oxidativo en las células de la planta, lo que conduce a la generación de ROS, a la peroxidación lipídica y al consecuente daño celular (Asada, 2006). Durante las condiciones ideales de crecimiento, el sistema antioxidante de la planta controla firmemente la producción y utilización de ROS (Hameed y col., 2013), lo que reduce considerablemente el daño oxidativo gracias a la acción de las enzimas que participan en dicho sistema (Figura 7) (Gapinska y col., 2008).

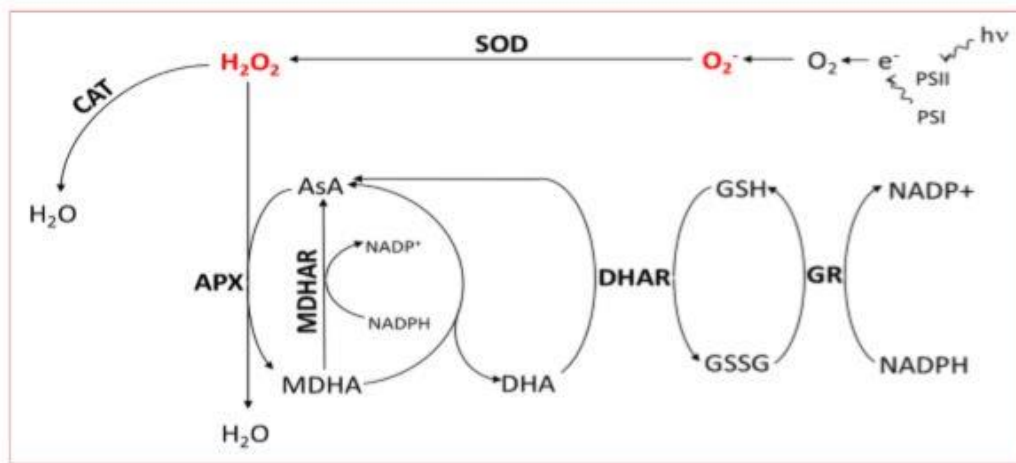


Figura 7: Esquema de las enzimas implicadas en el metabolismo oxidativo de la planta.

Las células han desarrollado un elaborado sistema de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que ayudan a mantener una baja concentración celular de las ROS generados localmente. Diversos sistemas de protección incorporan antioxidantes de bajo peso molecular como carotenoides, ascorbato y glutatión y, adicionalmente, enzimas detoxificadoras de ROS, como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), peroxidasa (POD) y glutatión reductasa (GR) (Dugasa y col., 2019).

En este sentido, la SOD representa la primera línea de defensa celular detoxificando el radical superóxido en H₂O₂ (Monk y col., 1989). Sin embargo, este H₂O₂ sigue siendo tóxico para las células cuando se acumula en altas concentraciones, por lo que en su detoxificación intervienen diferentes enzimas,

entre las que destacan la CAT o POD, mencionadas anteriormente (Ighodaro y Akinloye, 2018) o las enzimas pertenecientes al ciclo AsA-GSH. El ciclo AsA-GSH está integrado por las enzimas ascorbato peroxidasa (APX), dehidro y monodehidro ascorbato reductasa (DHAR, MDHAR) y glutatión reductasa (GR). Todas ellas se articulan en una cascada de oxidación/reducción de los antioxidantes ascorbato y glutatión (Figura 7), cuyo único y último fin es la detoxificación del  $H_2O_2$  en distintas organelas, como las mitocondrias, los cloroplastos y el citosol (Jimenez y col., 1997; Zhang y col., 2000)

Al determinar el papel de varios antioxidantes en la tolerancia a la salinidad en plantas de tomate, se correlacionó una mayor tolerancia a dicho estrés con el aumento de las actividades de SOD (superóxido dismutasa), APX (ascorbato peroxidasa) y POD (guiacol peroxidasa) (Mittova y col., 2002). Por otro lado, la tolerancia al estrés producido por la alta temperatura también se relacionó con un aumento de actividad de dichas enzimas (Wang y Li, 2006), por lo que la resistencia de las plantas a estreses abióticos está muy relacionada con la mejora de la actividad del sistema antioxidante.

Para contrarrestar también el daño celular, las plantas acumulan osmoprotectores, como betaínas, azúcares no estructurales y aminoácidos, como la prolina, así como diferentes ácidos fenólicos con capacidad antioxidante (Delauney y Verma, 1993; Stoop y col., 1996). El ácido ascórbico (vitamina C), los tocoferoles y los carotenoides también desempeñan un papel fundamental dentro del sistema antioxidante celular no enzimático (Ahmad y col., 2010). Se ha demostrado que la glicinabetaína y la prolina juegan un papel adaptativo en la mediación del ajuste osmótico y la protección de las estructuras subcelulares en plantas cultivadas bajo estrés salino (Garg y col., 2010; Hsu y col., 2003; Yang y col., 2003), y, de igual manera, la acumulación de trehalosa aumenta la tolerancia al estrés producido por las altas temperaturas (Muller y col., 1995).

No obstante, los mecanismos de tolerancia de las plantas a distintos estreses como la salinidad y la alta temperatura son complejos, ya que, en muchos casos, estos varían, no solo entre especies, sino también entre cultivos dentro de una misma especie (Ashraf, 2002).



## 1.7. RESPUESTA AGRONÓMICA

El cultivo del tomate ha evolucionado en los últimos años en las zonas de producción, pasando de ser un cultivo manual a un cultivo más tecnificado. El cultivo sin suelo en invernadero se ha incrementado en zonas como el suroeste español, ya que estos sistemas permiten que la nutrición y el riego de las plantas se controle de forma más eficiente (Rodríguez y col., 2014), además de reducir la incidencia de problemas patológicos, el consumo de agua y la contaminación de suelos producida por los nitratos y pesticidas (Putra y Yuliando, 2015). Numerosos estudios han demostrado que el rendimiento del cultivo y la calidad del fruto están condicionados por factores agronómicos como el sistema de producción (Urrestarazu, 2013), el riego (De Pascale y col., 2001) y la nutrición (Warner y col., 2004), por lo que es de vital importancia dilucidar también cómo afecta la combinación de los estreses de salinidad y alta temperatura a los frutos de tomate.

### 1.7.1. Calidad del fruto

La producción agrícola de vegetales frescos en invernadero ofrece mejores parámetros de calidad respecto a las que se realizan en campo abierto, debido a que los cultivos no están tan expuestos a las condiciones climáticas adversas (Gruda, 2005). El tomate es moderadamente sensible a la salinidad, ya que puede tolerar hasta 2,5 dS/m de conductividad eléctrica en el agua de riego para que se produzca un impacto negativo en su rendimiento (Rosadi y col., 2014). No obstante, las plantas de tomate que tienen un mejor rendimiento presentan menor concentración de Cl<sup>-</sup> y Na<sup>+</sup> en las hojas, y los frutos de la variedad *S. lycopersicum* cerasiforme son menos sensibles a la salinidad que los frutos de *S. lycopersicum* actual (Caro y col., 1991). Por otro lado, la temperatura constantemente elevada produce una maduración más rápida de los frutos, lo que ocasiona pérdidas de hasta el 50% en el rendimiento de los cultivos (Metwali y col., 2015) y una reducción de la vida útil de la fruta (Lara y col., 2009).

Aunque la maduración es un proceso genéticamente programado que culmina en cambios en el color, la textura y el sabor de los frutos (Giovanelli y col., 1999), se ha demostrado que la composición química del tomate, y por consiguiente su calidad, puede variar en función del tipo de cultivo y de las condiciones ambientales en las que crecen las plantas (Thompson y col., 2000). Los tomates son

frutos climatéricos, y su maduración está acompañada por cambios en sus propiedades físicas, químicas y organolépticas. Durante este proceso se degrada la clorofila y se sintetizan carotenoides como el licopeno y el  $\beta$ -caroteno, giberelinas, quinonas y esteroides (Fraser y col., 1994). Con la maduración, el fruto pierde firmeza debido a la degradación de la pared celular y a la solubilización de las pectinas (Marin-Rodriguez y col., 2002).

La calidad del tomate engloba múltiples rasgos que son de mayor o menor importancia dependiendo del público interesado. Así, la calidad comercial se basa, principalmente, en el atractivo externo del tomate, como su forma, color, tamaño, firmeza y vida útil. La calidad organoléptica, en cambio, además de los rasgos físicos mencionados, también depende de rasgos químicos como la acidez y el contenido en azúcares (Gao y col., 2019) que determinan su sabor general (Bertin y Genard, 2018).

Como se ha mencionado con anterioridad (Tabla 3), el fruto del tomate contiene azúcares reductores como fructosa, glucosa y sacarosa, que constituyen hasta el 65% de los sólidos solubles totales. Los ácidos presentes en el fruto son el ácido cítrico, el ácido málico y el ácido ascórbico (vitamina C) (Davies y Hobson, 1981). Además, los frutos también contienen carotenoides como el licopeno, responsable del color, y compuestos volátiles, como el hexil butirato (HB), responsable del aroma del tomate (Wang y col., 2016). El sabor del fruto depende en gran medida de la interacción de los sólidos solubles y los ácidos orgánicos que haya en su composición. En general, el buen sabor del tomate se relaciona con un contenido alto de azúcares y ácidos orgánicos, ya que el desequilibrio entre estos dos factores produce frutos insípidos o demasiado ácidos (Tieman y col., 2017).

Poco se conoce sobre el efecto de los estreses combinados de salinidad y alta temperatura en los parámetros de calidad del fruto de tomate, por lo que su estudio es fundamental para mejorar el tanto el rendimiento como la calidad de las futuras cosechas.

## **II - JUSTIFICACIÓN**



## II. JUSTIFICACIÓN

Las pérdidas económicas generadas en la agricultura debido a los estreses abióticos están estimadas entre 14-19 mil millones de euros anuales. Las predicciones actuales referentes al cambio climático indican un incremento en las temperaturas y una importante reducción de la calidad de las aguas de riego, que, junto con las estimaciones en el incremento de la población mundial, hacen urgente la necesidad de buscar alternativas en la generación de cultivos con una mayor tolerancia a los distintos estreses abióticos.

Tradicionalmente, los estudios sobre la respuesta de las plantas sometidas a estrés se han realizado aplicando estreses simples, sin embargo, este tipo de análisis no refleja las condiciones reales que se dan en el campo, donde los cultivos tienen que hacer frente a la combinación más estreses. Se ha demostrado que la respuesta de las plantas de tomate a la combinación de salinidad y alta temperatura es específica, y no puede ser deducida de la respuesta de las plantas cuando los estreses se plican por separado.

Así, la hipótesis principal que se plantea en este estudio es que la identificación de los procesos metabólicos y fisiológicos que intervienen en la tolerancia a la combinación de salinidad y alta temperatura permitirá establecer criterios para mejorar y obtener variedades más tolerantes a la combinación de estreses abióticos. Para ello, primero se investigará si un aumento en la concentración de potasio ( $K^+$ ) y calcio ( $Ca^{2+}$ ) en la solución nutritiva puede tener un efecto positivo en la mejora del estrés oxidativo que ocurre bajo la combinación de salinidad y alta temperatura en el tomate. Y, por otro lado, también se hará una selección de distintas líneas de tomate de una población de líneas recombinantes (RILs) que difieran en su tolerancia a la combinación de salinidad y alta temperatura, y en ellas se estudiarán parámetros tanto fisiológicos como agronómicos, utilizando técnicas e instrumentación de última generación, con el fin de establecer relaciones entre la tolerancia a la combinación de estreses y los procesos implicados.



## **III - OBJETIVOS**





### III. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo general de este proyecto es la identificación de mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares implicados en la tolerancia de las plantas de tomate a la combinación de salinidad y altas temperaturas mediante el uso de plantas de tomate comerciales y líneas recombinantes de tomate sensibles y tolerantes a dichas condiciones.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudio del efecto de la nutrición vegetal sobre la respuesta antioxidante de las plantas de tomate a la combinación de salinidad y altas temperaturas.
2. Screening y selección de RILs de tomate según su tolerancia a la combinación de salinidad y alta temperatura.
3. Caracterización fisiológica de las líneas recombinantes seleccionadas bajo condiciones de combinación de salinidad y alta temperatura
4. Diferencias en la respuesta agronómica, en condiciones comerciales de cultivo, de la tolerancia a la combinación de estreses abióticos y de los procesos más importantes relacionados con ésta e identificados en los objetivos anteriores.



# **IV - MATERIALES Y MÉTODOS**



## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL VEGETAL

El experimento realizado en el capítulo 1 fue llevado a cabo con plantas de *Solanum lycopersicum* L. variedad "boludo", que fueron ofrecidas por Monsanto (Torre Pacheco, Murcia, España). Esta variedad comercial fue seleccionada para este experimento debido a que es muy apreciada por el consumidor, ya que tiene un calibre uniforme, buena firmeza, forma y color y un periodo amplio de postcosecha.

Los experimentos de los capítulos 2,3 y 4 se llevaron a cabo con el material vegetal único disponible en base a un acuerdo entre CEBAS-CSIC con el "The World Vegetable Center" (AVRDC). Se trató de una población de *Solanum lycopersicum* L. proveniente del cruce entre *Solanum lycopersicum* L. CLN2498E x *S. pimpinellifolium* L. LA1579. El motivo de utilizar una población de líneas recombinantes isogénicas (RILs) de tomate es el que, al poseer cada una de las líneas recombinantes obtenidas del entrecruzamiento una combinación genética de los parentales única, la respuesta de tolerancia a la combinación de salinidad y altas temperaturas (heredada del progenitor silvestre tolerante *S. pimpinellifolium* L.), también es única y diferente, lo que las hace muy interesantes desde el punto de vista de identificación de los distintos mecanismos de tolerancia a la combinación de estos estreses abióticos.

### 4.2. MATERIAL VEGETAL

#### 4.2.1. Descripción de los invernaderos

Los experimentos fueron realizados en dos invernaderos (Imagen 2) situados en la finca experimental "Tres Caminos" del Centro de Edafología y Biología aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), situada en la matanza, en el municipio de Santomera (Murcia).

Estos invernaderos consistían en dos módulos independientes y automatizados. Cada módulo tenía 462,5 m<sup>2</sup>, estaban contruidos en policarbonato y disponían de doble capilla y ventilación cenital en mariposa.



Imagen 2: Fotografía de los invernaderos en la finca experimental "Tres Caminos".

Para el control de los diferentes parámetros de temperatura, humedad, ventilación y radiación, los distintos módulos disponían de varios dispositivos como sistema de ventilación cenital, pantalla de sombreado, sistema de humidificación y de refrigeración. Ambos invernaderos incluían, además, un sistema de sensores de radiación, de temperatura y de humedad relativa colocados a una altura de 1,5 m.

#### 4.2.2. Descripción de las cámaras de cultivo

Para los experimentos que se realizaron en cámara de cultivo se utilizaron dos cámaras (Imagen 3) situadas en la finca experimental anteriormente descrita (misma donde estaban situados los invernaderos), las cuales tenían unas condiciones de luz de 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , un fotoperiodo de 16/8 h día/noche, una humedad del 60-65% y una temperatura de 25°C.



Imagen 3: Detalle de una de las cámaras de cultivo durante la realización de los experimentos.

Las dos cámaras de cultivo usadas eran idénticas, y las condiciones de luz, fotoperiodo y humedad eran controladas de manera independiente desde un programa informático.

#### 4.3. SOLUCIÓN NUTRITIVA

La concentración de nutrientes de la solución nutritiva Hoagland utilizada durante todos los experimentos se recoge en la Tabla 5 y Tabla 6. La solución nutritiva fue administrada durante la realización de los experimentos ajustando la dosis al estado de desarrollo en el que se encontraban las plantas.

Tabla 5: Concentración de sales y macronutrientes utilizadas para la preparación de la solución nutritiva.

Compuesto	Solución madre				Solución de trabajo		
	PM	Concentración	Dis. final	Dis. final	Elemento	Concentración final	
	g/mol	M				(g/L)	(ml/L)
KNO <sub>3</sub>	101,10	1,00	101,10	6,0	N	14	195
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	236,16	1,00	236,16	4,0	K	7	273
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	1,00	136,09	1,0	Ca	4	160
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	246,49	1,00	246,49	1,0	P	1	31
					S	1	32
					Mg	1	24

Tabla 6: Concentración de sales y micronutrientes utilizadas para la preparación de la solución nutritiva.

Compuesto	Solución madre				Solución de trabajo		
	PM	Concentración	Dis. final	Dis. final	Elemento	Concentración final	
	g/mol	mM				(g/L)	(ml/L)
KCl	74,55	50,0	3,728	1,0	Cl	50,0	1,77
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61,84	25,0	1,546	1,0	B	25,0	0,27
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	169,01	2,0	0,338	1,0	Mn	2,0	0,11
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	287,55	2,0	0,575	1,0	Zn	2,0	0,13
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	249,71	0,5	0,125	1,0	Cu	0,5	0,03
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1235,86	0,5	0,620	1,0	Mo	0,5	0,05
Fe-EDTA			18,60	1,0	Fe	20,0	1,12



#### 4.4. EXPERIMENTOS

##### 4.4.1. Experimento 1: Optimización de la nutrición para aumentar la tolerancia a la combinación de estreses abióticos

###### *Ensayo preliminar*

Antes de llevar a cabo el experimento principal, se hizo un experimento preliminar con el fin de establecer las concentraciones de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  añadidas a la solución nutritiva que podrían causar un efecto positivo en el crecimiento de las plantas bajo condiciones de estrés combinado, y, más específicamente, bajo condiciones de salinidad y alta temperatura. Para ello, plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Boludo) fueron germinadas en vermiculita en cámara de cultivo bajo condiciones controladas y óptimas de luz ( $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), fotoperiodo (16/8 h día/noche), humedad (60-65%) y temperatura ( $25^\circ\text{C}$ ). Estos parámetros se mantuvieron constantes, y cada 2 días se les aplicó solución  $\frac{1}{2}$  Hoagland (modificada a la mitad de nutrientes) sumergiendo la base del semillero en la solución nutritiva. Cuando las plantas alcanzaron una altura de unos 10 cm, un total de 96 plantas se trasplantaron a cultivo hidropónico en cubos de 20 L, disponiendo 2 plantas por cubo, los cuales contenían la solución nutritiva Hoagland completa bajo una aireación continua. Las plantas crecieron bajo las condiciones óptimas anteriormente descritas durante 10 días, con el fin de que se adaptaran al sistema.

Después de esos 10 días, la mitad de las plantas (un total de 48) fueron transferidas a otra cámara de cultivo, que tenía las mismas características de luz, fotoperiodo, y humedad que la anterior, pero donde la temperatura ambiental era de  $35^\circ\text{C}$ . Ese mismo día se aplicaron los distintos tratamientos que aparecen en la Tabla 7.

Tabla 7: Tratamientos aplicados a las plantas de tomate en el experimento preliminar con el fin de seleccionar el más significativo para el siguiente experimento. La concentración está expresada en mM.

Cámara de cultivo	Tratamientos	[NaCl]	[K <sup>+</sup> ]	[Ca <sup>2+</sup> ]
Cámara A (25°C)	Control	0	7	4
	Salinidad	60	7	4
	Salinidad + T1	60	8	4,7
	Salinidad + T2	60	9,8	5,6
	Salinidad + T3	60	11	6,5
	Heat	0	7	4
Cámara B (35°C)	Salinidad + Temperatura	60	7	4
	Salinidad + Temperatura + T1	60	8	4,7
	Salinidad + Temperatura + T2	60	9,8	5,6
	Salinidad + Temperatura + T3	60	11	6,5

La solución nutritiva era renovada en su totalidad cada 3 días, y el pH era mantenido entre 5,5-5,7. Las plantas se mantuvieron bajo esas condiciones durante 21 días, momento en el cual se procedió a su muestreo, separándose hojas, tallos y raíces. Durante esta separación se procedió a determinar el peso fresco de cada planta y tratamiento. La mitad de las plantas fueron introducidas en una estufa de aire forzado a 70°C, y tras 3 días se procedió a la determinación del peso seco. Tomando como base los resultados obtenidos en este experimento preliminar, se seleccionó el tratamiento 2 (T2) como el adecuado para el siguiente experimento, ya que fue el que mayor biomasa presentó bajo condiciones de estrés.

#### *Ensayo de optimización de la nutrición*

Plantas de tomate (*S. lycopersicum* cv. Boludo) fueron germinadas bajo las mismas condiciones descritas en el experimento preliminar. Cuando las plantas tuvieron una altura de 8-10 cm, un total de 48 plantas se trasplantaron a cubos de 120 litros en un sistema hidropónico en el invernadero, donde los cubos estaban llenos de solución nutritiva Hoagland completa y ésta era aireada de forma constante. Las plantas permanecieron 10 días bajo condiciones control con el fin de que se adaptaran al sistema. Después de este tiempo, las plantas fueron divididas entre dos invernaderos distintos (24 plantas por invernadero), y se comenzaron a

aplicar los distintos tratamientos de salinidad y temperatura durante 30 días. En la siguiente tabla (Tabla 8) se muestran los distintos tratamientos aplicados.

Tabla 8: Tratamientos aplicados a las plantas de tomate en el experimento principal bajo condiciones de invernadero para las determinaciones fisiológicas, bioquímicas y moleculares. La concentración está expresada en mM.

Invernadero	Tratamientos	[NaCl]	[K <sup>+</sup> ]	[Ca <sup>2+</sup> ]
Invernadero A (25°C)	Control	0	7	4
	Salinidad	60	7	4
	Salinidad + K/Ca	60	9,8	5,6
	Heat	0	7	4
Invernadero B (35°C)	Salinidad + Temperatura	60	7	4
	Salinidad + K/Ca	60	9,8	5,6

Cubos de 120 L fueron distribuidos aleatoriamente en cada uno de los invernaderos, hasta obtener con un total de seis plantas por tratamiento. El pH de la solución nutritiva se mantuvo entre 5,5 y 5,7 durante todo el experimento (Imagen 4). Debido a la pérdida de agua desde el cubo al ambiente por transpiración de las plantas, los cubos se fueron rellenando cada dos días, ajustándose el pH y la conductividad de manera individual.

Para aplicar el tratamiento de temperatura o de combinación de temperatura y salinidad, uno de los invernaderos se programó para que alcanzara un máximo de 35°C (Invernadero B), mientras que el otro invernadero se mantuvo con una temperatura de 25°C (para los tratamientos control y salinidad).



Imagen 4: Detalle de las plantas de tomate cultivadas en los cubos de 120 litros durante la consecución del experimento.

Treinta días después de empezar los tratamientos, las plantas fueron cosechadas y divididas en hojas, tallo y raíz para determinar el peso fresco de cada una de las partes. De la mitad de las plantas, se seleccionaron hojas correspondientes a la sexta, séptima y octava posición en el tallo y se sumergieron en nitrógeno líquido para futuras determinaciones bioquímicas y moleculares. La otra mitad de las plantas fue guardada en una estufa a 70°C durante 3 días, con el fin de determinar el peso seco. Dicho material fue también utilizado para los análisis de ionómica.

#### **4.4.2. Experimento 2: Selección de líneas recombinantes de tomate con diferente tolerancia a la combinación de salinidad y alta temperatura**

##### *Selección de líneas en invernadero*

Se llevó a cabo un experimento preliminar con 84 líneas recombinantes (RILs, de aquí en adelante) con el fin de realizar un screening de tolerancia a la combinación de salinidad y alta temperatura.

Las plantas fueron sometidas a dos tratamientos diferenciados en los dos módulos de invernaderos descritos anteriormente. En uno de los invernaderos (invernadero A) las condiciones climáticas establecidas fueron las más próximas al óptimo desarrollo de las plantas, por lo que la temperatura del invernadero era de unos 25°C/20°C día/noche y una HR del 60-85%. De esta manera, y teniendo en cuenta las condiciones de cultivo, se llamó al invernadero A el tratamiento "Control".

En el otro invernadero (Invernadero B), las plantas fueron sometidas a los tratamientos de salinidad y temperatura de manera conjunta. La temperatura del invernadero se fijó en 35°C/30°C día/noche y una HR del 60-85%, y a las plantas se les suministraba una solución nutritiva Hoagland modificada a la que se le añadió 75 mM de NaCl. A este módulo se le denominó tratamiento "Combinación".

Las semillas fueron germinadas en semilleros con una base de lana de roca previamente humedecida con agua en la que se colocaron las semillas de las distintas RILs, las cuales fueron germinadas previamente en cámara de cultivo con unas condiciones de luz de 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , un fotoperiodo de 16/8 h día/noche, una humedad del 60-65% y una temperatura de 25°C, tal y como se hizo en los

anteriores experimentos. Estos parámetros se mantuvieron constantes, y cada 2 días se les aplicó solución  $\frac{1}{2}$  Hoagland (modificada a la mitad de nutrientes) sumergiendo la base del semillero en la solución.

Las semillas germinaron a los 6 días desde su siembra. Después de la germinación a las plantas se les aplicó solución Hoagland completa durante 3 semanas, tiempo en el que se realizó el trasplante a los invernaderos antes descritos.

El trasplante se llevó a cabo en sacos de lana de roca de 1,5 m de longitud previamente humedecidos, y a las plantas se les administró la solución Hoagland mediante riego por goteo desde su trasplante y durante todo el experimento. Los sacos estaban dispuestos sobre canales hidropónicos en los dos invernaderos. Tres plantas de cada línea fueron trasplantadas en cada saco, y la disposición final de las plantas en los distintos invernaderos fue la siguiente (Imagen 5):



Imagen 5: Detalle de las plantas en uno de los módulos del invernadero.

Cada línea constaba de 6 repeticiones, por lo que cada módulo tenía un total de 504 plantas.

Los tratamientos empezaron a aplicarse unos días después del trasplante, cuando las plantas ya habían alcanzado una altura de unos 10cm. Las plantas estuvieron bajo el efecto de los tratamientos durante 3 semanas y hasta justo hasta antes del momento de la floración.

Tras 21 días bajo los diferentes tratamientos detallados anteriormente, la parte aérea de todas las líneas y tratamientos fueron cosechadas y se determinó el peso fresco (PF) y peso seco (PS) de las plantas para calcular el grado de tolerancia de cada una de las líneas.

### *Selección de líneas en cámara de cultivo*

De las 84 RILs cultivadas en el experimento anterior, y teniendo en cuenta su porcentaje de tolerancia a la combinación de salinidad y alta temperatura, se seleccionaron 12 líneas con distintos grados de tolerancia con las que se procedió a realizar el siguiente experimento.

Las semillas correspondientes a las 12 líneas seleccionadas fueron germinadas en bandejas de vermiculita siguiendo los mismos criterios y parámetros del experimento anterior. Cuando las plántulas tuvieron un tamaño medio de 5-8 cm y habían pasado unas 3 semanas desde la germinación, las plantas fueron trasplantadas a un sistema de cultivo hidropónico en cubos opacos de 18L de capacidad, y éstas fueron introducidas en las cámaras de cultivo. Se colocaron 3 plantas de cada línea en cada cubo, los cuales estaban totalmente llenos de solución Hoagland completa. Además, los cubos estaban provistos de un sistema de aireación continua con el objetivo de mantener una buena oxigenación de las raíces. Esta solución era renovada completamente cada 3 días, y el pH se mantuvo diariamente entre 5,5-5,7.

Las plantas fueron crecidas bajo condiciones control durante aproximadamente una semana, tiempo necesario para que éstas se adaptasen al sistema y las condiciones reinantes tras su trasplante. Después de este tiempo, la mitad de las plantas de cada línea fueron transferidas a otra cámara de cultivo. Así, una de las cámaras, la Cámara A, tuvo una temperatura fija de 20°C/25°C, óptima para el desarrollo de las plantas, y se les aplicaba una solución Hoagland completa. En la otra cámara, Cámara B, se incrementó la temperatura ambiental a 35°C y además, la solución nutritiva Hoagland fue modificada añadiéndole 75 mM de NaCl (Tabla 9).

La disposición final de los tratamientos en las cámaras fue la siguiente:

Tabla 9: Disposición de los distintos tratamientos en las cámaras de cultivo durante el experimento 2.

	Cámara A		Cámara B	
	Bandeja A	Bandeja B	Bandeja A	Bandeja B
<b>Temperatura</b>	25°C	25°C	35°C	35°C
<b>Salinidad</b>	0 mM	0 mM	75 mM	75 mM

A los 15 días desde que se empezaron a aplicar los tratamientos, las plantas fueron cosechadas para determinar el peso fresco (PF) y el peso seco (PS) de las mismas. De los datos obtenidos en relación a su PF y PS se seleccionaron de nuevo 5 de estas 12 líneas, con distintas tolerancias a la combinación de salinidad y alta temperatura para el experimento siguiente (Imagen 6).



Imagen 6: Distintas líneas RILs de tomate cultivadas en la cámara de cultivo.

#### 4.4.3. Experimento 3: Respuesta fisiológica de 5 líneas recombinantes seleccionadas con diferente tolerancia a la combinación de estreses abióticos

Este experimento fue diseñado con el fin de realizar un estudio más completo de las 5 líneas seleccionadas con distintos rangos de tolerancia procedentes del experimento anterior.

Las semillas de estas 5 RILs fueron germinadas en semilleros con vermiculita en la cámara de cultivo bajo condiciones óptimas, siguiendo los criterios y parámetros de los experimentos anteriores. A los 10 días de la germinación, se trasplantaron un total de 80 plántulas, 16 plántulas de cada línea, al sistema de cultivo hidropónico compuesto de cubos de 18 L de capacidad con aireación continua. Se dispusieron 2 plántulas por cubo y se dejaron crecer durante 7 días. La solución nutritiva era renovada cada 3 días manteniendo el pH de la solución entre 5,5 y 5,7.

A los 7 días del trasplante se comenzaron a aplicar los tratamientos de salinidad y temperatura, tanto de manera simple como combinada. De esta manera, en la cámara A, se fijaron unas condiciones de luz de  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , un fotoperiodo de 16/8 h día/noche, una humedad del 60-65% y una temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ . A la mitad de las plantas de cada línea (es decir a un total de 4 plantas por línea) se le aplicó una solución nutritiva Hoagland con 75 mM de NaCl. De esta manera, en la cámara A se situaron los tratamientos Control ( $25^{\circ}\text{C} + 0 \text{ mM NaCl}$ ) y salinidad ( $25^{\circ}\text{C} + 75 \text{ mM NaCl}$ ). En la cámara B, las condiciones de luz, fotoperiodo y humedad fueron idénticas a las descritas anteriormente para la cámara A, pero la temperatura ambiental se incrementó a  $35^{\circ}\text{C}$ . En esta cámara, la mitad de las plantas recibieron una solución nutritiva Hoagland completa y la otra mitad esta solución junto con 75 mM NaCl, teniendo en esta cámara B los tratamientos de alta temperatura ( $35^{\circ}\text{C} + 0 \text{ mM NaCl}$ ) y alta temperatura + salinidad ( $35^{\circ}\text{C} + 75 \text{ mM NaCl}$ ). De manera resumida, los tratamientos aplicados quedaron tal y como se recoge en la Tabla 10.

Tabla 10: Disposición de los distintos tratamientos en las cámaras de cultivo durante el experimento 3.

	Cámara A		Cámara B	
	Bandeja A	Bandeja B	Bandeja A	Bandeja B
<b>Temperatura</b>	$25^{\circ}\text{C}$	$25^{\circ}\text{C}$	$35^{\circ}\text{C}$	$35^{\circ}\text{C}$
<b>Salinidad</b>	0 mM	75 mM	0 mM	75 mM

Transcurridos 7 días después del comienzo de los tratamientos, las plantas fueron cosechadas, separándose la parte aérea (hojas y tallos) del sistema radicular,



y determinándose el peso fresco (PF) de cada una de las partes. La mitad de las plantas fueron inmediatamente sumergidas en N líquido para las posteriores determinaciones bioquímicas y moleculares y la otra mitad fueron introducidas en una estufa de aire forzado a 70°C durante 3 días para la determinación del peso seco (PS). De este material seco se determinó, además, el contenido iónico. Durante el experimento se llevaron a cabo varias determinaciones, como fueron potencial hídrico y osmótico, parámetros fotosintéticos y parámetros relacionados con la fluorescencia de las clorofilas.

#### **4.4.4. Experimento 4: Respuesta agronómica de líneas de tomate con diferente tolerancia a la combinación de estreses**

Para este último ensayo se procedió a la selección de dos líneas recombinantes del experimento anterior con porcentajes de tolerancia a la combinación de salinidad y alta temperatura dispares, es decir, se seleccionó la más tolerante y la menos tolerante a esas condiciones.

Para llevar a cabo este experimento, las semillas fueron germinadas en semilleros con una base de lana de roca previamente humedecida con agua, siguiendo los criterios y las condiciones de los experimentos anteriores. Las semillas germinaron a los 6 días desde su siembra, y 3 semanas después se trasplantaron a sacos de cultivo de lana de roca en el invernadero. El trasplante se llevó a cabo en canales hidropónicos similares a los del Experimento 1 transplantándose 3 plántulas de la misma línea en cada saco. (Imagen 7).

Cada línea constaba de 18 repeticiones, por lo que al final se tenían 18 plantas de cada tratamiento. Los tratamientos empezaron a aplicarse unos 5 días después del trasplante, y la salinidad fue aumentando de forma progresiva. El experimento se llevó a cabo durante 4 meses, hasta que se tuvieron suficientes datos de producción y calidad.

Ambas líneas seleccionadas fueron cultivadas en los dos módulos diferenciados de invernadero anteriormente descritos (Experimento 1). Las plantas de ambas líneas fueron sometidas a distintos tratamientos de salinidad y temperatura durante 4 meses. Así, el módulo A se fijó con una temperatura ambiental de 25°C y a las plantas cultivadas se les administró solución Hoagland completa con 15 mM de NaCl. El módulo B se fijó con una temperatura de 35°C y

las plantas allí crecidas fueron sometidas a diferentes concentraciones de salinidad, siendo éstas de 15 mM, 60 mM y 120 mM de NaCl que era aplicado junto con la solución Hoagland en el riego.



Imagen 7: Las dos líneas seleccionadas para el último experimento.

Al mes de comenzar a aplicar los tratamientos, cuando las plantas aún estaban en fase vegetativa, se realizó un primer muestreo de plantas con el fin de determinar el peso fresco de la parte aérea. Después, se secó el material fresco en una estufa para determinar posteriormente el estado nutricional de las plantas.

Al mes y medio desde que se comenzó a aplicar los tratamientos, se realizó un estudio de los parámetros fotosintéticos de las plantas: fotosíntesis neta, conductancia estomática e índice de transpiración.

A los dos meses desde el trasplante, se realizó un segundo muestreo de material vegetal cuando la planta estaba en fase reproductiva. De esta manera, se volvió a estudiar el estado nutricional de las plantas en dicho estado fenológico.

Al cabo de 4 meses se realizó el muestro final. Para ello se determinó el peso fresco (PF) de todas las plantas (parte aérea) de cada invernadero y tratamiento. Posteriormente, una vez que las plantas se secaron en una estufa, se procedió a determinar el estado nutricional de las mismas.

Durante el periodo de producción de las plantas, se fue recolectando la cosecha y pesando los frutos para calcular la producción total. Una vez terminada la cosecha, se procedió a evaluar la calidad de los frutos mediante sus parámetros físicos: peso y tamaño, y parámetros químicos: conductividad eléctrica, °Brix, pH y acidez. También se determinó el estado nutricional de los frutos después de que fueran secados en una estufa.

#### 4.5. DETERMINACIONES

##### 4.5.1. Parámetros biométricos

Como se ha mencionado anteriormente, en cada uno de los muestreos de material vegetal realizados al final de cada uno de los experimentos, se separaban las hojas, el tallo y la raíz (si procedía) y se determinaba el peso fresco (PF) de cada parte por separado. Este peso fue determinado con una balanza de precisión Sartorius (Acculab).

Posteriormente, las plantas se introducían en una estufa a 70°C durante un mínimo de 72 horas, y una vez que habían perdido todo su contenido en agua el peso seco de la planta era determinado. Con los datos de PF y PS, el contenido en agua de cada parte fue igualmente determinado. La tolerancia de las plantas se determinó mediante la fórmula:

$$\% \text{ Tolerancia} = 100 - \frac{PS \text{ Control} - PS \text{ Estrés}}{PS \text{ Control}} * 100$$

##### 4.5.2. Análisis nutricional

###### *Determinación de cationes*

Para determinar la composición mineral de parte aérea, raíz y frutos, el material vegetal seco y previamente pesado fue finamente molido en un molinillo de aspas. Las muestras se guardaron en viales de centelleo de plástico herméticamente cerrados con el fin de impedir que volviesen a rehidratarse.

El material vegetal seco siguió un proceso de digestión el cual consistió en digerir 0,1g de tejido vegetal seco en 5 ml de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) y 3 ml de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

La digestión de la materia orgánica se hacía utilizando un microondas (CEM Mars X, Buckinghamshire, UK) utilizando un programa en etapas, en el que se alcanzaban 200°C en 20 minutos y se mantenía esa temperatura durante 2 horas. Una vez que el residuo resultante de la digestión era enfriado a temperatura ambiente, el tubo digestor se aforó a 25 ml con agua miliQ, y las muestras fueron almacenadas en viales de centelleo hasta su análisis. Las muestras fueron analizadas por el servicio de ionómica del CEBAS-CSIC donde se determinaron la concentración exacta de los distintos cationes mediante el uso de un ICP-OES (Iris Intrepid II, Thermo Electrón Corporation, Franklin, USA).

#### 4.5.3. Relaciones hídricas en las plantas

Todas las medidas se realizaron en hojas de estado de desarrollo similar: una hoja totalmente expandida situada en la región media de la planta.

##### *Potencial hídrico*

El potencial hídrico de la hoja ( $\Psi_w$ ) fue determinado al alba con una cámara de presión tipo Scholander (PMS Instrument Company, Corvallis, OR) (Scholander y col., 1965). Los valores se tomaron en unidades de psi (libra-fuerza por pulgada cuadrada) y éstos fueron transformados a MPa mediante la fórmula:

$$Mpa = -0.00689 * psi$$

Después de tomar el valor de la medida, las hojas fueron envueltas en papel de aluminio y sumergidas en nitrógeno líquido para posteriormente calcular el potencial osmótico ( $\Psi_\pi$ ).

##### *Potencial osmótico*

Para medir el potencial osmótico, las hojas anteriormente congeladas en las que se había medido el potencial hídrico se descongelaron a temperatura ambiente

y se les extrajo la savia por centrifugación durante 3 minutos a 3500 rpm a 24°C en viales eppendorf perforados. El potencial osmótico ( $\Psi\pi$ ) se determinó midiendo la osmolalidad (mOsm/Kg) con un osmómetro (Digital Osmometer, Roebing, Berlín) en 100  $\mu$ L de savia, la cual fue previamente diluida 1:10. Este se expresó en MPa mediante la siguiente conversión:

$$\Psi\pi = -lectura * 0.0024$$

#### ***Potencial de turgor***

El potencial de turgor ( $\Psi P$ ) se calculó como la diferencia entre el potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) y el osmótico ( $\Psi_s$ ) mediante la fórmula:

$$\Psi P = \Psi_w - \Psi_s$$

#### **4.5.4. Intercambio gaseoso y parámetros de fluorescencia de clorofilas**

Los distintos parámetros fotosintéticos fueron determinados sobre una hoja media, metabólicamente madura y totalmente expandida de todas las plantas. Estos datos se tomaron con un sistema de intercambio de gas con cámara de fluorescencia (LI-COR 6400, Li-Cor). Las condiciones establecidas en Li-COR fueron de 1000  $\mu$ mol fotones  $m^{-2} s^{-1}$  y 400  $\mu$ mol  $mol^{-1} CO_2$ . La temperatura de la hoja se mantuvo a 25°C en las plantas con tratamiento control y salinidad, y a 35°C en las plantas con tratamiento calor y combinación de calor y salinidad. El déficit de presión de vapor hoja-aire se mantuvo entre 1-1,3 kPa.

Con este análisis, el aparato reportó datos de asimilación de  $CO_2$ , conductancia estomática e índice de transpiración. Además, se realizó el cálculo de la eficiencia en el uso del agua (WUE) como la fotosíntesis neta por unidad de agua transpirada, que equivale a la razón entre fotosíntesis y la tasa de transpiración.

Paralelamente a los datos fotosintéticos, el LI-COR es capaz de realizar medidas de fluorescencia de clorofilas de estas mismas hojas.

La eficiencia de los centros de reacción abiertos del PSII se estimó a través de la relación  $F_v'/F_m'$ , cuyos valores se calcularon a partir del  $F_m'$  (máxima

fluorescencia en condiciones de irradiación natural) y  $F_o'$  (fluorescencia basal en condiciones de irradiación natural), siendo  $F_v'$  la fluorescencia variable.

La eficiencia del PSII se calculó mediante la fórmula:

$$\frac{Fm' - FS'}{Fm'}$$

$FS'$  es la fluorescencia en el estado estacionario en condiciones de irradiación natural.

El índice de transporte electrónico estimó la velocidad de transporte de electrones a través del PSII. Este se calculó a través de la fórmula:

$$ETR = I * AHOJA * \text{fracción PSII} * \frac{Fq'}{Fm'}$$

Donde  $I$ =densidad de flujo fotónico fotosintéticamente activo (PPFD);  $AHOJA$ =proporción de PPFD que es absorbido por la hoja y  $\text{fracción PSII}$ =fracción de PPFD absorbido que es recibido por el PSII.

#### 4.5.5. Parámetros de producción

Los frutos de tomate fueron cosechados cuando alcanzaban un color rojo uniforme. El rendimiento se determinó mediante conteo y el pesado de todos los frutos por planta.

#### 4.5.6. Parámetros físicos de calidad

##### *Tamaño y forma*

Los frutos recolectados de cada planta fueron pesados en una balanza, y se les midió además el diámetro ecuatorial y el longitudinal con un calibrador Digimatic digital de Mitutoyo CD-15D, el cual cuenta con una precisión de 0,01 mm.

### *Parámetros químicos de calidad*

Para medir los parámetros químicos relacionados con la calidad de los frutos, éstos fueron licuados con una licuadora casera Moulinex. El zumo se filtró para evitar la presencia de sólidos en suspensión y en él se determinaron los siguientes parámetros:

#### *pH y CE*

Las medidas de pH y CE se realizaron directamente sobre el zumo de tomate. Para ello se utilizó un pH-metro pH BASIC 20 Crison y un Conductímetro BASIC 30 Crison.

#### *Sólidos solubles totales (SST) o °Brix*

Los sólidos solubles totales fueron determinados en relación al índice de refracción expresado en °Brix. Esta determinación fue realizada con un refractómetro (*Digital refractometer*, Atago) mediante la deposición de una gota de zumo sobre el refractómetro y procediendo a su lectura a 20°C.

#### *Acidez valorable*

La determinación de la acidez del zumo de tomate trata de fijar la riqueza en ácidos expresándola en gramos de ácido cítrico contenidos en un litro del mismo. La determinación se hace por volumetría, es decir, neutralizando la solución ácida mediante un álcali. En nuestro caso se utilizó NaOH 0,1 N. A un vaso de vidrio se le añadió 3 mL de zumo filtrado y 100 mL de agua desionizada. El electrodo del pH-metro se introdujo en el vaso y se adicionó NaOH 0,1 N hasta alcanzar un pH de 8,1 (AOAC, 1984).

El contenido de cationes se determinó mediante espectrometría de absorción atómica ICP-MS en el servicio de ionómica del CEBAS-CSIC (Perkin-Elmer 5500; Waltham, MA, USA).

#### 4.5.7. Determinaciones bioquímicas

##### *Concentración de peróxido de hidrógeno*

Para la cuantificación de  $H_2O_2$  se siguió el procedimiento descrito por Yang y col. (2007), con algunas modificaciones. 0,1 g de hoja de tomate previamente congelada fue pulverizada en un mortero con nitrógeno líquido y homogeneizada con 0,5 mL de TCA al 0.1%. Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 g durante 5 minutos y el sobrenadante se guardó a  $-80^{\circ}C$  para la determinación futura de la concentración de  $H_2O_2$  y de la peroxidación lipídica. Para la cuantificación de  $H_2O_2$ , 100  $\mu L$  del extracto enzimático se homogeneizaron con 100  $\mu L$  de buffer fosfato potásico 100 mM a pH 7,0, y se añadió 500  $\mu L$  de yoduro potásico 1 M y 300  $\mu L$  de agua, alcanzando así un volumen final de 1 mL. Las muestras fueron incubadas en oscuridad durante 1 hora y se midieron en un espectrofotómetro microplaca Biotek PowerWave XS2 (Biotek Instruments, Inc.) a una longitud de onda de 390nm en una placa de espectro visible provista de 96 pocillos. Las absorbancias se compararon con una curva patrón de  $H_2O_2$ , usando un estándar de peróxido de hidrogeno de 10-250  $\mu mol$  que siguió el mismo protocolo de cuantificación que las muestras.

##### *Análisis de peroxidación lipídica*

Para la determinación de la peroxidación lipídica se utiliza el malondialdehído (MDA) el cual es un producto de la peroxidación de los lípidos de membrana. Para ello se utilizó el mismo extracto enzimático que para la determinación de  $H_2O_2$ . Se utilizó el procedimiento descrito por Gomes-Junior y col. (2006). La reacción constó de 62,5  $\mu L$  de extracto enzimático y 250  $\mu L$  de TBA 0,5% disuelto en TCA 20%. Las muestras fueron incubadas a  $95^{\circ}C$  durante 20 minutos. Posteriormente, la absorbancia fue medida en el espectrofotómetro a 535 nm y 600 nm en una placa de espectro visible. La absorbancia a 600 nm se usó para corregir la turbidez inespecífica que se da a 535 nm.

##### *Determinación de enzimas antioxidantes*

Las muestras de material vegetal se pulverizaron en nitrógeno líquido y se homogeneizaron con un tampón MES-KOH 50 mM a pH 6,0, que contenía 100 mM de KCN, 100 mM de  $CaCl_2$  y 100 mM de L-AsA según el procedimiento descrito



por Torres y col. (2006). Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 13000 g y 4°C, y el sobrenadante resultante se guardó a -80°C para futuras determinaciones.

Este protocolo de extracción fue válido para la posterior cuantificación de la actividad de las siguientes enzimas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), deshidroascorbato reductasa (DHAR), monodehidratoascorbato reductasa (MDHAR) y glutation reductasa (GR).

#### *Superóxido dismutasa (SOD)*

50  $\mu$ L del extracto enzimático fueron tratados con 25  $\mu$ L de 100 mM de Buffer HEPES pH 7,8, 50  $\mu$ L de 5 nM de NTB, 200  $\mu$ L de de Xantina y 4  $\mu$ L de Xantina oxidasa, llevados todos ellos a un volumen final de 500  $\mu$ L añadiendo agua. A parte de las muestras a medir se realizaron tres blancos: uno en el que la enzima se sustituyó por agua, otro en el que el extracto se sustituyó por agua y otro en el que la enzima y el extracto se sustituyeron por agua, y se midieron en el espectrofotómetro a 560 nm en una placa de espectro visible durante 3 minutos. La actividad SOD se expresó como unidades de SOD (mg prot)<sup>-1</sup> (min)<sup>-1</sup>, entendiendo una unidad como la cantidad de enzima necesaria para neutralizar una unidad de xantina oxidasa.

#### *Catalasa (CAT)*

Para medir la actividad CAT se usó el mismo extracto utilizado para el análisis de la actividad SOD. A este extracto se añadió 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 50 mM de buffer fosfato potásico a pH 7,0, y se midió el cambio de absorbancia por degradación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm en una placa de cuarzo (espectro ultravioleta) durante 3 minutos. En el blanco la cantidad de extracto fue sustituida por una cantidad igual de agua. La actividad de CAT se calculó usando el coeficiente de extinción de 39,4 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Aebi, 1984). La actividad CAT se expresó como  $\mu$ mol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reducido (mg prot)<sup>-1</sup> (min)<sup>-1</sup>.

#### *Ascorbato peroxidasa (APX)*

Para medir la actividad APX a 50  $\mu$ L del extracto enzimático se le añadió 186,87  $\mu$ L de buffer fosfato potásico a 50 mM y a pH 7,0, y 0,63  $\mu$ L de una solución de 100 mM de ácido L-ascórbico, obteniendo así en cada pocillo de la placa de

cuarzo un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . El cambio de absorbancia detectado por la degradación del ácido L-ascórbico gracias a la actividad APX se midió a 290 nm en el espectrofotómetro durante 3 minutos. En el blanco la cantidad de extracto fue sustituida por agua. Se calculó la actividad de la velocidad de reacción utilizando un coeficiente de extinción molar de  $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . La actividad APX se expresó como  $\mu\text{mol}$  de ácido ascórbico reducido  $(\text{mg prot})^{-1} (\text{min})^{-1}$ .

#### *Dehidroascorbato reductasa y Monodehidroascorbato reductasa (DHAR y MDHAR)*

La determinación de la actividad DHAR como la de MDHAR se realizaron juntas, utilizando una mix que sólo variaba en uno de sus componentes: la primera contenía 15  $\mu\text{L}$  de una solución 1 mM de DHA y la segunda el mismo volumen de 100 mM de L-AsA, además de 75  $\mu\text{L}$  de buffer 100 mM de HEPES a pH 7,6 y 60  $\mu\text{L}$  de agua. Se añadieron también 40  $\mu\text{L}$  de 0,3 mM de NADPH y en ambas se midió el cambio de absorbancia durante 3 minutos a 340 nm para la MDHAR y a 265 nm para la DHAR. En el blanco la cantidad de extracto fue sustituida por una cantidad igual de agua.

Las actividades MDHAR y DHAR fueron expresadas como  $\mu\text{mol}$  NADH oxidado  $(\text{mg prot})^{-1} (\text{min})^{-1}$  y  $\mu\text{mol}$  DHA reducido  $(\text{mg prot})^{-1} (\text{min})^{-1}$  respectivamente.

#### *NADPH oxidasa*

Para la determinación de la actividad NADPH oxidasa se tuvo que realizar una nueva extracción según el procedimiento descrito por Aktas y col. (2005) con algunas modificaciones. Se homogeneizaron 0,1 g de material vegetal fresco en nitrógeno líquido con un eppendorf de 1,5 mL ayudado por un micromortero. Se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato potásico 100 mM a pH 7,0, 100  $\mu\text{L}$  de EDTA 10 mM y 100  $\mu\text{L}$  Triton, y se centrifugó a 15.000 g durante 20 minutos.

A 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante resultante de la centrifugación se le añadió 135  $\mu\text{L}$  buffer Fosfato potásico 100 mM a pH 7,0, más 0,3  $\mu\text{L}$  de EDTA y 62  $\mu\text{L}$  de NADPH 300  $\mu\text{M}$ , con el fin de medir la actividad NADPH oxidasa durante 3 minutos a 340 nm. En el blanco la cantidad de extracto fue sustituida por una cantidad igual de agua.

La actividad NADPH oxidasa fue expresada como  $\mu\text{mol NADPH oxidados (mg prot)}^{-1} (\text{min})^{-1}$ .

#### 4.5.8. Concentración de proteínas en el extracto enzimático

Finalmente, para la correcta interpretación de los resultados de las actividades enzimáticas fue necesaria la determinación de la concentración de proteínas solubles del extracto enzimático, ya que los resultados de la actividad se expresan por mg de proteína. Para ello se utilizó el método Bradford (Bradford, 1976), en el que se añadió a una alícuota de extracto enzimático un volumen de reactivo Bradford Reagent (BioRAD, No. Catalog 30214). Tras 20 minutos de reacción con el Bradford Reagent la absorbancia fue determinada a 595 nm. Las absorbancias obtenidas en cada muestra ensayada se compararon con una recta patrón en la que las concentraciones se encontraban entre 0,15 y 1,5 mg/mL, la cual siguió el mismo protocolo descrito para los ensayos.

#### 4.5.9. Extracción de RNA

La extracción de RNA total se realizó en hoja de tomate con el reactivo TRI-Reagent (Sigma-Aldrich, Ref. T9424). 0,1 g de muestra vegetal fresca se homogeneizaron con nitrógeno líquido y se maceraron con 1 mL de TRI-Reagent a 4°C. Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 g durante 10 minutos y a 4°C. Para la fase de separación de los ácidos nucleicos de las proteínas celulares, el sobrenadante se trató con 0,5 mL de cloroformo y se volvió a centrifugar a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa superior (que contenía la fracción de ácidos nucleicos), fue recogida cuidadosamente, y se procedió a aislar el RNA total de la siguiente forma: se añadieron 0,4 mL de 2-propanol. Los tubos fueron agitados vigorosamente y se centrifugaron a 12.000 g durante 10 minutos y 4°C. El sobrenadante fue descartado y el residuo resultante de la centrifugación fue lavado con 1 ml de etanol al 75%. Tras otra centrifugación idéntica a la descrita anteriormente, el residuo resultante fue resuspendido en 100  $\mu\text{L}$  de TRIS-HCl 10 mM a pH 8.0 más 1 mM de EDTA. Posteriormente se comprobó la concentración y la calidad del RNA total obtenido mediante un espectrofotómetro tipo nanodrop.

Las muestras de RNA fueron tratadas posteriormente con DNAsa I (Fermentas life Sciences) de acuerdo con el protocolo del fabricante para limpiar posibles restos de DNA. Para ello, se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de 10X buffer y 1  $\mu\text{L}$  de DNAsa I mezclando con suaves golpes. A continuación, se incubaron en una estufa a 37°C durante 30 minutos, se enfriaron en hielo y se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de buffer o tampón inactivador. Las muestras se centrifugaron a 1000 rpm durante 2 minutos y 4°C y el sobrenadante se transfirió a un nuevo eppendorf que se mantuvo a -20°C durante todo el tiempo que duró la posterior identificación de genes.

#### 4.5.10. cDNA Y qPCR

Una vez obtenido el RNA y medida su concentración en el espectrofotómetro tipo nanodrop y tras su tratamiento con DNAsa, las muestras fueron normalizadas a concentraciones de 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , para la síntesis de cDNA. Esta síntesis se realizó utilizando el kit de síntesis SuperScript VILO cDNA (Invitrogen) siguiendo los pasos que indica el fabricante.

A partir de estos cDNA se realizaron diferentes PCRs a tiempo real (o qPCRs) utilizando los primers descritos en la tabla 3 (diseñados anteriormente para otros experimentos) con el objetivo de cuantificar la expresión de los genes de interés. De cada cDNA se realizaron 3 repeticiones, utilizando el factor de elongación EIF-1 $\alpha$  como control interno, y se estudiaron la expresión de los genes *SIFe-SOD*, *SICu/ZnSOD*, *SlcAPX*, *SICAT1*, *SIDHAR1*, *SIMDHAR1* y *SIGR*.

Para llevar a cabo un estudio de la expresión de los genes seleccionados en nuestros experimentos mediante qPCR (7500 System) se utilizó un volumen total de reacción de 20  $\mu\text{L}$  en cada una de las qPCR ensayadas. Las reacciones incluyeron 2  $\mu\text{L}$  de la muestra a analizar (cDNA), 10  $\mu\text{L}$  de KAPA SYBR, 0,4  $\mu\text{L}$  ROX Low, 0,4  $\mu\text{L}$  de cada cebador (10  $\mu\text{M}$ ) y agua desionizada y esterilizada de grado molecular hasta un volumen total de 20  $\mu\text{L}$ .

La reacción de la qPCR presentó las siguientes condiciones: 3 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos a 95°C durante 2 segundos y 60°C durante 25 segundos. Además de una etapa de disociación a 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 15 segundos.

Las condiciones de amplificación y los análisis de los datos se realizaron en un sistema de PCR a tiempo real 7500 System (Applied Biosystems) utilizando como

---

control interno EIF-1a. Los resultados muestran el cambio relativo (fold change) de cada gen después del estrés con respecto al mismo gen en las plantas control. En la Tabla 11 se presentan las secuencias de los genes que se estudiaron.

Tabla 11: Secuencia de los primers utilizados en los análisis de PCR cuantitativa.

<b>Gen</b>	<b>I.D.</b>	<b>Cebador sentido</b>	<b>Cebador antisentido</b>
<b>Fe-SOD</b>	Solyc06g048 410	5'- TAAATAGAGACTTTGGT TCC -3'	5'- TATATTTGCCTCTTAA CCCT -3'
<b>Cu/Zn-SOD</b>	Solyc11g066 390	5'- GGCCAATCTTTGACCCT TTA -3'	5'- AGTCCAGGAGCAAGT CCAGT-3'
<b>CAPX</b>	Solyc06g005 160	5'- TCTGAATTGGGATTTGC TGA -3'	5'- CGTCTAACGTAGCTG CCAAA -3'
<b>CAT1</b>	Solyc12g094 620	5'- TGATCGCGAGAAGATA CCTG -3'	5'- CTTCCACGTTTCATGGA CAAC-3'
<b>DHAR1</b>	Solyc050547 60	5'- AGGTGGCTCTTGGACAC TTC -3'	5'- CTTCAGCCTTGGTTTT CTGG- 3'
<b>MDHAR1</b>	Solyc08g081 530	5'- CAAGGGTTTCGGTTCCT TCT-3'	5'- CTGCATTCCTCCTCC AACT-3'
<b>GR1</b>	Solyc09g091 840	5'- TTGGTGGAACGTGTGTT CTT -3'	5'- TCTCATTCACTTCCCA TCCA -3'
<b>GST</b>	Solyc01g086 680	5'- TACTCGTTTTTTGGGCTCG TT-3'	5'- CACCGATTCAACTCC CTCTG-3'
<b>GPX</b>	Solyc08g080 940	5'- ACGGAGCAAGCGACAA TTGACAAC-3'	5'- CGATTGATTCACCGC AAAGCTCGT-3'
<b>PhGPX</b>	Solyc06g073 460	5'- TGGCTTGAGCACTACAG GTG-3'	5'- TTTCGTAGGCAGGGA AGAAG-3'
<b>EIF-1<math>\alpha</math></b>	Solyc06g005 060.2.1	5'- GAACTGTCCCAGTTGGT CGT-3'	5'- GTCAAACCAGTAGGG CCAAA-3'

# **V – RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. EXPERIMENTO 1: OPTIMIZACIÓN DE LA NUTRICIÓN FRENTE A LA COMBINACIÓN DE ESTRESSES ABIÓTICOS

#### 5.1.1. Ensayo preliminar

En la Figura 8 se muestran los resultados del experimento preliminar llevado a cabo con el fin de determinar qué concentraciones de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  añadidas a la solución nutritiva eran las que mantenían una alta producción de biomasa bajo condiciones de combinación de salinidad y alta temperatura.

El peso fresco de las plantas de tomate disminuyó con la aplicación del estrés salino y el estrés combinado de salinidad y alta temperatura respecto a las plantas control. Normalmente, las concentraciones de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  de la solución Hoagland completa están en torno a los 4 mM y 7 mM respectivamente, y, en este experimento, la concentración se aumentó de forma progresiva mediante la aplicación de 3 tratamientos: T1 (8:4.7 mM - K:Ca), T2 (9.8:5.6 mM - K;Ca) y T3 (11:6.5 mM - K;Ca). Con el tratamiento T1, los resultados obtenidos para la biomasa de las plantas fueron similares a aquellos obtenidos con solución Hoagland control bajo condiciones de salinidad y salinidad combinada con alta temperatura, por lo que este tratamiento quedó descartado. El tratamiento T3 redujo aún más la producción de biomasa comparado con los otros tratamientos T1 y T2 bajo condiciones de estrés simple o combinado, con reducciones de más del 50% en el total de la biomasa de las plantas. El tratamiento T3 mejoró el peso fresco de las plantas respecto a las plantas que habían sido sometidas al estrés salino y al estrés combinado de salinidad y alta temperatura, con un incremento en la producción de biomasa de un 21% respecto a las plantas bajo estrés. Por lo tanto, el tratamiento elegido para realizar el ensayo principal de este experimento fue el T2.

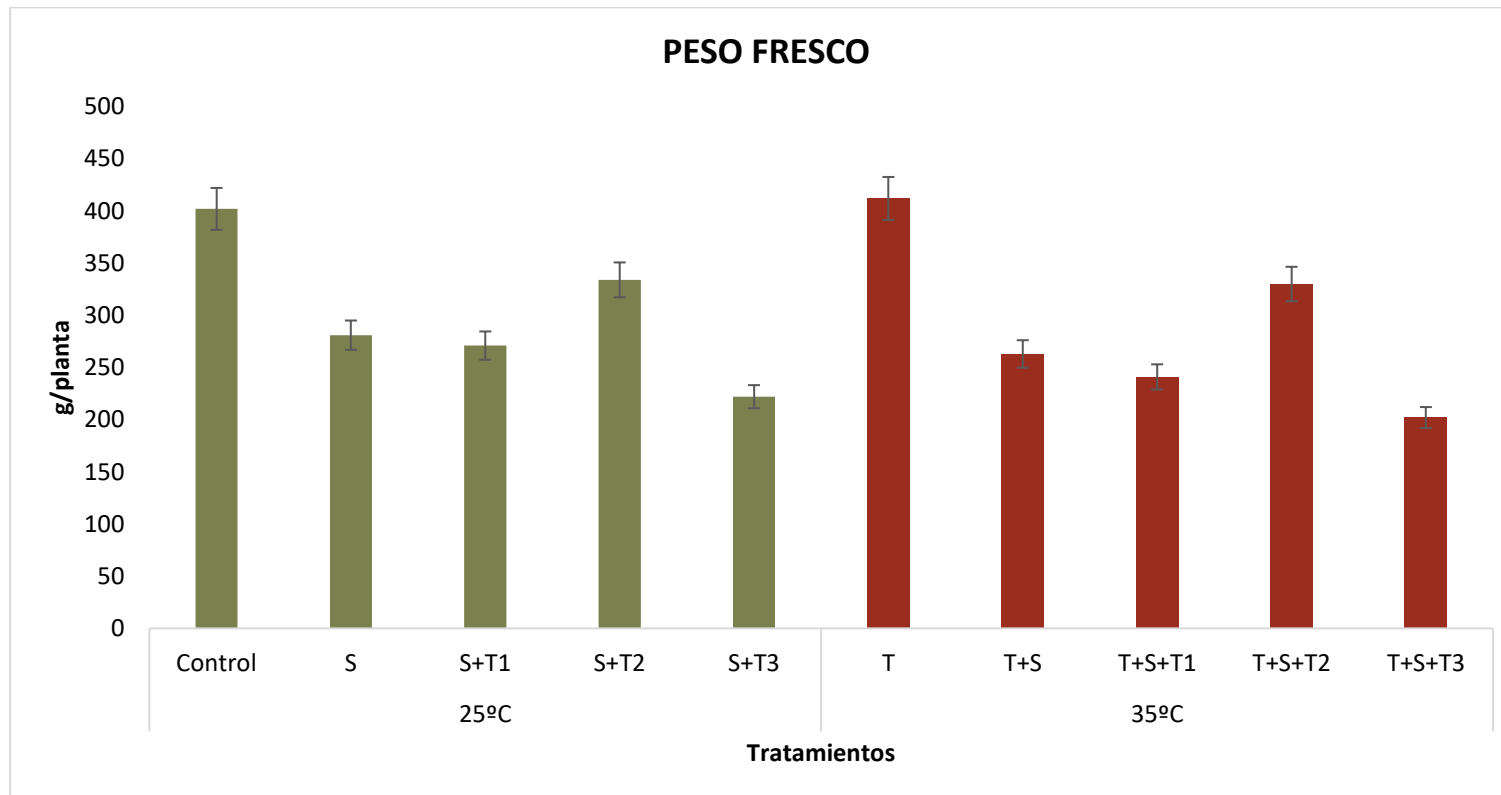


Figura 8: Peso fresco de las plantas cultivadas bajo los distintos tratamientos: a 25°C, están los tratamientos control, estrés de salinidad (S) (60 mM NaCl) y salinidad + T1 ( $K^+Ca^{2+}$ ; 8:4,7 mM), + T2 ( $K^+Ca^{2+}$ ; 9,8:5,6 mM) + T3 ( $K^+Ca^{2+}$ ;11:6.5 mM). A 35°C, se encuentran los tratamientos de estrés de alta temperatura (T) (35°C), combinación de alta temperatura + salinidad (60mM NaCl) y la combinación de estreses + T1 ( $K^+Ca^{2+}$ ; 8:4,7 mM ), + T2 ( $K^+Ca^{2+}$ ; 9,8:5,6 mM) y+ T3 ( $K^+Ca^{2+}$ ;11:6.5 mM)

### 5.1.2. Ensayo principal

#### *Biomasa: peso fresco y peso seco*

Como se muestra en la Figura 9 y la Figura 10, el peso fresco y el peso seco de las plantas de tomate disminuyó significativamente con el estrés salino y con el estrés combinado de salinidad y alta temperatura. La reducción del peso fresco fue del 33% y 38% en cada uno de los tratamientos respectivamente en comparación con las plantas control. El tratamiento de temperatura, en cambio, no afectó a la biomasa total de las plantas respecto al control.

Cuando la solución nutritiva se complementó con un aumento en la concentración de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ , los efectos negativos que produjeron el estrés de salinidad y el estrés combinado de salinidad y alta temperatura disminuyeron, obteniendo plantas con una menor biomasa que las plantas control, pero con reducciones de solo alrededor del 10% (Figura 9).

Por lo tanto, las plantas cultivadas bajo el efecto de la salinidad o bajo la combinación de salinidad y alta temperatura, pero con concentraciones más altas de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  en la solución nutritiva, aumentaron su peso fresco en 33% y 47% respectivamente, en comparación con las plantas cultivadas bajo estos factores estresantes e irrigadas con la solución Hoagland normal.

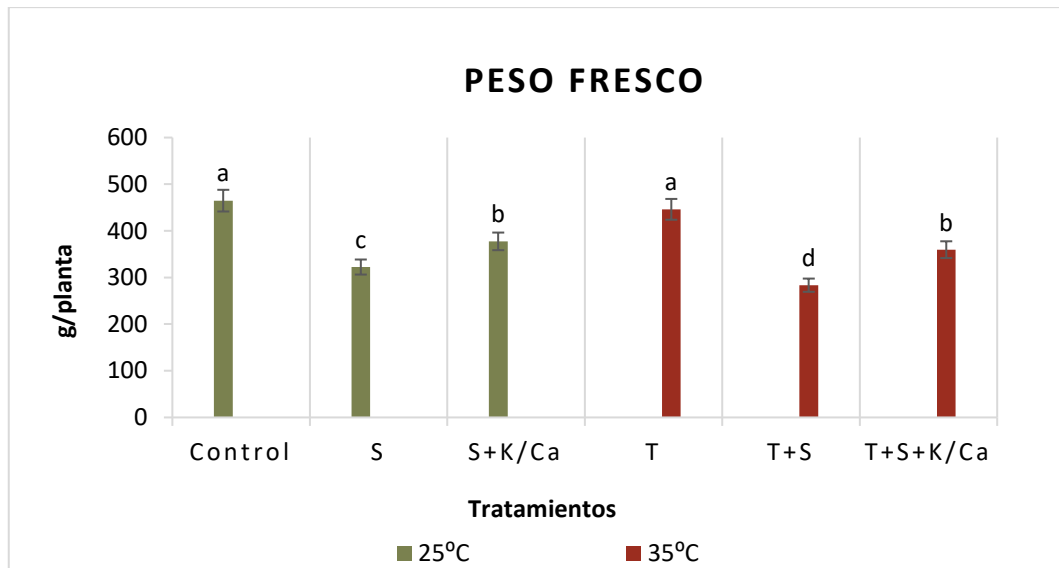


Figura 9: Peso fresco de plantas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (S) (60 mM NaCl) y salinidad y mayor concentración de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  en la solución nutritiva a temperatura óptima (25°C) o temperatura elevada (35°C) (T). Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=6). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

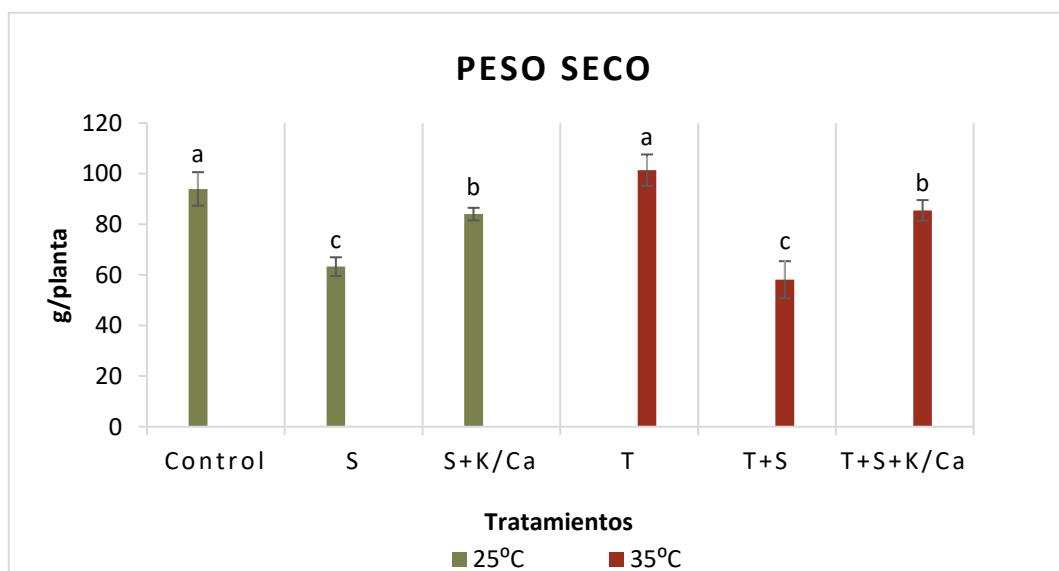


Figura 10: Peso seco de plantas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (S) (60 mM NaCl) y salinidad y mayor concentración de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  en la solución nutritiva a temperatura óptima (25°C) o temperatura elevada (35°C) (T). Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=6). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

*Estado nutricional de las plantas*

Los resultados de análisis de iones realizado en las hojas de tomate muestran que tanto el tratamiento de temperatura como la combinación de los estreses de salinidad y temperatura, redujeron la concentración endógena de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  en las plantas (Figura 11 y Figura 12, respectivamente). La temperatura y la combinación de estreses redujo la concentración de  $Ca^{2+}$  en torno al 18% y el  $K^+$  aproximadamente un 23% respecto a los resultados obtenidos en las plantas cultivadas bajo condiciones óptimas (plantas control).

Sin embargo, cuando las plantas que estaban sometidas a la combinación de los estreses de salinidad y alta temperatura se complementaban con una mayor concentración de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  en la solución nutritiva, las concentraciones endógenas de  $Ca^{2+}$  obtenidas eran similares a las de las plantas de control. La salinidad no indujo cambios significativos en la concentración endógena de las hojas de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ , pero, cuando las plantas crecieron bajo el efecto de la salinidad y se irrigaron con una mayor concentración de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ , la concentración endógena de  $K^+$  encontrada fue significativamente menor que la obtenida en condiciones de control, con una reducción del 12% (Figura 12). El riego de plantas con la solución nutritiva enriquecida en  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ , y cultivadas bajo combinación de estrés, no indujo cambios significativos en la concentración de  $K^+$  a los observados en plantas irrigadas con solución Hoagland en las mismas condiciones ambientales (Figura 11).

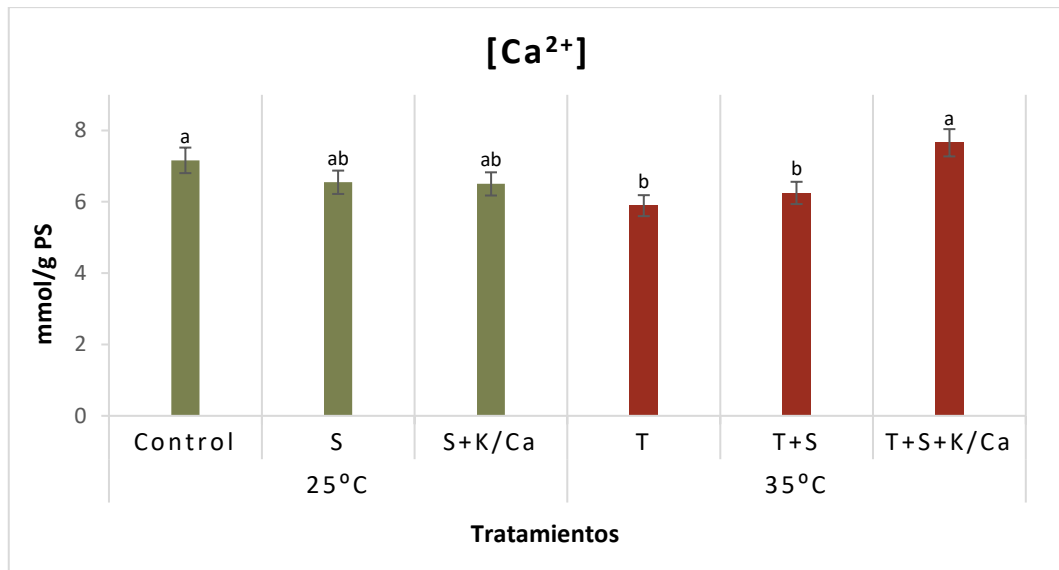


Figura 11: Concentración de Ca<sup>2+</sup> y relación en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (NaCl 60 mM) y salinidad combinada con una mayor concentración de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en la solución nutritiva a temperatura óptima (25°C) o bajo temperatura elevada (35°C). Los valores representan medias  $\pm$  SE (n=6). Las barras con letras diferentes representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

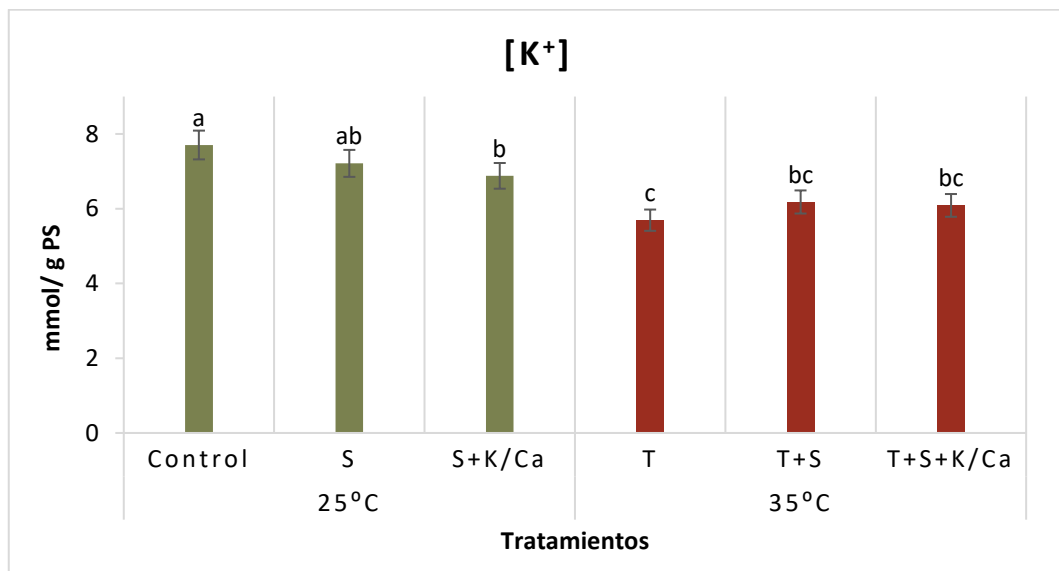


Figura 12: Concentración de K<sup>+</sup> en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (NaCl 60 mM) y salinidad combinada con una mayor concentración de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en la solución nutritiva a temperatura óptima (25°C) o bajo temperatura elevada (35°C). Los valores representan medias  $\pm$  SE (n=6). Las barras con letras diferentes representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

Con el propósito de confirmar la homeostasis celular que debe existir entre los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , se estudió la concentración endógena de  $\text{Na}^+$  en las plantas de tomate (Figura 13). Como era de esperar, la concentración de  $\text{Na}^+$  aumentó significativamente en los tratamientos salinos en los que se administró 60 mM de  $\text{NaCl}$ . La salinidad fue el tratamiento con mayor concentración de  $\text{Na}^+$ , y la aplicación del estrés combinado de salinidad y temperatura indujo una acumulación de  $\text{Na}^+$  significativamente más baja en las hojas de tomate, con una reducción del 16% en comparación que cuando la salinidad era administrada sin el estrés de temperatura (Figura 13). Además, las plantas que estaban sometidas a la combinación de estreses a las que se les administró la solución nutritiva enriquecida con  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  mostraron una menor acumulación de  $\text{Na}^+$  en las hojas (~22% menos) en comparación con las plantas que crecieron en las mismas condiciones pero que se irrigaron con la solución Hoagland común. Por lo tanto, estos resultados indican que las concentraciones endógenas de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  fueron menores cuando las plantas se irrigaron con la solución nutritiva enriquecida en  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  bajo estrés abiótico.

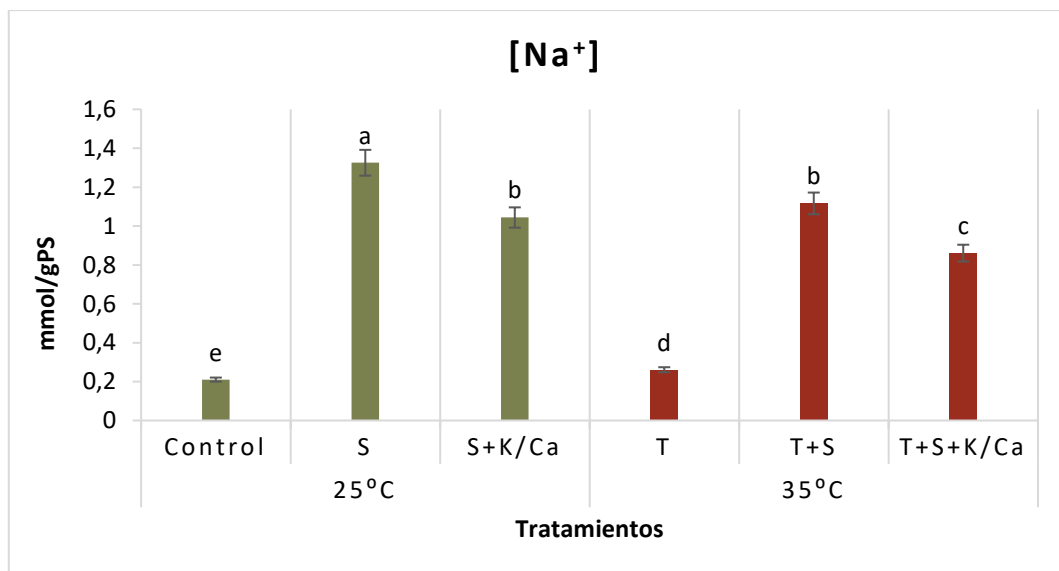


Figura 13: Concentración de  $\text{Na}^+$  en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad ( $\text{NaCl}$  60 mM) y salinidad combinada con una mayor concentración de  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución nutritiva a temperatura óptima (25°C) o bajo temperatura elevada (35°C). Los valores representan medias  $\pm$  SE (n=6). Las barras con letras diferentes representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

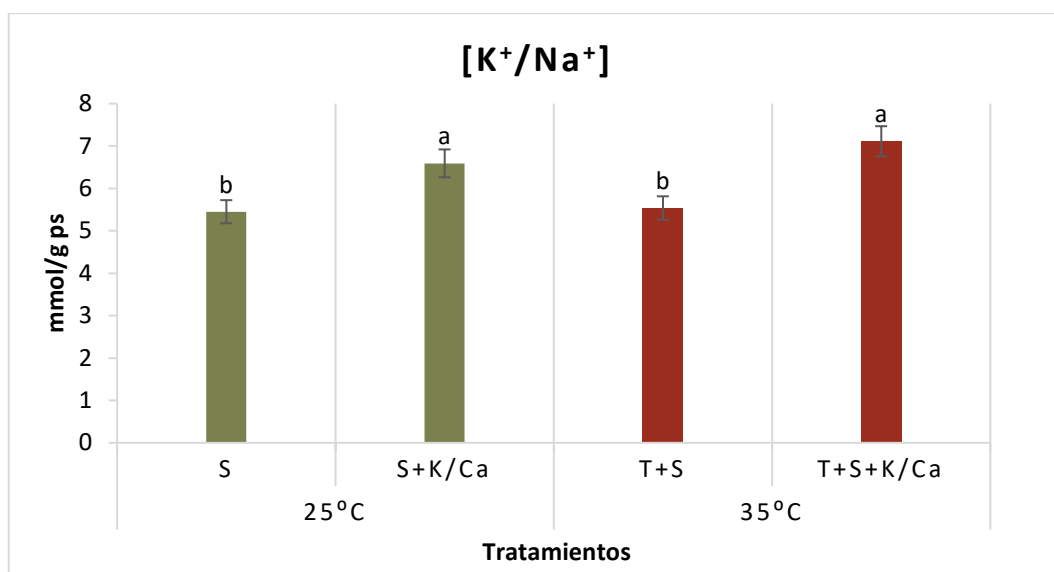


Figura 14: Concentración de la relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (NaCl 60 mM) y salinidad combinada con una mayor concentración de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en la solución nutritiva a temperatura óptima (25°C) o bajo temperatura elevada (35°C). Los valores representan medias ± SE (n=6). Las barras con letras diferentes representan datos con diferencias significativas a p ≤ 0.05 (Tukey HSD).

El aumento de las concentraciones de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en la solución de riego mejoró la tolerancia de las plantas a la salinidad, tanto cuando la temperatura era óptima (25°C) como cuando estaba combinada junto al estrés de temperatura. El tratamiento de estrés más agresivo para las plantas de tomate es la salinidad y la alta temperatura, sin embargo, un aumento en la concentración de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en la solución nutritiva indujo una mayor recuperación de estas plantas bajo condiciones de estrés combinado.

### *Parámetros fotosintéticos*

Hacia el final del periodo experimental y antes de que las plantas fueran cosechadas, se midieron los parámetros fotosintéticos correspondientes a la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub>, la tasa de transpiración, la conductancia estomática y la eficiencia del uso del agua calculada a partir del CO<sub>2</sub> asimilado frente al agua transpirada (Figura 15, Figura 16, Figura 17 y Figura 18). La tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> (Figura 15), la tasa de transpiración (Figura 16) y la conductancia estomática (Figura 17) tuvieron un comportamiento similar en condiciones de estrés.



Comparadas con las condiciones control, la salinidad y la combinación de los estreses de salinidad y temperatura redujeron significativamente dichos parámetros en las plantas, siendo más agresivo el efecto de los estreses combinados que cuando la salinidad era aplicada sin el estrés de temperatura. La eficiencia del uso del agua también fue significativamente menor cuando la salinidad y la temperatura eran aplicados de manera combinada respecto a las plantas control y a las plantas que fueron sometidas al estrés de temperatura de forma individual, y la aplicación de la solución nutritiva enriquecida no causó efecto en las plantas a las que se les aplicó el estrés combinado respecto a las plantas en las mismas condiciones en solución Hoagland común.

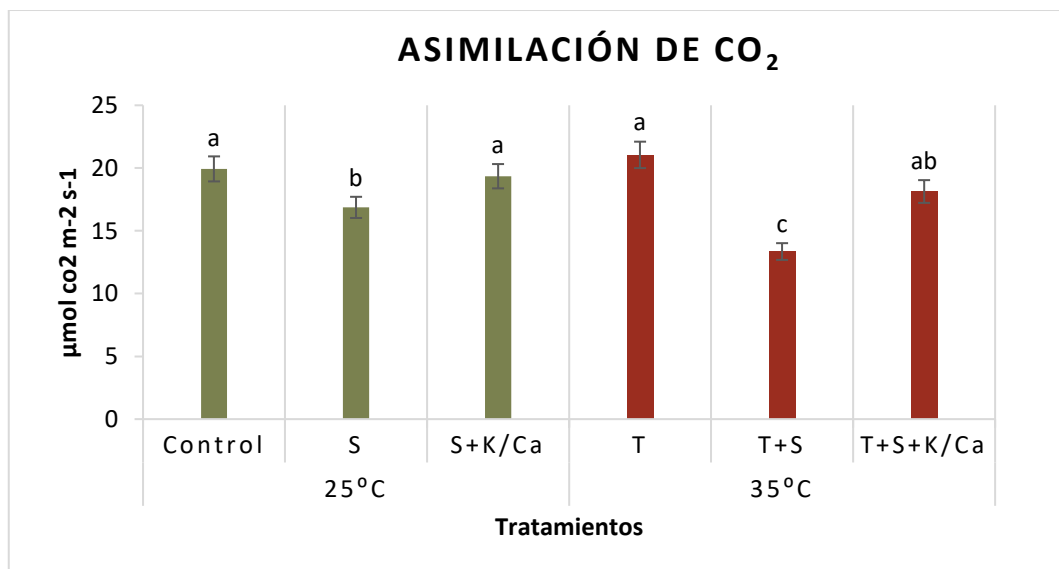


Figura 15: Asimilación de CO<sub>2</sub> en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (NaCl 60 mM) y salinidad combinada con una mayor concentración de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en la solución de irrigación a temperatura óptima (25°C) o temperatura elevada (35°C). Los valores son medios ± SE (n=6). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a p≤0.05 (Tukey HSD).

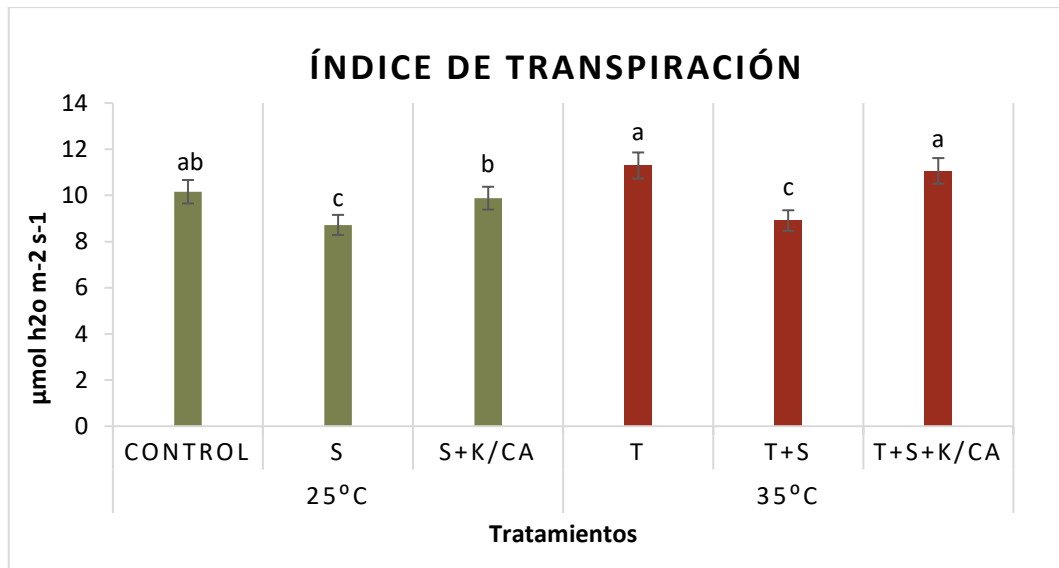


Figura 16: Índice de transpiración en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (NaCl 60 mM) y salinidad combinada con una mayor concentración de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en la solución de irrigación a temperatura óptima (25°C) o temperatura elevada (35°C). Los valores son medios  $\pm$  SE (n=6). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p < 0.05$  (Tukey HSD).

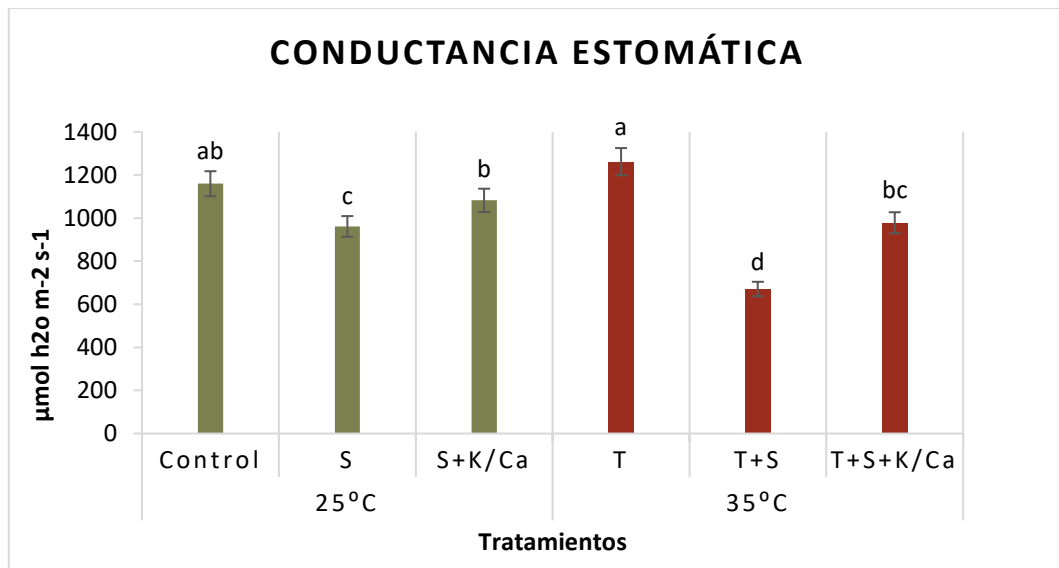


Figura 17: Conductancia estomática en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (NaCl 60 mM) y salinidad combinada con una mayor concentración de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en la solución de irrigación a temperatura óptima (25°C) o temperatura elevada (35°C). Los valores son medios  $\pm$  SE (n=6). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

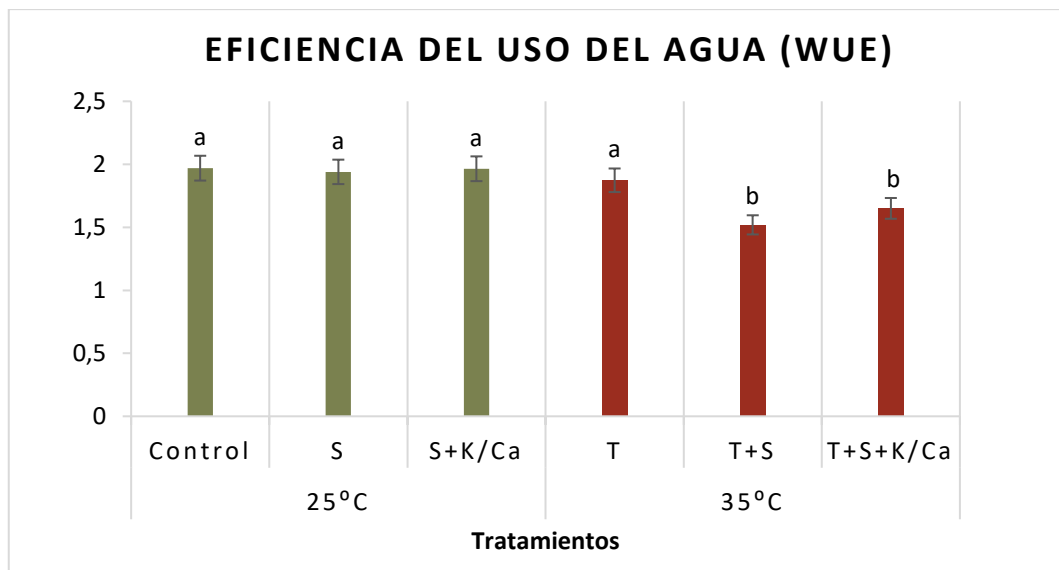


Figura 18: Eficiencia del uso del agua en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (NaCl 60 mM) y salinidad combinada con una mayor concentración de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  en la solución de irrigación a temperatura óptima (25°C) o temperatura elevada (35°C). Los valores son medios  $\pm$  SE (n=6). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

#### *Cuantificación de $H_2O_2$ y peroxidación lipídica*

Los estreses aplicados en las plantas en este experimento (salinidad, temperatura, y la combinación de salinidad y temperatura) aumentaron significativamente la concentración de  $H_2O_2$  con respecto a las plantas de control, siendo el tratamiento de salinidad en el que en mayor medida aumentó concentración de este compuesto: casi el doble que la concentración encontrada en las plantas control (Figura 19).

Por otro lado, cuando las plantas que estaban sometidas al efecto salino o bajo el efecto de la combinación de salinidad y alta temperatura eran irrigadas con la solución nutritiva enriquecida en  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ , la concentración de  $H_2O_2$  fue significativamente menor que la encontrada en las mismas condiciones ambientales irrigadas con la solución Hoagland común. Por lo tanto, las plantas irrigadas con mayor  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  y cultivadas bajo el efecto de la salinidad tuvieron un 20% menos de  $H_2O_2$  que aquellas cultivadas bajo salinidad, pero irrigadas con la solución nutritiva normal. Curiosamente, cuando la salinidad se combinó con el

estrés de temperatura, el suministro adicional de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  en la solución nutritiva dio como resultado una reducción del 30% en la concentración de  $H_2O_2$ .

Para el contenido de MDA (Figura 20), los resultados obtenidos fueron similares, y las plantas con mayor concentración de este compuesto fueron las que se sometieron al estrés de salinidad y a la combinación de salinidad y alta temperatura irrigados con la solución nutritiva Hoagland normal. De nuevo, la adición de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  extra a la solución nutritiva resultó en una reducción significativa en el nivel de peroxidación lipídica de las membranas celulares bajo las mismas condiciones de estrés.

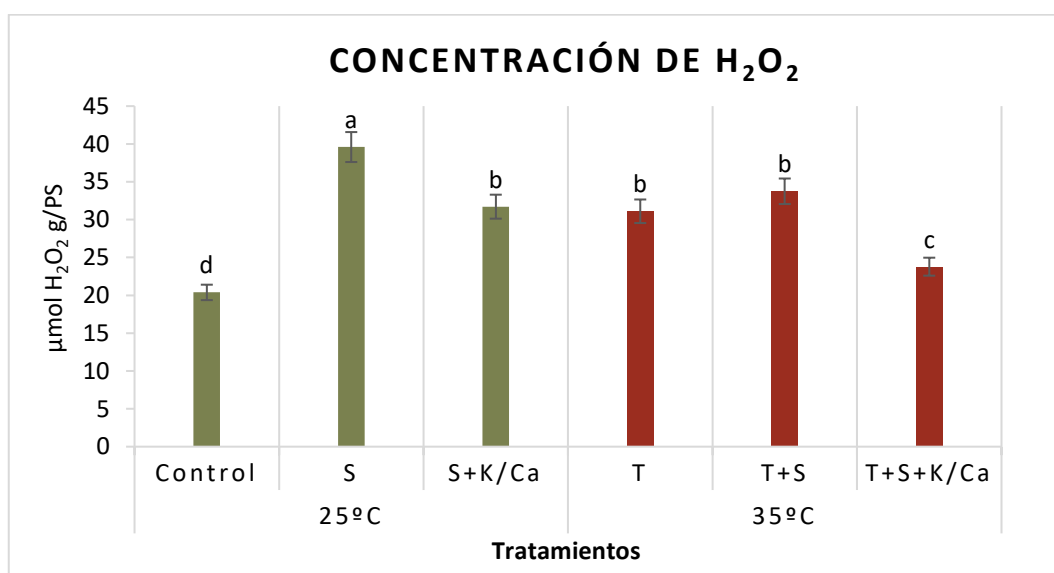


Figura 19: Concentración de  $H_2O_2$  en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (60 mM NaCl) y salinidad combinada con una mayor concentración de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  en la solución nutritiva a temperatura óptima (25°C) o bajo temperatura elevada (35°C). Los valores representan medias  $\pm$  SE (n=6). Las barras con letras diferentes dentro del panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

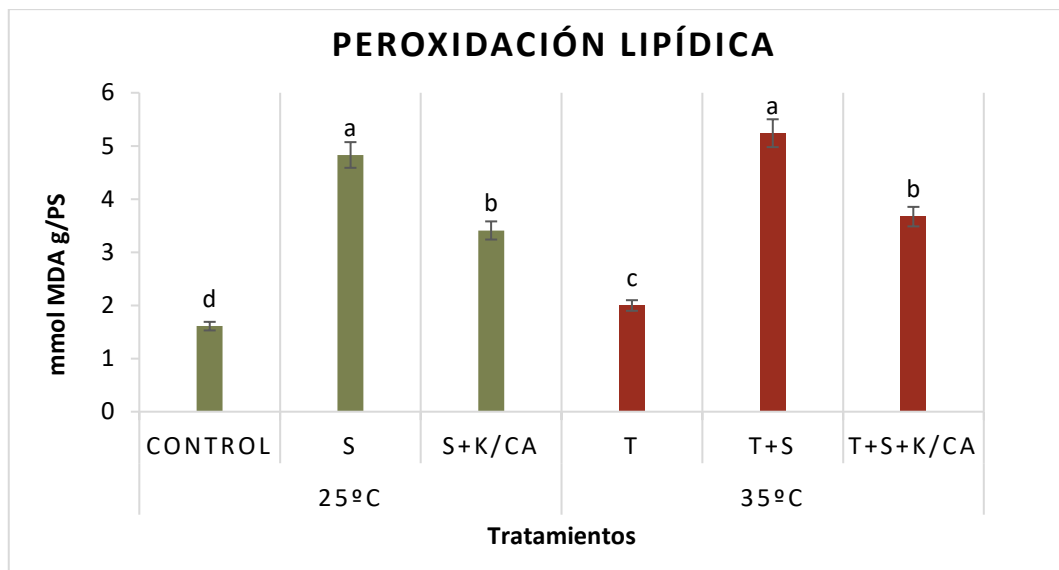


Figura 20: Tasa de peroxidación lipídica, medida como la concentración de MDA (B) en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (60 mM NaCl) y salinidad combinada con una mayor concentración de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  en la solución nutritiva a temperatura óptima (25°C) o bajo temperatura elevada (35°C). Los valores representan medias  $\pm$  SE (n=6). Las barras con letras diferentes dentro del panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

### *Actividad antioxidante*

La expresión de los principales transcritos relacionadas con el metabolismo oxidativo y la actividad de las principales enzimas antioxidantes se midieron bajo el efecto de los estreses aplicados en el experimento. Debido a la cantidad de datos a representar y para una visualización más fácil y directa, los datos fueron representados en un mapa de calor (Figura 21).

Los niveles de expresión de transcritos que codifican para Fe-SOD y Cu/Zn-SOD se observó una sobreexpresión bajo todas las condiciones de estrés (Figura 21) comparado con las plantas control y se correlacionaron con los resultados obtenidos para la actividad SOD. La excepción fue la actividad de Cu/Zn-SOD en las plantas que estaban sometidas bajo el estrés combinado de salinidad y alta temperatura que se irrigaron con la solución nutritiva enriquecida con  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ , ya que, en este caso, esta enzima se inhibió.

Los transcritos que codifican para el gen CAT fueron sobre-regulados bajo condiciones de salinidad, independientemente de la solución nutritiva

utilizada. También se observó una sobre-expresión de estos transcritos bajo el estrés de alta temperatura, mientras que en el tratamiento de la combinación de estreses de salinidad y alta temperatura la transcripción del gen CAT fue reprimida.

Curiosamente, la suplementación de plantas con la solución nutritiva enriquecida con  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  revirtió la regulación observada para DHAR y NADPH oxidasa bajo el efecto de la salinidad, induciendo la regulación positiva de esos genes en comparación con las plantas control.

Sin embargo, la actividad de DHAR y NADPH oxidasa no mostró diferencias significativas con respecto a las plantas de control. Las transcripciones de MDHAR aumentaron, y la actividad de esta enzima también fue mayor en el tratamiento salino en comparación con las plantas control, independientemente de la solución de riego utilizada.

El estrés de temperatura indujo una regulación positiva de todas las transcripciones que pertenecen a la ruta AsA-GSH, excepto SIAPX y SIGR, que no mostraron diferencias significativas con respecto a las plantas de control. Cuando la salinidad y la alta temperatura se aplicaron conjuntamente, se observó una regulación general a la baja de las transcripciones que codifican las enzimas que pertenecen a la vía AsA-GSH, con la consecuente inhibición de sus actividades enzimáticas. Sin embargo, la alimentación de las plantas con la solución nutritiva enriquecida con  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  revirtió el perfil de expresión observado en la combinación de salinidad y temperatura para la mayoría de los genes, con un patrón de regulación positiva en todos ellos en comparación con las plantas de control, que se correlaciona con las actividades medidas para estas enzimas.

En este experimento, se determinó la expresión de las transcripciones *SIGST*, *SIPhGPX* y *SIGPX* para compararlas con el nivel de peroxidación lipídica observada en los diferentes tratamientos y para comprobar si la suplementación de la solución de irrigación de la planta con  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  podría tener efecto sobre la transcripción de estos genes. Los resultados mostraron que bajo el efecto de la salinidad y de la combinación de estreses, estos tres genes estaban regulados a la baja con respecto a las plantas de control. Sin embargo, en plantas suplementadas con la solución nutritiva enriquecida con  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ , se observó una regulación al

alza de *SIGPX* y *SIPhPGX* (bajo salinidad) y de *SIGST* y *SIPhGPX* (bajo salinidad y alta temperatura).

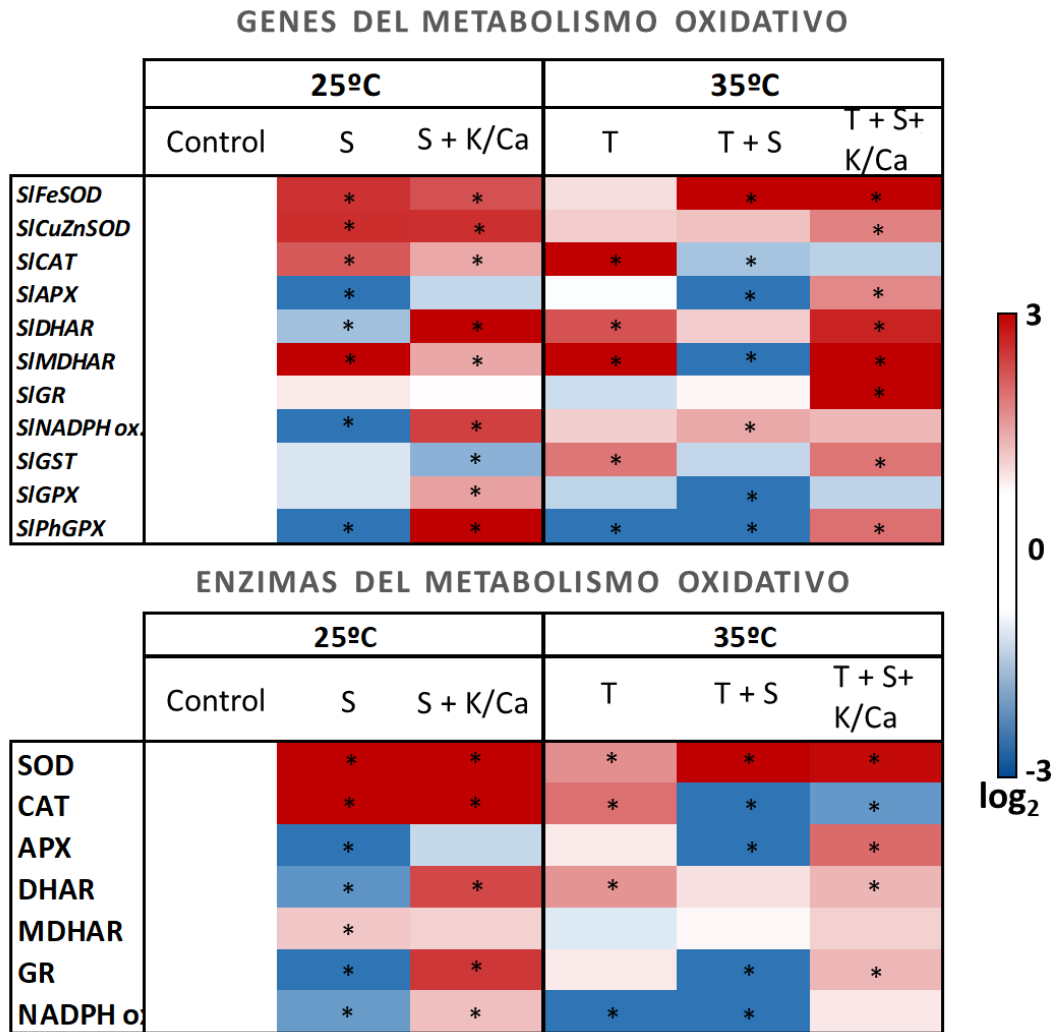


Figura 21: Expresión de los genes (A) y actividades enzimáticas (B) relacionados con el metabolismo oxidativo en hojas de tomate cultivadas bajo control, salinidad (60 mM NaCl) o salinidad y mayor concentración de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  en la solución nutritiva a temperatura óptima (25 ° C ) o temperatura elevada (35 ° C). El color rojo representa una expresión o actividad relativa más alta con respecto a las plantas de control y el color azul representa una expresión o actividad relativa más baja que sus respectivos controles. La escala es el valor  $\log_2$  de la expresión o la actividad después de una normalización con respecto a las plantas de control. Los asteriscos son representativos de diferencias significativas con respecto a las plantas de control ( $p \leq 0.05$ ).

### 5.1.3. Discusión

En regiones áridas y semiáridas, la mala calidad del agua de riego hace que primen los estudios sobre el efecto de la salinidad en el desarrollo de los cultivos, sin embargo, el efecto negativo que produce la salinidad en las plantas se agrava con las altas temperaturas encontradas en dichas regiones. Es por ello que se ha demostrado que las plantas muestran una respuesta específica a la combinación de dichos estreses que no puede ser dilucidada del estudios del efecto de los estreses de salinidad y alta temperatura por separado (Martinez y col., 2016; Rivero y col., 2014).

Capula-Rodríguez y col. (2016) destacó la importancia del uso de niveles más altos de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  en la solución nutritiva para mitigar el efecto de la combinación de estreses como salinidad, la alcalinidad y el boro en las plantas de tomate, lo que concuerda con los resultados obtenidos. Cuando la nutrición de las plantas se complementa con un aumento en la concentración de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ , éstas mejoran su crecimiento. Además, esto, a su vez, también está relacionado con una mayor concentración de fósforo, el mantenimiento de la concentración de clorofila a, y/o la restauración parcial de la absorción de otros nutrientes en estas condiciones estresantes.

En general, los problemas de salinidad se relacionan con un exceso de NaCl en el agua de riego, lo que provoca toxicidad de  $Na^+$  en las plantas, modifica la absorción de  $K^+$  por las raíces y otros nutrientes, y ejerce efectos tóxicos graves en los genes y las enzimas, causando alteraciones en el metabolismo de la planta (Chakraborty y col., 2016; Navarro y col., 2003). Por lo tanto, es vital para las plantas restablecer la homeostasis iónica celular para mantener el correcto funcionamiento y crecimiento metabólico.

La tasa de  $K^+/Na^+$  (Figura 14) está ampliamente relacionada con la tolerancia a la sal en las plantas (Pintero y col., 2014). En este sentido, este experimento demuestra que esta tasa fue mayor en las plantas en las que se administró la solución nutritiva enriquecida con  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  bajo el efecto de la salinidad o bajo el efecto de la combinación de estreses, que podría estar relacionada el aumento de la tolerancia de las plantas al efecto de dichos estreses.

Además, se encuentra una correlación positiva entre la producción de biomasa y la tasa de  $K^+/Na^+$  en las plantas a las que se administró mayor



concentración de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  y que crecieron bajo el efecto de la salinidad. Estos datos coincidieron con los observados en un estudio de Martínez y col. (2016) y Ahanger y col. (2017), donde la combinación de salinidad y temperatura causó una inhibición en la absorción de  $K^+$  que podrían deberse al efecto antagónico de  $K^+$  con  $Na^+$ .

Se ha postulado que algunos compuestos como osmoprotectores o compuestos antioxidantes ejercen una función reguladora manteniendo la concentración del  $K^+$  citosólico al prevenir la fuga de  $K^+$  inducida por el NaCl de la célula (Nieves-Cordones y col., 2019; Shabala y Cuin, 2008). Por ejemplo, se ha visto que  $K^+$  resulta en la acumulación de osmolitos y en el aumento de componentes antioxidantes en las plantas expuestas al estrés hídrico y salino (Ahanger y col., 2017). Por lo tanto, estos resultados podrían indicar que un aumento en la concentración de  $K^+$  en la solución nutritiva puede influir en la concentración de antioxidantes y otros compuestos beneficiosos en las plantas y, por lo tanto, en el mantenimiento de la homeostasis de  $K^+/Na^+$  en las plantas.

Los cambios en los parámetros fotosintéticos suelen ser buenos indicadores del estrés en las plantas, y están directamente relacionados con el crecimiento. La tasa de asimilación de  $CO_2$  (Figura 15) la tasa de transpiración (Figura 16), la conductancia estomática (Figura 17) y la eficiencia del uso de agua (Figura 18) se redujeron en condiciones de estrés, siendo más agresivo el efecto de los estreses combinados.

Estos datos fueron consistentes con los hallazgos de Pinero y col. (2014) y Rivero y col. (2014), donde se dice que tanto la salinidad como la combinación de los estreses de salinidad y alta temperatura conducen a una reducción de la conductancia estomática, reduciendo la capacidad de la planta para suministrar  $CO_2$  al aparato fotosintético, y como consecuencia, disminuyendo la asimilación de  $CO_2$  bajo condiciones de estrés. Por el contrario, también ha sido observado que el estrés de temperatura, cuando es aplicado por solitario, puede mejorar la tasa de transpiración de la planta para reducir así la temperatura de la hoja, lo que conduce a un incremento en la tasa de asimilación del  $CO_2$ .

Ese comportamiento de dichos parámetros también se encontró en este experimento, que están en acuerdo con los resultados encontrados por Rivero y col. (2014). Curiosamente, cuando las plantas se cultivaron bajo el estrés de salinidad o

del estrés combinado de salinidad y temperatura, pero se complementaba la solución nutritiva con  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ , la asimilación de  $CO_2$ , la tasa de transpiración y la conductancia estomática se recuperaban a valores similares a los encontrados en las hojas de las plantas control. Estos parámetros fotosintéticos están estrechamente relacionados con la tasa de crecimiento de las plantas, y estos resultados indican una correlación positiva entre ellos, donde una reducción en el crecimiento de las plantas (Figura 9) se relacionó directamente con una inhibición de estos parámetros fotosintéticos, y la recuperación de estos por el suministro adicional  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  implicó un mejor crecimiento en condiciones de estrés abiótico.

Abbas y col. (2013) y Bohra y Doerffling (1993) encontraron resultados similares en plantas de maíz y arroz, respectivamente, mediante la adición de  $K^+$  a un suelo salino. Ambos estudios concluyeron que la adición de  $K^+$  alivió significativamente los efectos dañinos de la salinidad, al mejorar el crecimiento de las plantas y los parámetros de intercambio gaseoso.

Además del  $K^+$ , el  $Ca^{2+}$  también desempeña un papel importante en las células de las plantas, ya que contribuye a los procesos de señalización de la célula y ayuda a la desintoxicación de las especies reactivas del oxígeno, además de otras funciones (Bacha y col., 2015; Malinska y col., 2010). Bhattacharjee (2008) observó que la adición de  $Ca^{2+}$  en las plantas ayuda a proteger contra el daño oxidativo que provoca en las plantas la alta temperatura.

Se sabe que los estreses de salinidad y alta temperatura aumentan el daño celular debido a una alta producción de ROS, (Martinez y col., 2018; Siddiqui y col., 2017; Zandalinas y col., 2017; Zandalinas y col., 2018), por lo que la importancia de mejorar el sistema de defensa antioxidante de las plantas para hacer frente a estos factores estresantes es muy importante. En estudios recientes, se ha observado que las plantas sometidas a diferentes combinaciones de estreses abióticos acumularon una gran cantidad de transcriptores de respuesta de la ruta de las ROS, lo que destaca la importancia de la maquinaria antioxidante en el proceso de adaptación de las rutas metabólicas ante la combinación de estreses (Suzuki y col., 2014; Zandalinas y col., 2018). Martinez y col. (2018) mostraron que las plantas de tomate sometidas a la combinación de salinidad y alta temperatura tenían una sobreproducción de ROS que causaba la inhibición de la fotosíntesis, la descomposición de los pigmentos fotosintéticos y la reducción del crecimiento de

las plantas. Sin embargo, aunque hay muchas publicaciones que demuestran la importancia de estudiar los estreses abióticos de manera combinada, existe poca información sobre el efecto de la nutrición en las plantas en la respuesta de tolerancia ante los estreses combinados, lo que llevó a plantear este experimento para verificar el posible papel del suministro adicional de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  en la mejora de la respuesta antioxidante en las plantas de tomate.

Bajo los estreses ambientales de salinidad y alta temperatura, donde el suministro de agua a la planta se ve comprometido, la concentración celular de  $CO_2$  se restringe debido al cierre estomático. Esto, junto con la luz solar continua que incide en la planta, da como resultado una transferencia de exceso de electrones a oxígeno molecular, generando un radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que la enzima superóxido dismutasa (SOD) detoxifica inmediatamente convirtiéndolo a  $H_2O_2$ .

Además, el estrés en la planta genera daños irreversibles a los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular, por lo que dos de los marcadores de estrés oxidativo más comúnmente utilizados para medir el daño oxidativo de las células son la concentración de  $H_2O_2$  y la peroxidación lipídica de los lípidos de membrana, medida como la concentración de derivados de MDA. Estos dos parámetros fueron evaluados en este experimento (Figura 19 y Figura 20).

El estrés en las plantas aumentó la acumulación de  $H_2O_2$ , pero cuando eran irrigadas con la solución nutritiva enriquecida en  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  dicha acumulación disminuía. Para el contenido de MDA, los resultados obtenidos fueron similares: la adición de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  extra a la solución nutritiva, redujo el nivel de peroxidación lipídica de las plantas.

Tanto la acumulación de  $H_2O_2$  como la peroxidación lipídica de la membrana conducen a un daño oxidativo de las células, inhibiendo la fotosíntesis e induciendo la inhibición del crecimiento de las plantas (Rivero y col., 2007; Rivero y col., 2014). Estos resultados muestran que las plantas de tomate donde se acumuló  $H_2O_2$  a concentraciones más altas (Figura 19), mostraron una mayor peroxidación lipídica (Figura 20) y un deterioro significativo de los parámetros fotosintéticos (Figura 15, Figura 16 y Figura 17), con la consecuente inhibición del crecimiento de las plantas (Figura 9).

El deterioro de la maquinaria antioxidante celular en condiciones de estrés abiótico puede ser causado por una sobreproducción de ROS, una inhibición

de las enzimas antioxidantes, o ambos. Esta inhibición puede ocurrir a niveles transcripcionales o post-transcripcionales, o por modificaciones post-traduccionales de las proteínas antioxidantes necesarias para contrarrestar los efectos nocivos de las ROS.

Después de examinar los mapas de calor correspondientes a los genes y enzimas relacionadas con el metabolismo oxidativo (Figura 21), se observó que las plantas de tomate tienen una respuesta antioxidante específica bajo la combinación de salinidad y alta temperatura, y que la respuesta de los genes o enzimas no se puede deducir de las respuestas individuales de la salinidad o la alta temperatura aplicados de forma independiente. Estos resultados confirman los obtenidos previamente por Rivero y col. (2014), Martínez y col. (2016), y Martínez y col. (2018), y resaltan la importancia de estudiar los estreses abióticos combinados y no como estreses individuales.

En relación al ciclo del sistema antioxidante, la inhibición de una o más de estas enzimas en plantas cultivadas bajo el efecto de la salinidad o bajo el efecto combinado de la salinidad y la alta temperatura, puede explicar la alta concentración de  $H_2O_2$  encontrada en estos tratamientos, donde la desintoxicación de este compuesto no fue tan eficiente en comparación con las plantas de control. Esto dio lugar a la acumulación de este compuesto, el daño oxidativo y la inhibición del crecimiento de las plantas (Rivero y col., 2007; Rivero y col., 2014).

La primera línea celular de defensa para la desintoxicación de ROS está constituida por la SOD, la cual detoxifica los radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) dando lugar a la formación de  $H_2O_2$  (Monk y col., 1989). En este sentido, la sobreproducción de  $H_2O_2$  observada en los diferentes tratamientos de estrés aplicados en este experimento se correlacionó perfectamente con la sobreexpresión de los transcritos que codifican para los genes Fe-SOD y Cu/Zn-SOD (Figura 21), con un consiguiente aumento en la actividad SOD. Los niveles de  $H_2O_2$  encontrados en las plantas que estaban sometidas a estrés pero que fueron suplementadas con la solución nutritiva enriquecida con  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ , fueron más bajos que los de las plantas cultivadas con la solución nutritiva normal bajo las mismas condiciones de estrés, lo que puede deberse a: (1) una menor producción de este compuesto en estos tratamientos, debido a los efectos beneficiosos del suministro adicional de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  en condiciones de estrés, o (2) una detoxificación del  $H_2O_2$  más efectiva impulsada por

una sobreexpresión de los transcritos que codifican para el gen Fe-SOD (Figura 21) con el consiguiente aumento en la actividad de la proteína SOD bajo esas mismas condiciones. La acumulación de  $H_2O_2$  también tiene un efecto perjudicial en las células vegetales, lo que se correlaciona con los resultados obtenidos en la biomasa de las plantas que estaban sometidas a los distintos estreses del experimento (Foyer y Noctor, 2005). Por lo tanto, un sistema de detoxificación del  $H_2O_2$  de las células que sea eficaz debe funcionar en coordinación para evitar la acumulación celular de este compuesto. En este sentido, la CAT y las enzimas pertenecientes al ciclo del ascorbato-glutatión actúan juntos para desintoxicar el  $H_2O_2$  de las células a  $H_2O$ .

GST, PhGPX y GPX catalizan la reducción dependiente de GSH de  $H_2O_2$  y peróxidos orgánicos, incluidos los peróxidos lipídicos a  $H_2O$  o alcoholes (Ahanger y col., 2017). El ciclo de la ascorbato-glutatión (AsA-GSH) actúa en paralelo a la CAT en la desintoxicación efectiva de  $H_2O_2$ . En este experimento, la transcripción de los diferentes transcritos que codifican para las enzimas antioxidantes del ciclo AsA-GSH se vieron afectados de manera diferente según el tratamiento de estrés y la solución de riego utilizada. Por lo tanto, el estrés por salinidad reguló a la baja las transcripciones que codifican para APX, DHAR y NADPH oxidasa, con la consecuente inhibición de las enzimas relacionadas.

Por otro lado, la suplementación de plantas con la solución nutritiva enriquecida parece inducir la transcripción de todos los genes involucrados en la desintoxicación eficiente de  $H_2O_2$  (es decir, *SIAPX*, *SIDHAR*, *SIMDHAR*, *SIGR*, *SINADPH oxidasa*), reduciendo significativamente el daño oxidativo observado en plantas cultivadas bajo la combinación de salinidad y temperatura, y la activación de genes relacionados con el estrés implicados en los mecanismos de señalización para la desintoxicación de ROS (Ahmad y col., 2018). Por lo tanto,  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  pueden contribuir al mantenimiento de la homeostasis redox celular, protegiendo la fotosíntesis y los sistemas de transporte de electrones y aumentando la tolerancia de las plantas a los estreses abióticos.

Estos resultados se correlacionaron bien con los datos obtenidos para el nivel de peroxidación lipídica en estas plantas (Figura 20), donde se observó que el  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  usados en concentraciones más altas que las recomendadas disminuyeron el nivel de peroxidación lipídica en los tratamientos de salinidad y el tratamiento de estrés combinado de salinidad y alta temperatura en comparación con las plantas

irrigadas con la solución nutritiva normal y cultivada en las mismas condiciones de estrés.

Este capítulo destaca la importancia de la nutrición de las plantas en los procesos de señalización que controlan las respuestas de tolerancia de las plantas a la combinación de estrés abiótico. En este sentido, los resultados pueden indicar que  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  podrían desempeñar un papel en la regulación transcripcional de los genes que codifican para las enzimas involucradas en la reducción del  $H_2O_2$  y, en consecuencia, también pueden desempeñar un papel en la protección de los lípidos de membrana en condiciones de estrés abiótico. Sin embargo, se necesitan más estudios para dilucidar completamente el papel de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  en estos mecanismos de señalización.

## 5.2. EXPERIMENTO 2: SELECCIÓN DE LÍNEAS RECOMBINANTES DE TOMATE CON DIFERENTE TOLERANCIA A LA COMBINACIÓN DE SALINIDAD Y ALTA TEMPERATURA

### 5.2.1. selección en invernadero

El experimento se realizó bajo condiciones de invernadero, donde se cultivaron 84 líneas recombinantes de tomate en dos módulos distintos, usando como sustrato lana de roca. En el módulo A se fijó una temperatura ambiental de 25°C, y a las plantas se les suministró una solución Hoagland completa. El módulo B fue fijado a una temperatura ambiental de 35°C, y a las plantas se les administró una solución nutritiva Hoagland completa, pero modificada con 75 mM de NaCl. Las líneas recombinantes crecieron en ambos invernaderos bajo estas condiciones hasta el momento de la floración (aproximadamente cuatro semanas después de su trasplante a los invernaderos), momento en el que se procedió a su muestreo. No se obtuvieron datos relevantes de 22 de las 84 líneas RILs estudiadas, por lo que se descartaron de la interpretación de resultados y de los siguientes ensayos.

#### *Biomasa de las plantas*

Una vez finalizado el experimento, se determinó el vigor de cada una de las líneas recombinantes. Los pesos frescos de las plantas control variaron desde los aproximadamente 125 gramos por planta, que se obtuvieron con la RIL-50, hasta los 444 gramos de línea RIL-16 (Figura 22).

Bajo condiciones de combinación de salinidad y temperatura, los pesos frescos de las plantas disminuyeron de manera general en casi todas las líneas estudiadas, variando desde los 65 g obtenidos en la línea RIL-1 hasta los 301 g de la línea RIL-76 (Figura 23).

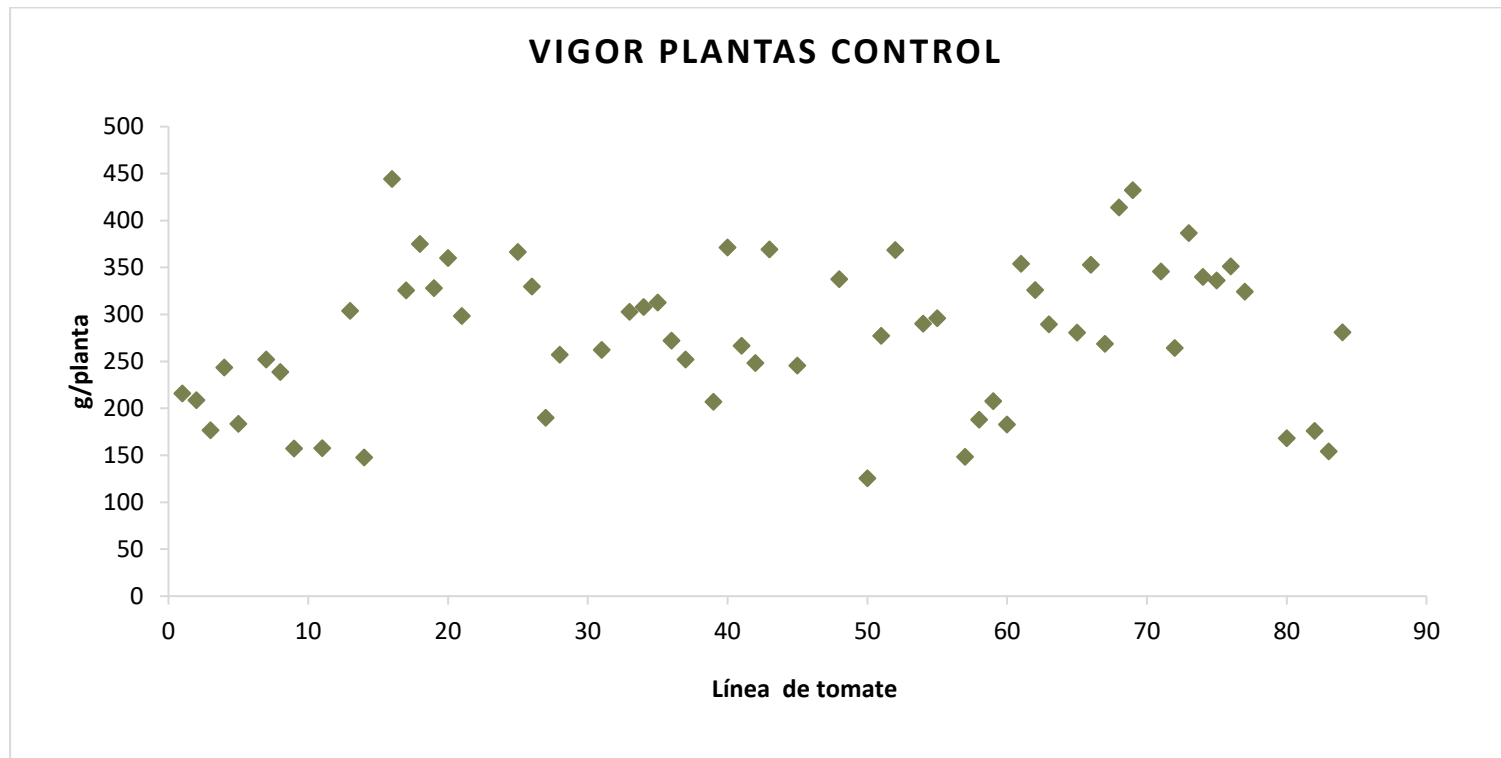


Figura 22: Vigor de las distintas líneas de tomate en condiciones control. Los valores corresponden al promedio de peso fresco de las distintas plantas.



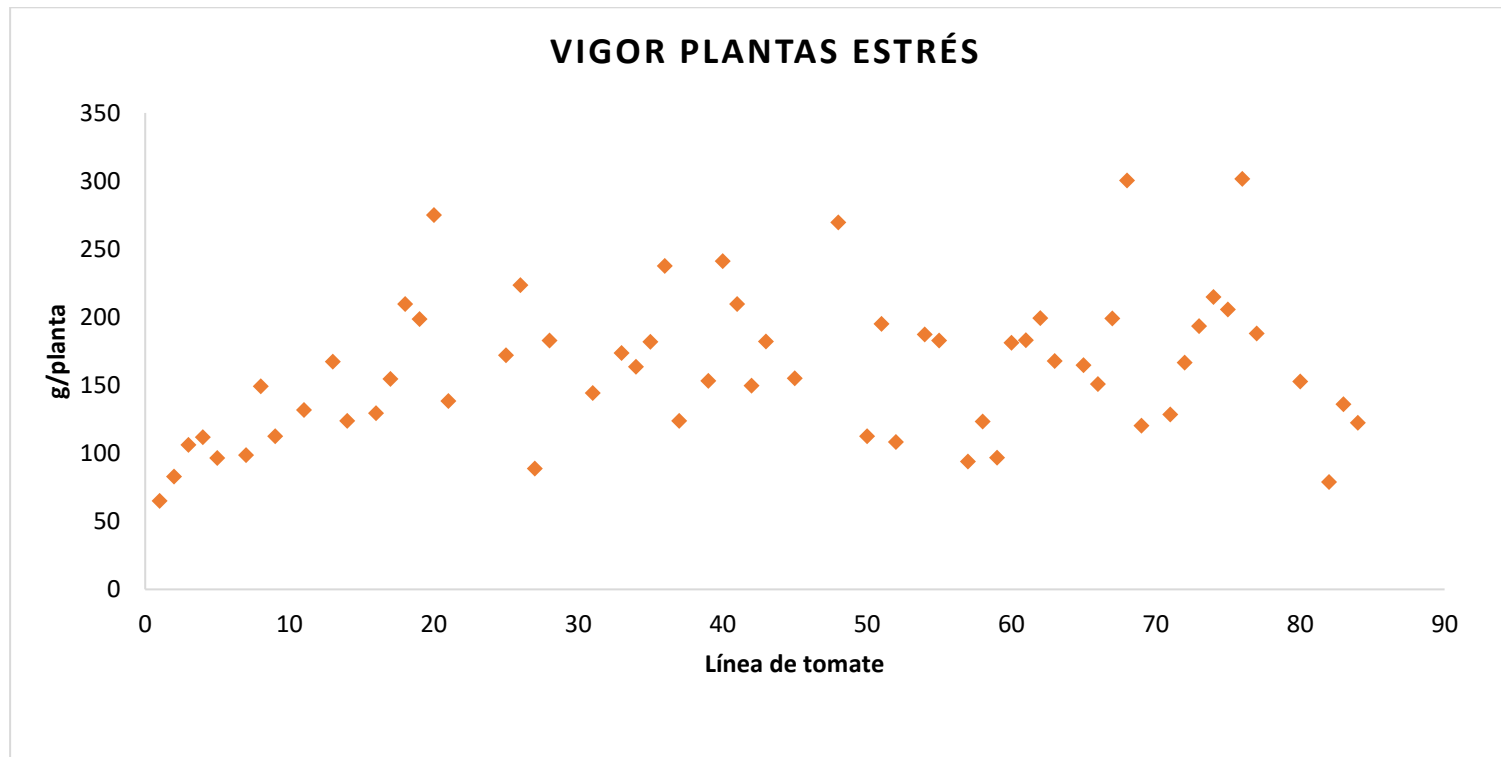


Figura 23: Vigor de las distintas líneas de tomate en condiciones de combinación de salinidad y alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). Los valores corresponden al promedio de peso fresco de las distintas plantas.

### *Tolerancia*

Una vez conocidos los pesos de las plantas en fresco, se determinó el grado de tolerancia a la combinación de salinidad y alta temperatura de las diferentes líneas recombinantes de tomate. Para facilitar este estudio, este grado de tolerancia se dividió en tres categorías dependiendo de la diferencia de vigor obtenida en las plantas sometidas a estrés combinado respecto a sus respectivas plantas control (Tabla 12). El límite de los grupos de estableció en base a la línea de tomate más tolerante y menos tolerante, es decir, la línea RIL-60 con casi un 100% de tolerancia (Figura 25), y la línea RIL-69, con tan sólo un 27% de tolerancia (Figura 29).

Tabla 12: Grupos de tolerancia de las distintas líneas de tomate en base a la variación de peso fresco que se obtuvo en las plantas sometidas a estrés combinado respecto a las plantas control.

<b>Rango</b>	<b>%tolerancia</b>
<b>Muy tolerantes</b>	100%-76%
<b>Tolerancia intermedia</b>	75%-51%
<b>Poco tolerantes</b>	50-27%

Las líneas muy tolerantes, cuyo crecimiento en condiciones de estrés superó el 76% del vigor de la planta con respecto a condiciones control, se recogen en la Figura 24. La Figura 25 recoge la variación de peso fresco obtenido en las plantas muy tolerantes, tanto en condiciones control como en condiciones de estrés abiótico combinado.

La línea más tolerante fue la línea RIL-60, con una tolerancia casi del 100% (Figura 24), ya que el peso fresco de las plantas sometidas al estrés combinado de salinidad y temperatura fue similar al peso fresco de las plantas control (Figura 25).

La menos tolerante del grupo fue la RIL-20, con una tolerancia de en torno al 76%, donde se observaron diferencias significativas entre el peso fresco de las plantas bajo condiciones control y bajo condiciones de estrés combinado.

Las líneas en las que también se encontraron diferencias significativas entre el peso fresco de las plantas bajo condiciones óptimas de cultivo y las que crecieron bajo el efecto de la salinidad y la alta temperatura fueron la línea RIL-41 y la RIL-

76 (Figura 25). En el resto de plantas la acción combinada de los estreses abióticos no varió significativamente el peso fresco de las plantas.

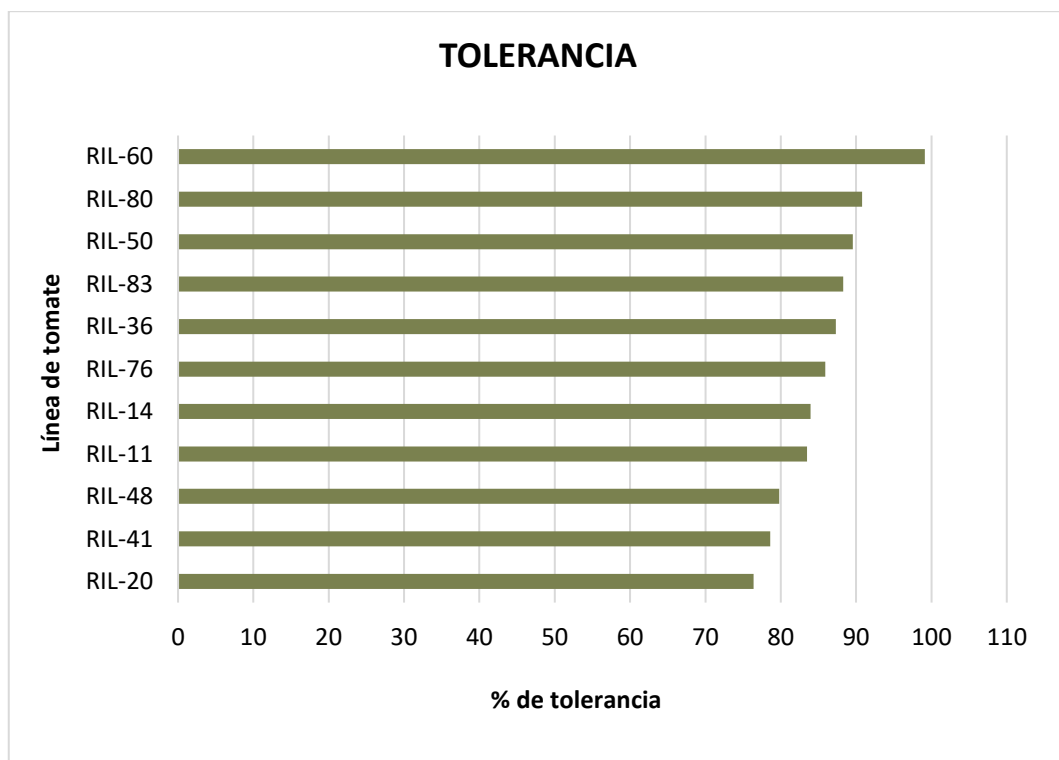


Figura 24: Tolerancia a la combinación de salinidad y alta temperatura expresada en porcentaje de las líneas recombinantes de tomate definidas como "Muy tolerantes" a la combinación de salinidad y alta temperatura.

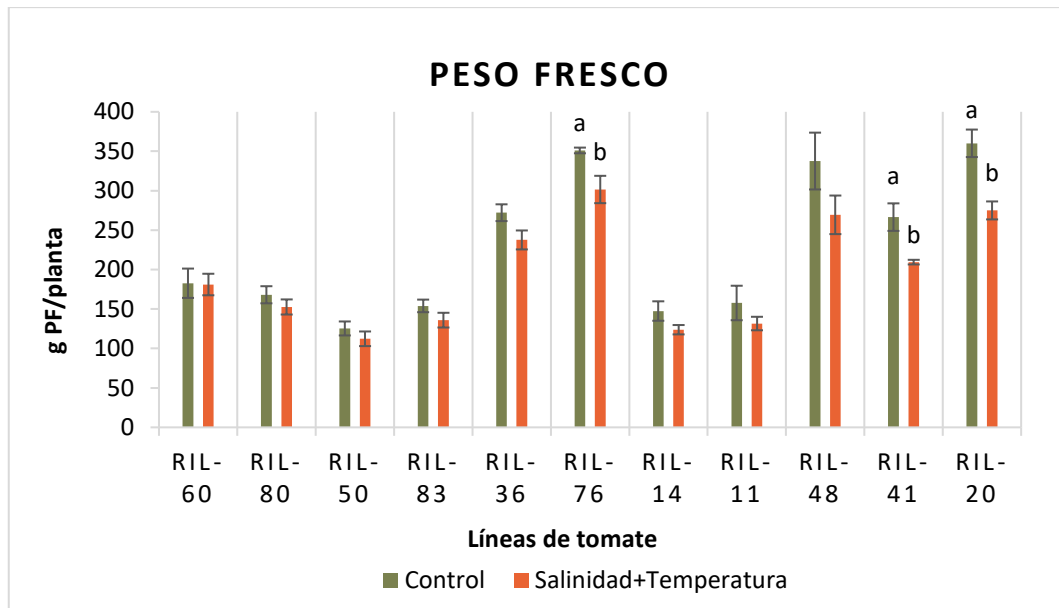


Figura 25: Peso fresco de las líneas de tomate definidas como “Muy tolerantes” en condiciones control y bajo la combinación de salinidad y alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=4). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

Las líneas con tolerancia intermedia (Figura 28) fueron las que presentaron un crecimiento de las plantas en condiciones de estrés de entorno al 51%-75% respecto a condiciones control. Dentro de este rango, la que mayor tolerancia presentó fue la línea RIL-67, con un crecimiento en condiciones de estrés del 74% respecto al control. La línea que menor tolerancia presentó fue la línea RIL-31, con un porcentaje de tolerancia del 53%.

La acción combinada de la salinidad y la temperatura redujo significativamente el peso fresco de las plantas en condiciones de estrés respecto a las plantas control en todas las líneas (Figura 29).

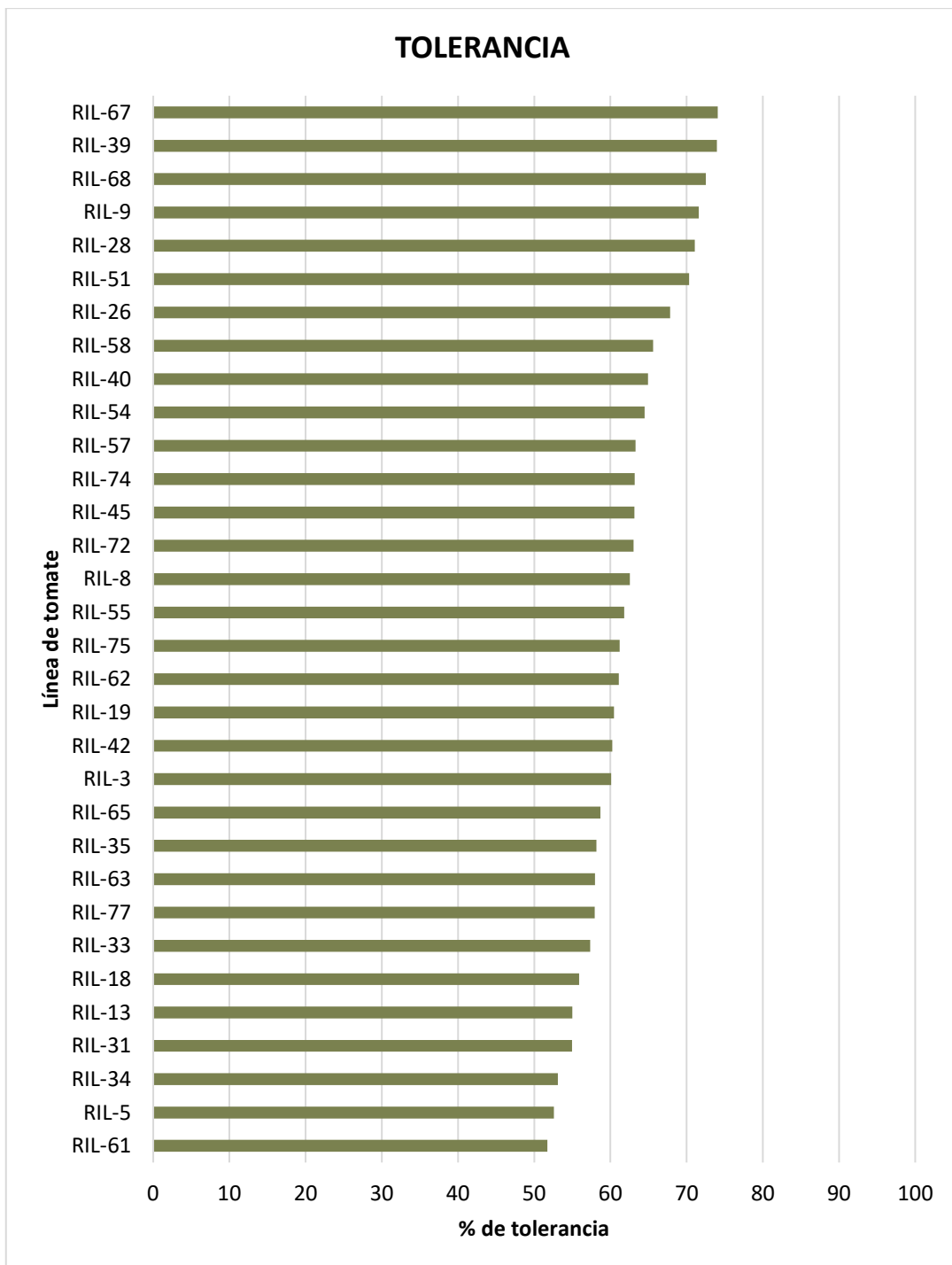


Figura 26: Tolerancia expresada en porcentaje de las líneas de tomate definidas como de "Tolerancia intermedia" a la combinación de salinidad y alta temperatura.

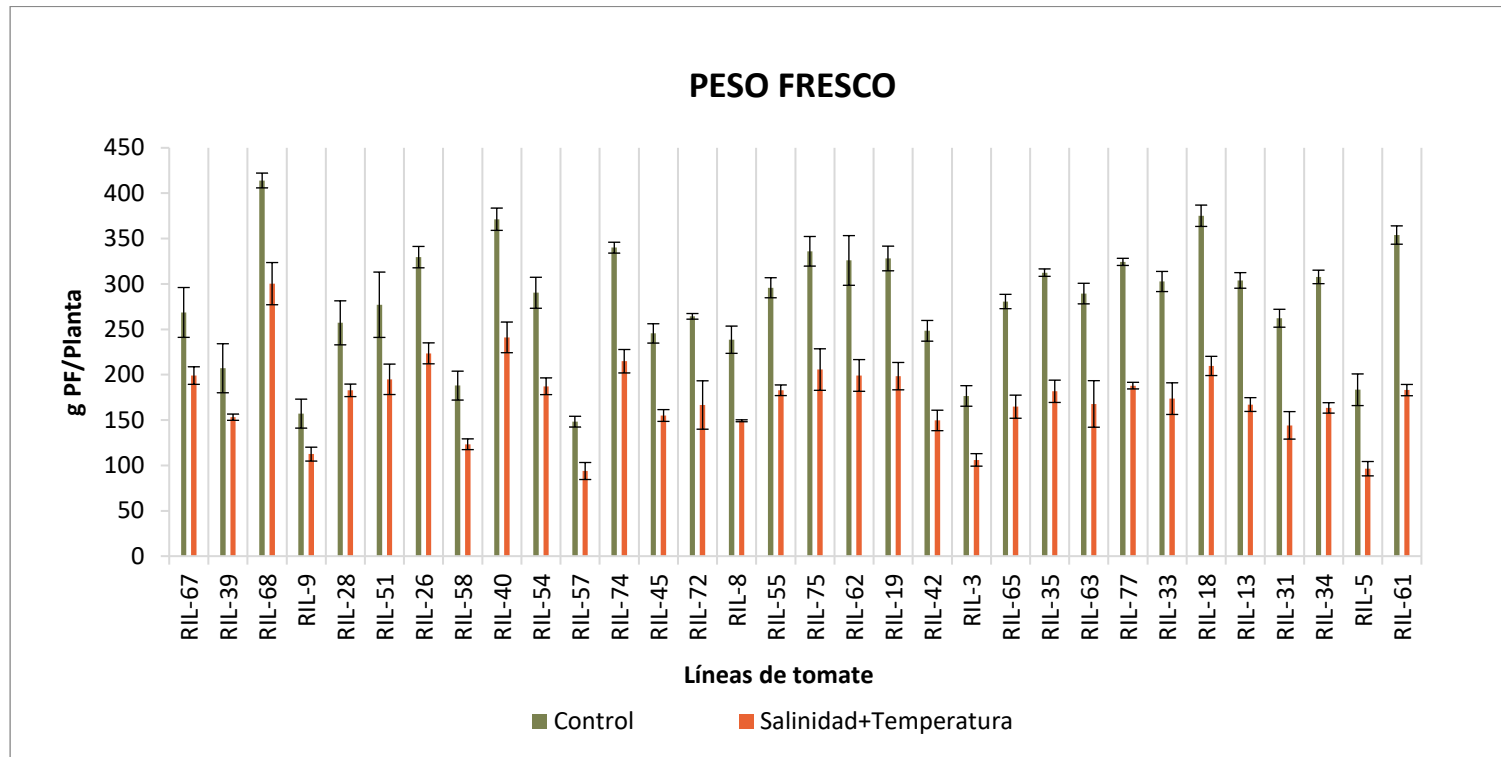


Figura 27: Peso fresco de las líneas de tomate definidas como de “Tolerancia intermedia” en condiciones control y en condiciones de estrés combinado de salinidad y alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=4). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

Las líneas poco tolerantes fueron las que crecieron en torno a un 27-50% bajo condiciones de estrés abiótico combinado respecto a las plantas control (Figura 28). La línea más tolerante dentro de este grupo fue la línea RIL-73, que presentó una tolerancia de entorno al 50%. La línea menos tolerante fue la línea RIL-69, que presentó una tolerancia del 27%. Ésta línea también fue la que menor grado de tolerancia presentó a la combinación de salinidad y alta temperatura de todo el ensayo.

La acción combinada de la salinidad y la temperatura dio lugar a una reducción significativa del crecimiento de las plantas crecidas bajo condiciones de estrés combinado respecto a las crecidas bajo condiciones control en todas las líneas recombinantes del grupo estudiadas (Figura 29).

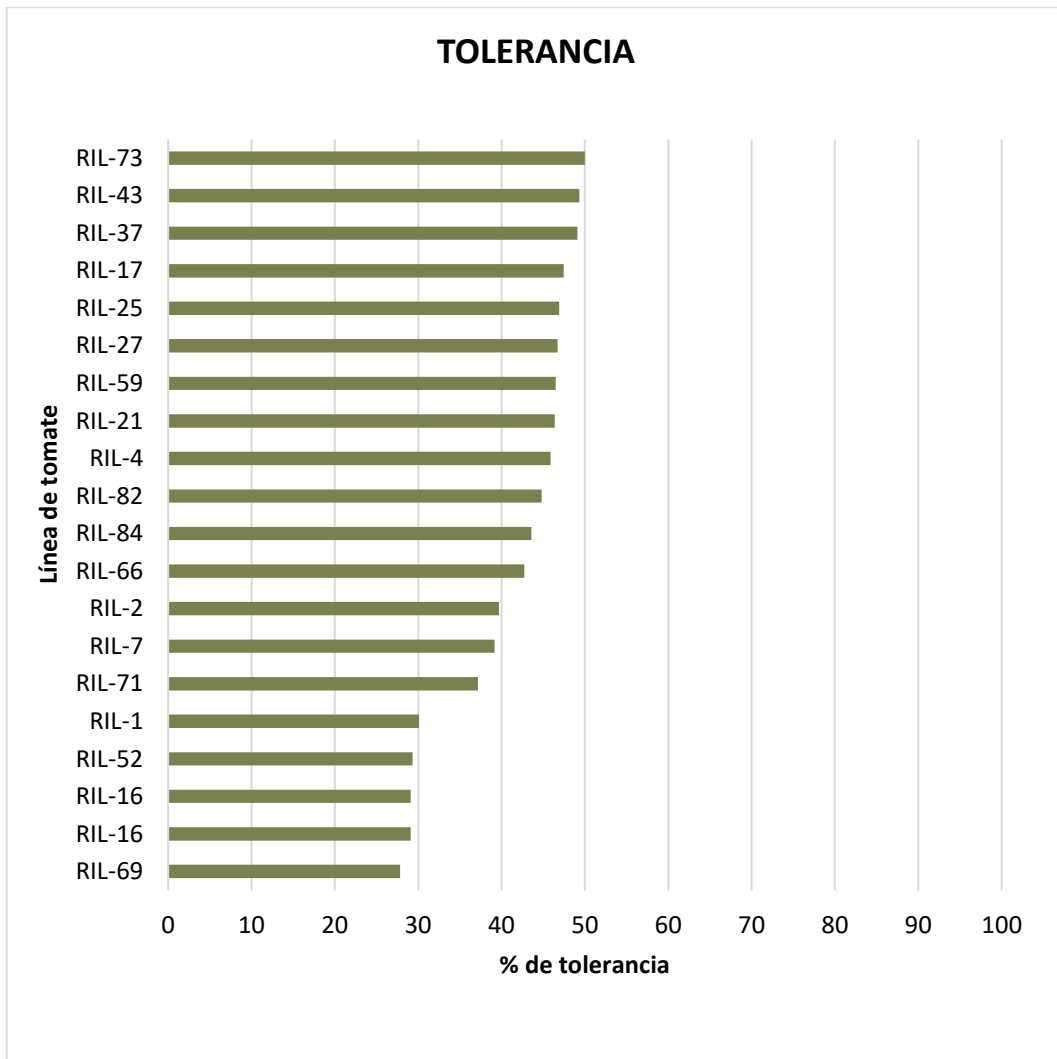


Figura 28: Tolerancia expresada en porcentaje de las líneas de tomate definidas como “Poco tolerantes” a la combinación de salinidad y alta temperatura.



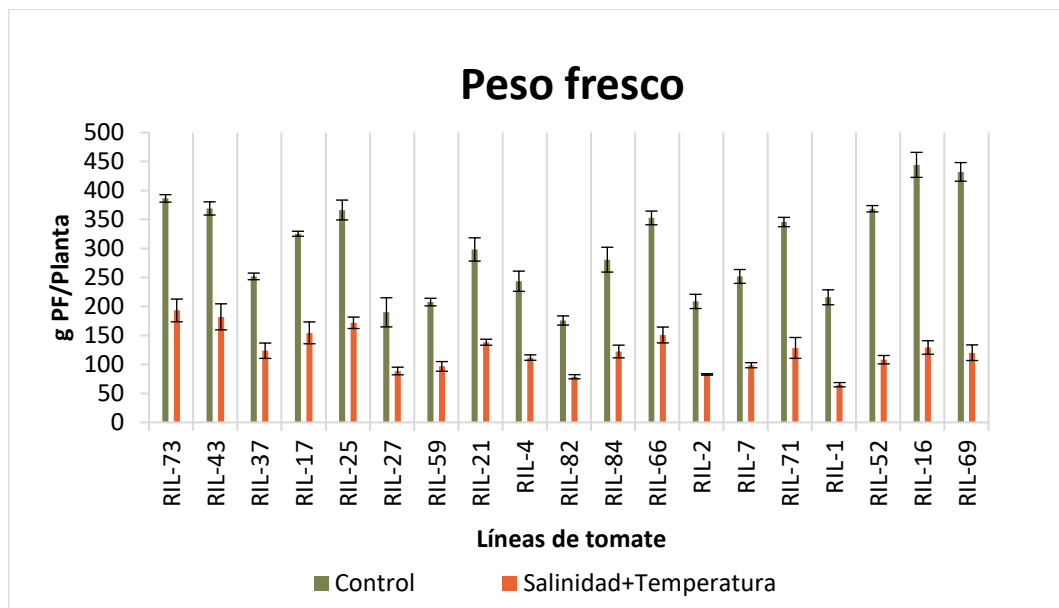


Figura 29: Peso fresco de las líneas de tomate definidas como de “Poco tolerantes” en condiciones control y bajo combinación de salinidad y alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=4). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

### Líneas seleccionadas

Una vez hecha la división de las diferentes RILs en función de su grado de tolerancia a la combinación de salinidad y alta temperatura, se procedió a la selección de 12 líneas. Éstas fueron crecidas de nuevo bajo condiciones controladas de cámara de cultivo con el objetivo de comprobar si los rangos de tolerancia eran reproducibles y extrapolables del invernadero a las cámaras (Tabla 13). Las 12 líneas se seleccionaron con rangos crecientes de tolerancia, de menos a más tolerante y cogiendo distintas líneas representativas de cada grupo de tolerancia anteriormente establecido. Así, de las líneas denominadas como “Muy tolerantes”, se seleccionaron la línea RIL-11, la RIL-20 y la RIL-76. La RIL-76 y la RIL-20 se seleccionaron porque fueron de las plantas que más biomasa presentaron bajo condiciones control y de combinación de estreses abióticos dentro de las muy tolerantes. La línea RIL-11 se seleccionó porque tenía una menor biomasa y las diferencias entre los pesos en condiciones óptimas y de estrés no fueron significativas.

De las líneas definidas como “Tolerancia intermedia”, se seleccionaron las siguientes: RIL-18, RIL-40, RIL-66, RIL-73, RIL-74 y RIL-77, presentando entre ellas diferentes rangos de tolerancia y crecimiento de menos a más.

Las líneas seleccionadas del grupo “Poco tolerantes” fueron la línea RIL-16, la línea RIL-25, línea RIL-69 y la línea RIL-73. La línea RIL-69 fue la que menor porcentaje de tolerancia presentó en el experimento, y se eligió junto con la RIL-16 porque desarrollaron una biomasa similar. Las líneas RIL-25 y RIL-73 obtuvieron una biomasa similar, pero presentaron una tolerancia mayor a las anteriores.

Tabla 13: Líneas seleccionadas en base a su rango de tolerancia para la consecución de los siguientes experimentos.

<b>Líneas seleccionadas</b>	<b>Rango</b>
RIL-11	Muy tolerante (76-100%)
RIL-20	Muy tolerante (76-100%)
RIL-76	Muy tolerante (76-100%)
RIL-18	Tolerancia intermedia (51-75%)
RIL-40	Tolerancia intermedia (51-75%)
RIL-66	Tolerancia intermedia (51-75%)
RIL-74	Tolerancia intermedia (51-75%)
RIL-77	Tolerancia intermedia (51-75%)
RIL-16	Poco tolerante (27-50%)
RIL-25	Poco tolerante (51-75%)
RIL-69	Poco tolerante (27-50%)
RIL-73	Poco tolerante (27-50%)

### 5.2.2. selección en cámara de cultivo

Una vez seleccionadas estas 12 líneas recombinantes de tomate con distintos rangos de tolerancia (Tabla 13), se procedió a realizar un ensayo de reproducibilidad y segunda selección en cámara de cultivo con las mismas condiciones que el ensayo realizado en invernadero tal y como se ha descrito en el apartado Material y Métodos.

### *Tolerancia*

Una vez concluido el experimento en cámara, se procedió a determinar el PF de las hojas en plantas control y plantas crecidas bajo la combinación de salinidad y alta temperatura. Una vez conocido este parámetro, se procedió al cálculo del grado de tolerancia de la misma manera que se realizó en el experimento anterior (Figura 30).

La línea más tolerante fue de nuevo la RIL-76, con una tolerancia de casi el 80%, ya que las plantas de esta línea presentaron una biomasa bajo condiciones de estrés combinado superior al 80% a la obtenida en las plantas control, lo que se corresponde con el anterior experimento. Además, la aplicación conjunta de los estreses de salinidad y temperatura no tuvo efectos significativos sobre el peso fresco de las plantas respecto a las plantas control (Figura 31).

Las líneas RIL-11 y RIL-20, que también se seleccionaron como “Muy tolerantes” perdieron tolerancia a la acción de los estreses combinados, situándose en este experimento en cámara de cultivo en un 50% y un 60%, respectivamente, a pesar de que la línea RIL-11 fue la que mayor biomasa presentó bajo condiciones control. Además, en estas líneas, los valores de tolerancia obtenidos durante este experimento en cámara de cultivo, no se correspondieron con los obtenidos anteriormente bajo condiciones de invernadero. La línea RIL-11 perdió en torno a un 30% de tolerancia frente al 15% que perdió la línea RIL-20.

Las líneas menos tolerantes fueron la RIL-40 y la RIL-66, con una tolerancia de en torno al 20% y al 27% respectivamente. La RIL-40 no reprodujo los resultados obtenidos en la primera selección, ya que su tolerancia disminuyó del 64% al 27%, en cambio, la línea RIL-69, obtuvo unos valores de tolerancia similares a los descritos anteriormente.

A pesar de que las líneas RIL-11, RIL-18, y RIL-73 presentaron una biomasa superior al resto de plantas bajo condiciones control, la tolerancia de las mismas fue de entorno a un 44% y un 40% en el caso de las líneas RIL-18 y RIL-73, y de un 49% en el caso de la línea RIL-11, perdiendo gran cantidad de esta biomasa cuando estas líneas eran crecidas bajo la combinación de estreses abióticos.

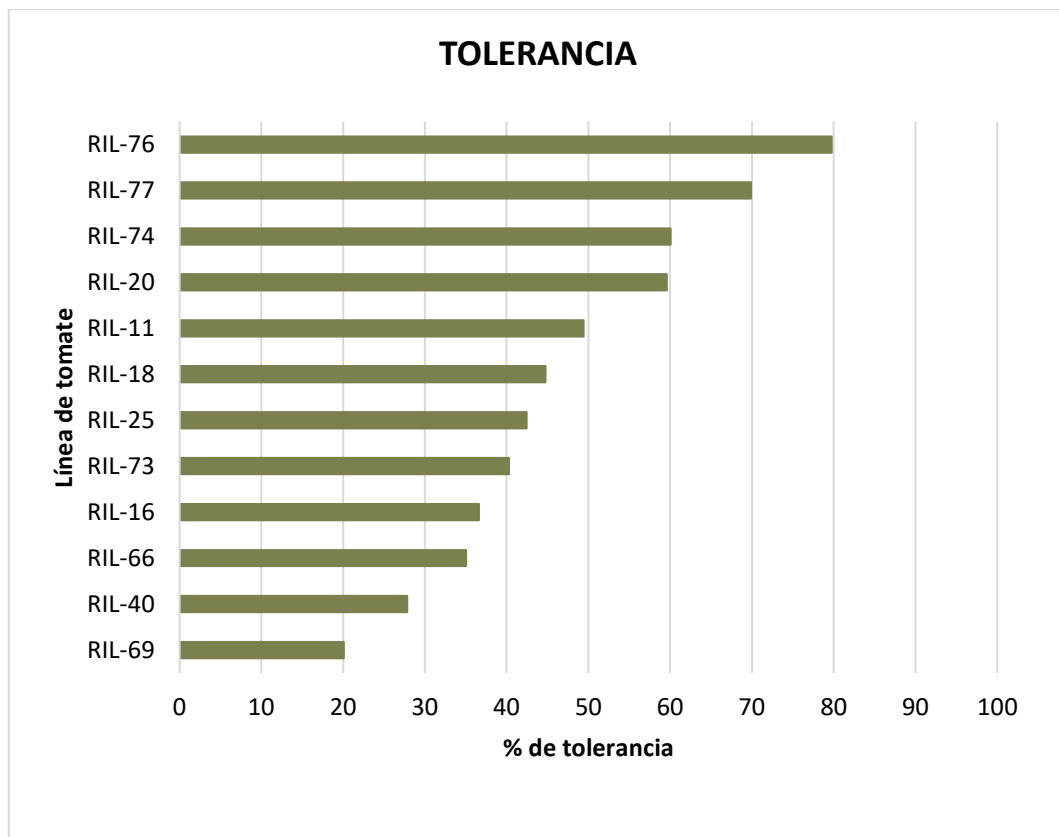


Figura 30: Tolerancia expresada en porcentaje a los estreses combinados de salinidad y alta temperatura de las 12 líneas de tomate seleccionadas en este experimento.

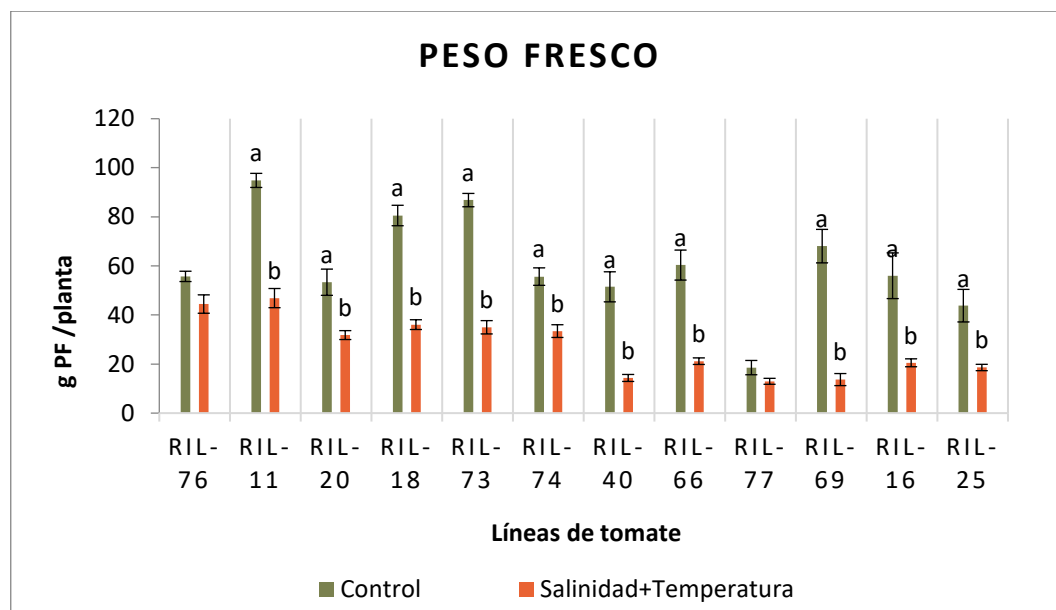


Figura 31: Peso fresco de las 12 líneas de tomate seleccionadas en condiciones control y bajo combinación de salinidad y alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=4). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

### *Líneas seleccionadas*

Una vez terminado el estudio de reproducibilidad de las 12 líneas se volvieron a seleccionar únicamente 5 líneas, de esas 12, con distintos rangos de tolerancia la combinación de estreses para la consecución del siguiente experimento. Los rangos se establecieron tomando como referencia la tolerancia obtenida en esta segunda selección. Así, las líneas seleccionadas se recogen en la Tabla 14.

Tabla 14: Líneas seleccionadas en base a su rango de tolerancia para la consecución de los siguientes experimentos.

<b>Líneas seleccionadas</b>	<b>Rango</b>
<b>RIL-76</b>	Muy tolerante (60-100%)
<b>RIL-74</b>	Muy tolerante (60-100%)
<b>RIL-18</b>	Tolerancia intermedia (40-60%)
<b>RIL-73</b>	Tolerancia intermedia (40-60%)
<b>RIL-66</b>	Poco tolerante (20-40%)

### 5.2.3. Discusión

Este estudio fue diseñado para obtener una primera información de la respuesta de las RILs a los estreses combinados de salinidad y alta temperatura, dos condiciones ambientales que normalmente se dan de manera conjunta en las regiones áridas y semiáridas del mundo. Tanto la salinidad como la alta temperatura se han estudiado ampliamente como estreses individuales, y se ha logrado tener un gran conocimiento sobre los mecanismos fisiológicos y moleculares que subyacen en el proceso de adaptación de las plantas a dichos estreses (Rivero y col., 2014). No obstante, la respuesta de las plantas al estrés combinado no puede deducirse de la respuesta que éstas presentan a los estreses aplicados de manera individual (Mittler y Blumwald, 2010), ya que presenta componentes específicos, la mayoría de las veces no observables, cuando estos estreses son aplicados de forma aislada (Rivero y col., 2019).

Los resultados descritos anteriormente demuestran que los estreses de salinidad y alta temperatura aplicados de manera conjunta tuvieron un impacto negativo en el desarrollo de las plantas, ya que, aquellas que se cultivaron bajo dichas condiciones, presentaron una biomasa menor que las que crecieron en condiciones óptimas de cultivo (Figura 22, Figura 23). No obstante, el efecto del estrés combinado no causó el mismo efecto en las distintas RILs estudiadas, ya que presentaron diferentes rangos de tolerancia a la combinación de salinidad y alta temperatura. En la primera selección de líneas RILs que se llevó a cabo bajo condiciones de invernadero, las diferencias de tolerancia variaron desde una

tolerancia de casi el 100% que presentó la línea RIL-60, hasta una tolerancia del 27% que presentó la línea RIL-69.

Esta diferencia en los rangos de tolerancia entre las plantas estudiadas podría tener su origen en la hibridación de las variedades *S. pimpinellifolium* L. y *S. lycopersicum* L. Como se ha mencionado anteriormente, *S. pimpinellifolium* L. tiene su origen en zonas de Sudamérica (Blanca y col., 2015; Lin y col., 2019) donde las plantas están expuestas a condiciones ambientales adversas como la salinidad y la alta temperatura (Blanca y col., 2012; Zuriaga y col., 2009), lo que ha propiciado que esta variedad silvestre muestre una mayor tolerancia a dichos estreses, una cualidad fenotípica que se ha perdido durante el proceso de domesticación del tomate actualmente cultivado (Bai y Lindhout, 2007; Lyu, 2016). Es posible, por lo tanto, en base a los resultados obtenidos, que las RILs que presentan mayor rango de tolerancia a los estreses abióticos aplicados hayan heredado segmentos cromosómicos que incluyan a los genes involucrados en la respuesta al estrés abiótico del parental silvestre, y que, por consiguiente, estén filogenéticamente más cercanas a dicho parental que a la variedad *S. lycopersicum* L. Esta teoría estaría en concordancia con los resultados obtenidos por Razali y col. (2018), donde se demostró mediante un análisis genómico que la variedad silvestre *S. pimpinellifolium* L. está enriquecida en genes involucrados en la respuesta al estrés abiótico en comparación con la variedad comercial. Por el contrario, es de suponer que las líneas que presentaron una menor respuesta adaptativa a la acción de los estreses combinados de salinidad y alta temperatura debían estar filogenéticamente más cercanas a la variedad comercial que a la variedad silvestre en cuanto a la resistencia a estreses abióticos se refiere. Por el contrario, aunque el crecimiento vegetativo de las plantas ante la combinación de estreses difiera entre las líneas sensibles y tolerantes, en el Experimento 4 se verá que esas diferencias en el rango de tolerancia no son determinantes para la calidad de los frutos, ya que estos no llegaron a obtener los parámetros de calidad demandados por el mercado actual ni en la línea sensible ni en la línea tolerante.

Las líneas RILs seleccionadas para la consecución de los siguientes experimentos (Tabla 13) fueron elegidas de entre los diferentes rangos de tolerancia. De esta manera, se pudo establecer comparaciones entre la respuesta de las plantas más tolerantes y aquellas que tenían menor capacidad de adaptación.

No obstante, y como indica Lin y col. (2014) en sus estudios, a lo largo de la historia de la mejora vegetal, la selección ha ido más orientada hacia el fenotipo de los frutos que a la adaptación de las plantas a condiciones adversas, por lo que en los siguientes ensayos también se tendrá en cuenta, a parte del rango de tolerancia de las líneas seleccionadas, el comportamiento agronómico de las mismas.

Las RILs también son una población interesante de estudio debido a que las líneas son genéticamente homocigóticas, por lo que pueden distribuirse y replicarse para distintos experimentos en diferentes laboratorios y entornos (Ashrafi y col., 2009; Paran y col., 1995), lo que supone una característica crucial para cuantificar el efecto de la interacción del ambiente en los rasgos agronómicos de las plantas (Capel y col., 2015). El segundo estudio de selección de las RILs confirma esta afirmación, ya que, salvo alguna excepción, los resultados de tolerancia a los estreses combinados de salinidad y alta temperatura que se obtuvieron en el experimento realizado en cámara de cultivo (Figura 30), donde las condiciones climáticas tienen un control más estricto, guardaron similitud con los resultados encontrados en la primera selección que se realizó bajo condiciones de invernadero.

Las líneas RIL-69, RIL-66, RIL-73, RIL-25, RIL-18 RIL-74 y RIL-76 variaron su porcentaje de tolerancia respecto al experimento anterior en menos de un 10%, lo que puede considerarse una respuesta aceptable, ya que, el estrés combinado, puede afectar de diferente manera dependiendo del estado de desarrollo en el que se encuentre la planta (Mittler, 2006; Rivero y col., 2019). En cambio, las líneas RIL-40 y RIL-11 variaron su rango de tolerancia al estrés en torno a un 40%, lo que demuestra que la respuesta de las plantas a diferentes estreses aplicados de manera combinada es muy compleja, puesto que la reacción a dichos estreses está controlada por diferentes e, incluso, opuestas vías de señalización que pueden interactuar e inhibirse mutuamente (Suzuki y col., 2014).

Por ello, la selección de las 5 líneas con la que se llevaría a cabo el siguiente experimento (Tabla 14) se realizó teniendo en cuenta si los resultados de tolerancia del primer ensayo, que se llevó a cabo en el invernadero, habían sido consistentes con los encontrados en el ensayo realizado en la cámara de cultivo.



### 5.3. EXPERIMENTO 3: RESPUESTA FISIOLÓGICA DE 5 LÍNEAS RECOMBINANTES SELECCIONADAS CON DIFERENTE TOLERANCIA A LA COMBINACIÓN DE ESTRESSES ABIÓTICOS

#### 5.3.1. Biomasa

Teniendo en cuenta que las 5 líneas seleccionadas en el experimento anterior presentaron diferentes rangos de tolerancia ante la combinación de salinidad y alta temperatura, éstas se convirtieron en una herramienta fundamental para descifrar los posibles mecanismos celulares implicados en dicha tolerancia y cómo la combinación de salinidad y alta temperatura puede diferir de estos estreses aplicados individualmente.

Las 5 líneas seleccionadas fueron cultivadas en cámara de cultivo y sometidas a los estreses simples de salinidad (75 mM NaCl) y temperatura (35°C) y al estrés combinado de ambos. Una vez concluido el experimento, se procedió a determinar la producción de biomasa de las plantas, el estado nutricional de las hojas y raíces, las relaciones hídricas y los parámetros fotosintéticos y de fluorescencia de las clorofilas de cada una de las líneas bajo el efecto de los distintos tratamientos.

#### *Peso fresco*

La línea RIL-18 (Figura 32) fue la que menor biomasa presentó bajo todos los tratamientos aplicados (estrés salino, estrés de temperatura y estrés combinado de salinidad y temperatura) respecto al resto de líneas (RIL-74, RIL-76, RIL-66 y RIL-73). En cuanto a los estreses aplicados de manera individual, la salinidad redujo significativamente la biomasa de RIL-18 respecto a las plantas control, y el tratamiento de temperatura no causó ningún efecto. Cuando el estrés fue aplicado de forma combinada (salinidad + alta temperatura) se observó un descenso en la biomasa de las plantas en torno al 26% respecto a las plantas control.

En la línea RIL-66 (Figura 32) los estreses individuales de salinidad y temperatura no causaron efectos significativos sobre el peso fresco, aunque el incremento de temperatura aumentó ligeramente la biomasa de estas plantas respecto a las plantas control. Cuando el estrés era aplicado de forma combinada, la biomasa de las plantas se redujo significativamente respecto al resto de

tratamientos y también con respecto a las plantas control (en aproximadamente un 15%).

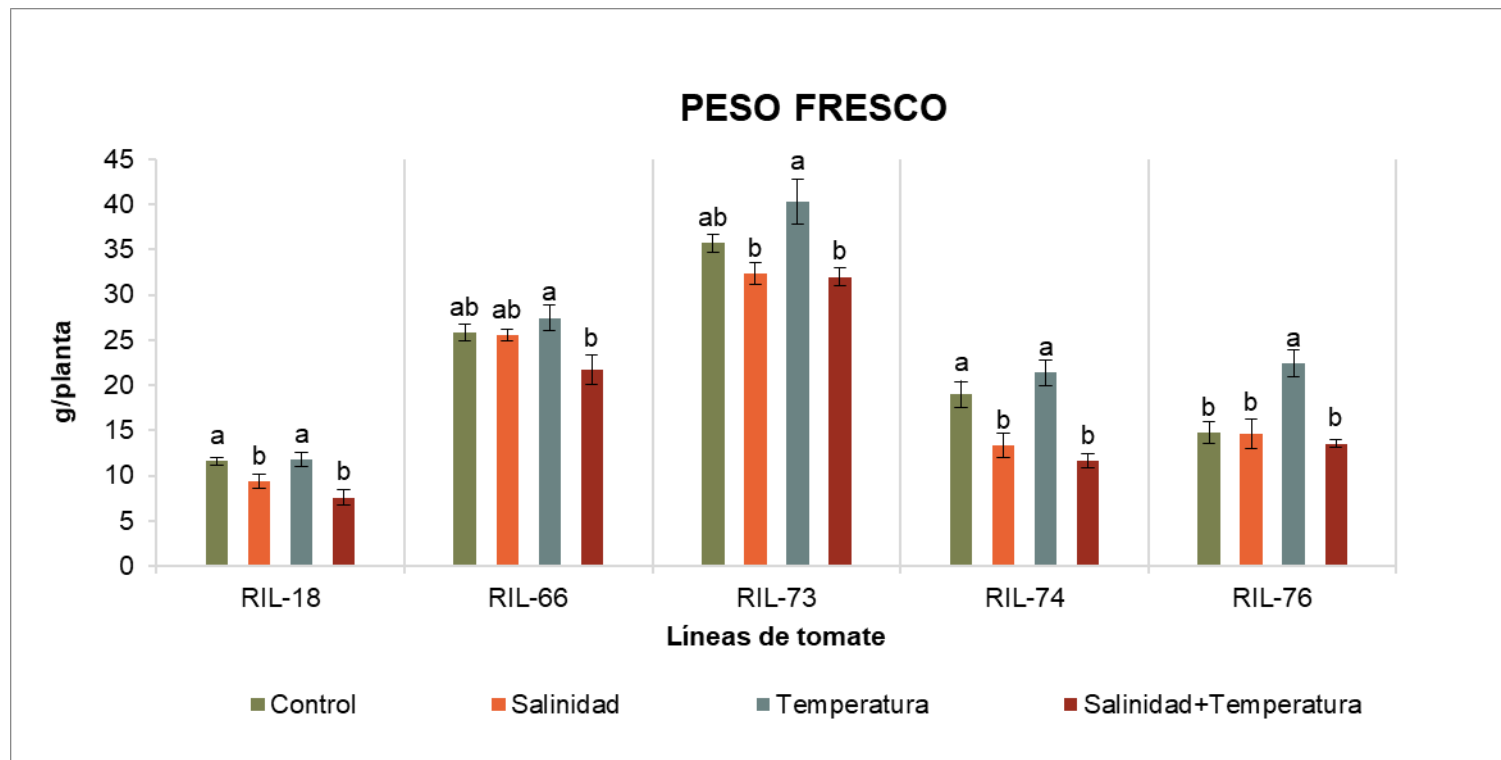


Figura 32: Peso fresco de las plantas cultivadas bajo los tratamientos control (25°C), Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=4). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

La línea RIL-73 (Figura 32) fue la que mayor biomasa presentó bajo todas las condiciones aplicadas. Los estreses individuales de salinidad y temperatura no causaron efectos significativos sobre la producción la biomasa de estas plantas respecto a su control, aunque sí se observó un ligero descenso de la biomasa de las plantas sometidas a condiciones salinas, y un ligero aumento en la biomasa de las plantas que estuvieron bajo el estrés de alta temperatura. El estrés aplicado de forma combinada redujo la biomasa de las plantas respecto a las plantas control, pero no fue significativo.

La línea RIL-74 tuvo un comportamiento similar al descrito para la línea RIL-18. En cuanto a los estreses individuales, la salinidad redujo significativamente la biomasa de las plantas respecto a las plantas control, y la alta temperatura no afectó a este crecimiento. Los estreses de salinidad y alta temperatura aplicados de forma combinada redujeron el peso fresco de las plantas respecto a las plantas control en torno a un 41%.

En cuanto a la línea RIL-76 (Figura 32) la salinidad no causó un efecto significativo respecto a las plantas control en producción de biomasa total, ni aplicado de forma individual ni de manera combinada junto al estrés de alta temperatura. Cuando la alta temperatura era aplicada de forma individual, en cambio, la biomasa de las plantas aumentó significativamente.

### ***Peso seco***

El peso seco de las plantas (Figura 33) se determinó una vez que las plantas habían perdido su contenido en agua.

## CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

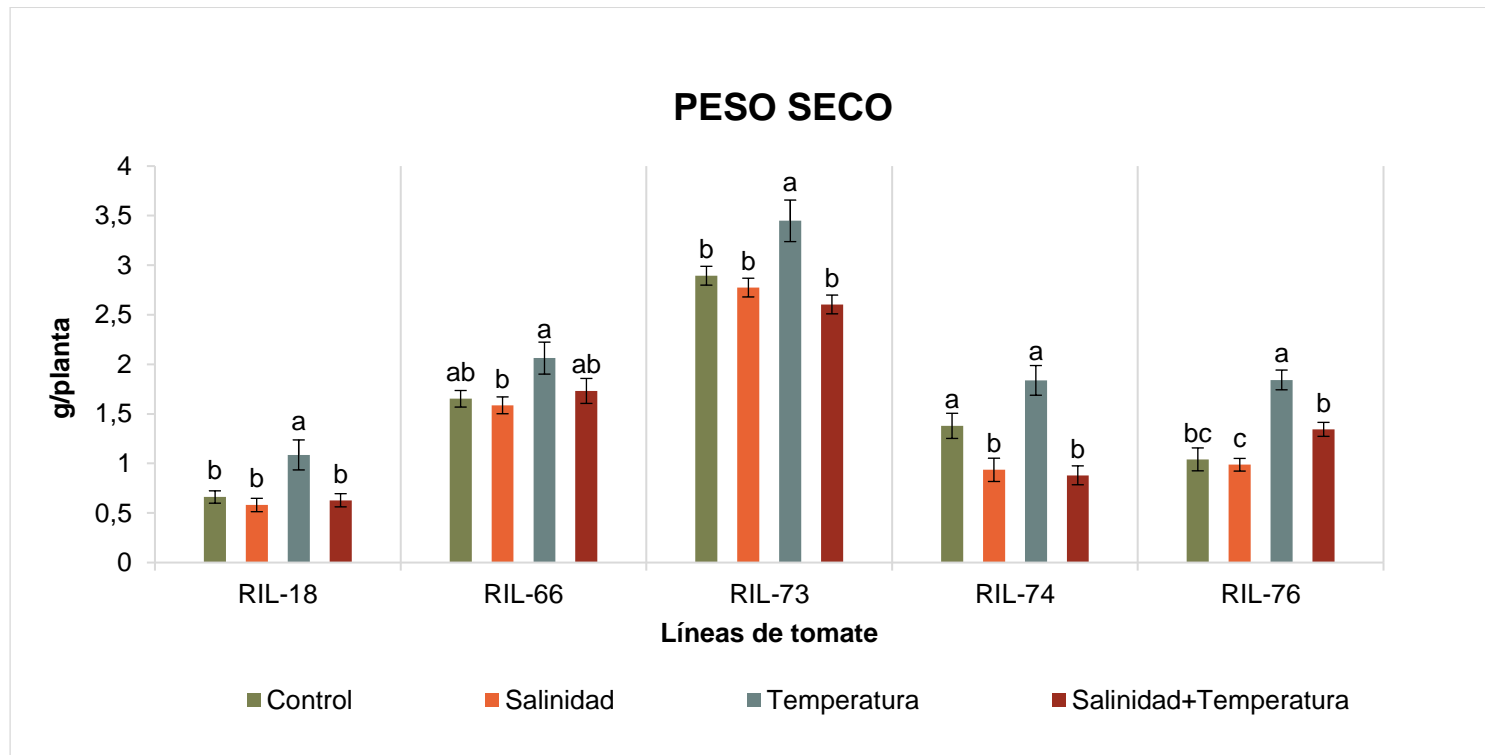


Figura 33: Peso seco de las plantas cultivadas bajo los tratamientos control (25°C), Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=4). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

La línea RIL-18 y la línea RIL-76 (Figura 33) tuvieron un comportamiento similar. El peso seco de las plantas sometidas a un estrés por temperatura fue significativamente mayor que el peso seco obtenido en las plantas del resto de tratamientos (control, salinidad y salinidad + alta temperatura), las cuales no mostraron diferencias significativas entre ellas.

En la línea RIL-66 (Figura 33) el peso seco más alto se registró en el tratamiento de alta temperatura, aunque no presentó diferencias significativas respecto a las plantas control ni a las que habían sido sometidas a los estreses de manera combinada (salinidad + alta temperatura). El tratamiento salino aplicado de forma individual redujo el peso de las plantas significativamente respecto al tratamiento de alta temperatura, pero no mostró diferencias significativas con el tratamiento control.

En la línea RIL-74, el estrés salino aplicado de forma individual y es el estrés combinado de salinidad y alta temperatura redujeron significativamente el peso seco de las plantas respecto al control y respecto al tratamiento individual de alta temperatura, que no mostraron diferencias significativas entre ellos.

Por último, en la línea RIL-76, el estrés individual de alta temperatura aumentó significativamente el peso seco de las plantas respecto a las plantas control y al resto de tratamientos (salinidad y estrés combinado), los cuales no mostraron diferencias significativas respecto al tratamiento control.

### **5.3.2. Tolerancia a los Estreses simples o combinados**

Las siguientes figuras (Figura 34, Figura 35 y Figura 36) muestran el porcentaje de tolerancia de las 5 líneas seleccionadas para este experimento a los distintos estreses aplicados, tanto de manera individual como combinada. Las líneas recombinantes usadas en este experimento se muestran ordenadas según el rango de tolerancia obtenido en cada uno de los tratamientos.

#### ***Tolerancia a la salinidad***

Las líneas de tomate más tolerantes a la salinidad fueron la línea RIL-76 y la RIL-66, con una tolerancia del 99% (Figura 34). En estas líneas la salinidad no causó una disminución en la biomasa de las plantas, ya que tuvieron pesos frescos

similares a las plantas de sus respectivos controles. La línea RIL-73 mostró una tolerancia a la salinidad del 90%, y la línea RIL-18 del 80%, de lo que se deduce que el efecto de salinidad causó una pérdida en la biomasa de las plantas del 10% y del 20%, respectivamente, comparadas con las plantas de las mismas líneas en condiciones control. Por último, la línea RIL-74 fue la que menor rango de tolerancia a la salinidad presentó, ya que el peso fresco de las plantas sometidas al tratamiento salino fue un 30% menor que el de las plantas del tratamiento control.

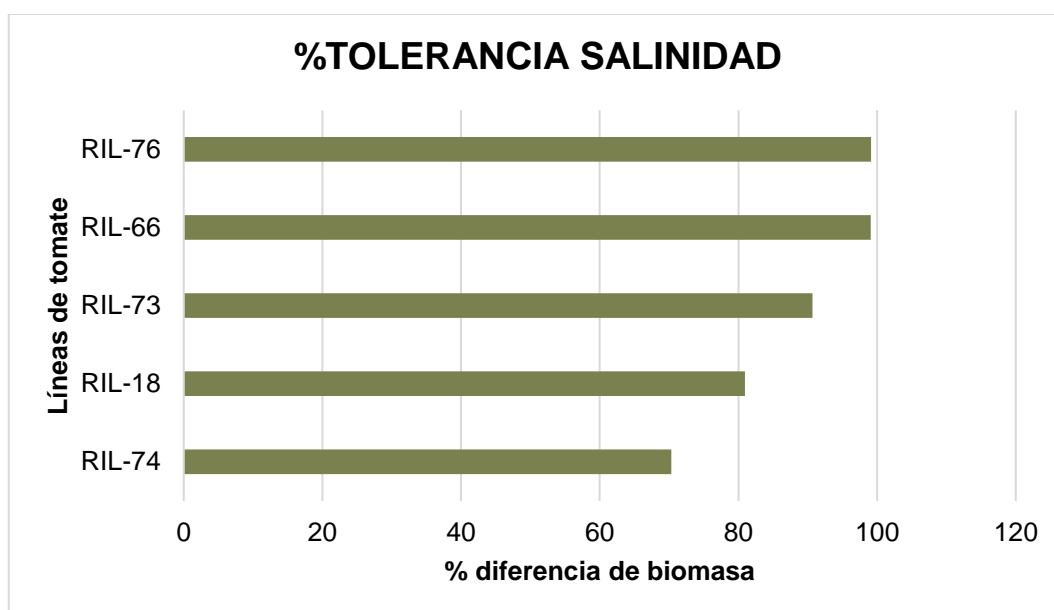


Figura 34: Porcentaje de tolerancia de las distintas líneas de tomate sometidas a estrés de salinidad simple (75 mM NaCl). Los datos corresponden al promedio del peso fresco de las plantas del tratamiento de salinidad comparado con el promedio del peso fresco de las plantas control.

#### *Tolerancia a la alta temperatura*

El porcentaje de tolerancia el estrés por alta temperatura (Figura 35) fue superior al 100% en todas las líneas, lo que indica que las plantas de las distintas líneas sometidas a dicho estrés crecieron más que las plantas de sus respectivos controles. Al igual que ocurría con la tolerancia a la salinidad, la línea que mayor tolerancia a la alta temperatura presentó fue la línea RIL-76, con un aumento en el peso fresco de las plantas sometidas al estrés de temperatura de más del 50% respecto a las plantas control. La línea RIL-73 y la línea RIL-74 mostraron un

comportamiento similar, con un aumento en el peso fresco de las plantas bajo el tratamiento de alta temperatura del 12% respecto a las plantas control. Las plantas de la línea RIL-66 cultivadas a 35°C obtuvieron un peso fresco entorno al 6% superior respecto a las plantas control. Por último, en la línea RIL-18, el peso fresco de las plantas sometidas al estrés de alta temperatura fue similar al peso fresco de las plantas obtenido en condiciones control.

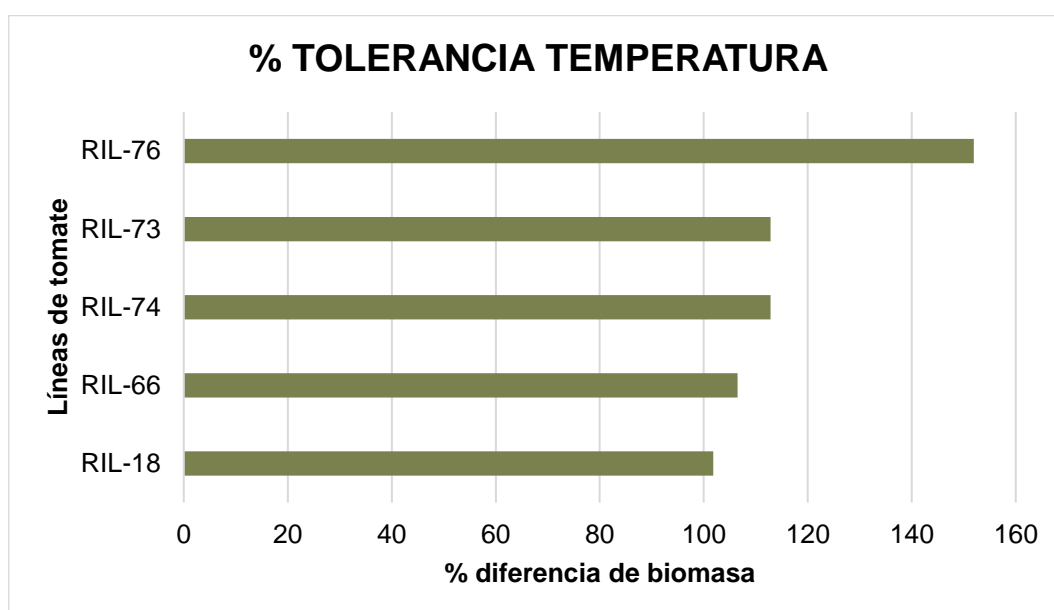


Figura 35: Porcentaje de tolerancia de las distintas líneas de tomate sometidas al estrés de alta temperatura simple (35°C). Los datos corresponden al promedio del peso fresco de las plantas del tratamiento de temperatura comparado con el promedio del peso fresco de las plantas control.

#### *Tolerancia a la combinación de salinidad y alta temperatura*

Al igual que ocurría con el estrés de salinidad, el estrés combinado de salinidad y alta temperatura redujeron el peso fresco de las plantas en todas las líneas recombinantes testadas, ya que todas presentaron un rango de tolerancia menor al 100% (Figura 36).

La línea RIL-76 volvió a ser la que mayor tolerancia mostró frente a los estreses de salinidad y alta temperatura, ya que dichos estreses sólo redujeron el peso fresco de las plantas en menos de un 10% respecto a las plantas control. La línea RIL-73 y la línea RIL-66 mostraron una reducción del peso fresco en torno al



12% y al 16%, respectivamente. En la línea RIL-18, el estrés combinado redujo el peso fresco de las plantas más de un 25% respecto a las plantas control. Por último, al igual que ocurría con el estrés salino, la línea RIL-74 fue la que presentó menor rango de tolerancia, ya que el peso fresco de las plantas sometidas al estrés combinado se redujo en más de un 40% respecto a las plantas control.

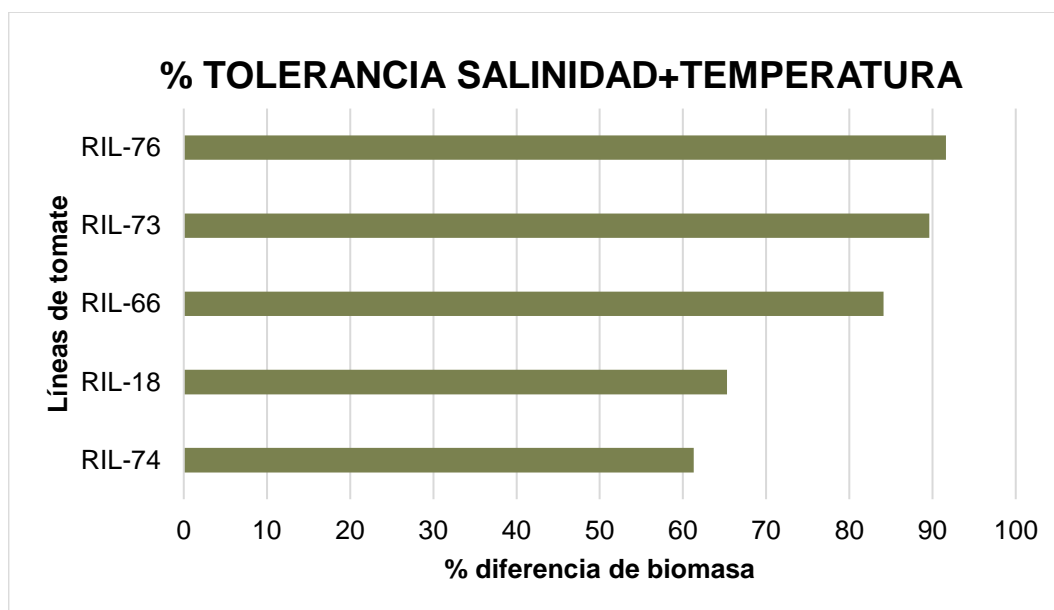


Figura 36: Porcentaje de tolerancia de las distintas líneas de tomate sometidas a la combinación de salinidad y alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). Los datos corresponden al promedio del peso fresco de las plantas del tratamiento de estrés combinados comparado con el promedio del peso fresco de las plantas control.

### 5.3.3. Estado nutricional de las plantas

Con esta aproximación se pretendía determinar la influencia de los estreses simples de salinidad y alta temperatura y la combinación de ambos sobre la concentración final de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ) y sodio ( $\text{Na}^+$ ), tres de los macronutrientes más importantes en plantas y conocidos por estar implicados en procesos de tolerancia al estrés abiótico del metabolismo celular. Estos cationes fueron analizados tanto en la hoja como en la raíz de las 5 líneas recombinantes de tomate seleccionadas a tal efecto. También se estableció la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  en ambas

partes de la planta por ser un índice bastante indicativo de la toxicidad celular de  $\text{Na}^+$  bajo condiciones de elevada salinidad.

#### *Concentración foliar de $\text{Ca}^{2+}$*

En la línea RIL-18 (Figura 37), la mayor concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se encontró aquellas plantas cultivadas bajo condiciones control. El estrés salino no afectó de forma significativa a la concentración final de  $\text{Ca}^{2+}$  en hojas respecto a las plantas control, aunque sí disminuyó ligeramente. El estrés por alta temperatura también redujo la concentración final de  $\text{Ca}^{2+}$  en hojas respecto a la concentración encontrada en las plantas control. Finalmente, la concentración más baja de  $\text{Ca}^{2+}$  se halló en plantas sometidas a la combinación de salinidad y alta temperatura, siendo significativamente menor respecto al resto de tratamientos y respecto a las plantas control.

La aplicación de salinidad y alta temperatura de forma individual no afectó a la concentración final de  $\text{Ca}^{2+}$  en hojas de la línea RIL-66, ya que no se hallaron diferencias significativas entre las plantas sometidas a los distintos tratamientos respecto a las plantas control. En cambio, cuando estos estreses eran aplicados conjuntamente, la concentración final de  $\text{Ca}^{2+}$  sí disminuyó significativamente respecto al resto de tratamientos.

En la línea RIL-74, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  no se vio significativamente afectada respecto a las plantas control bajo ninguno de los estreses, ni los aplicados de manera individual (salinidad y alta temperatura) ni combinados. En cambio, se observó que el tratamiento de alta temperatura disminuyó significativamente la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en las hojas de las plantas respecto a las plantas que habían sido sometidas al tratamiento salino, donde se encontró la concentración más alta de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Algo similar a la línea anterior ocurrió con la línea RIL-73 (Figura 37), donde la mayor concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se encontró en las plantas que habían crecido bajo el tratamiento de salinidad respecto al resto de tratamientos testados y respecto a las plantas control. La aplicación de alta temperatura combinada con salinidad redujo la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en las hojas en esta línea recombinante respecto a las plantas crecidas con sólo salinidad, aunque esa disminución no fue significativa respecto a las plantas control.

Por último, la línea RIL-76 se comportó de manera similar a la RIL-66. Los estreses aplicados de manera individual no afectaron a la concentración final de  $\text{Ca}^{2+}$  respecto a las plantas control. Los estreses combinados, en cambio, disminuyeron dicha concentración respecto al resto de tratamientos.

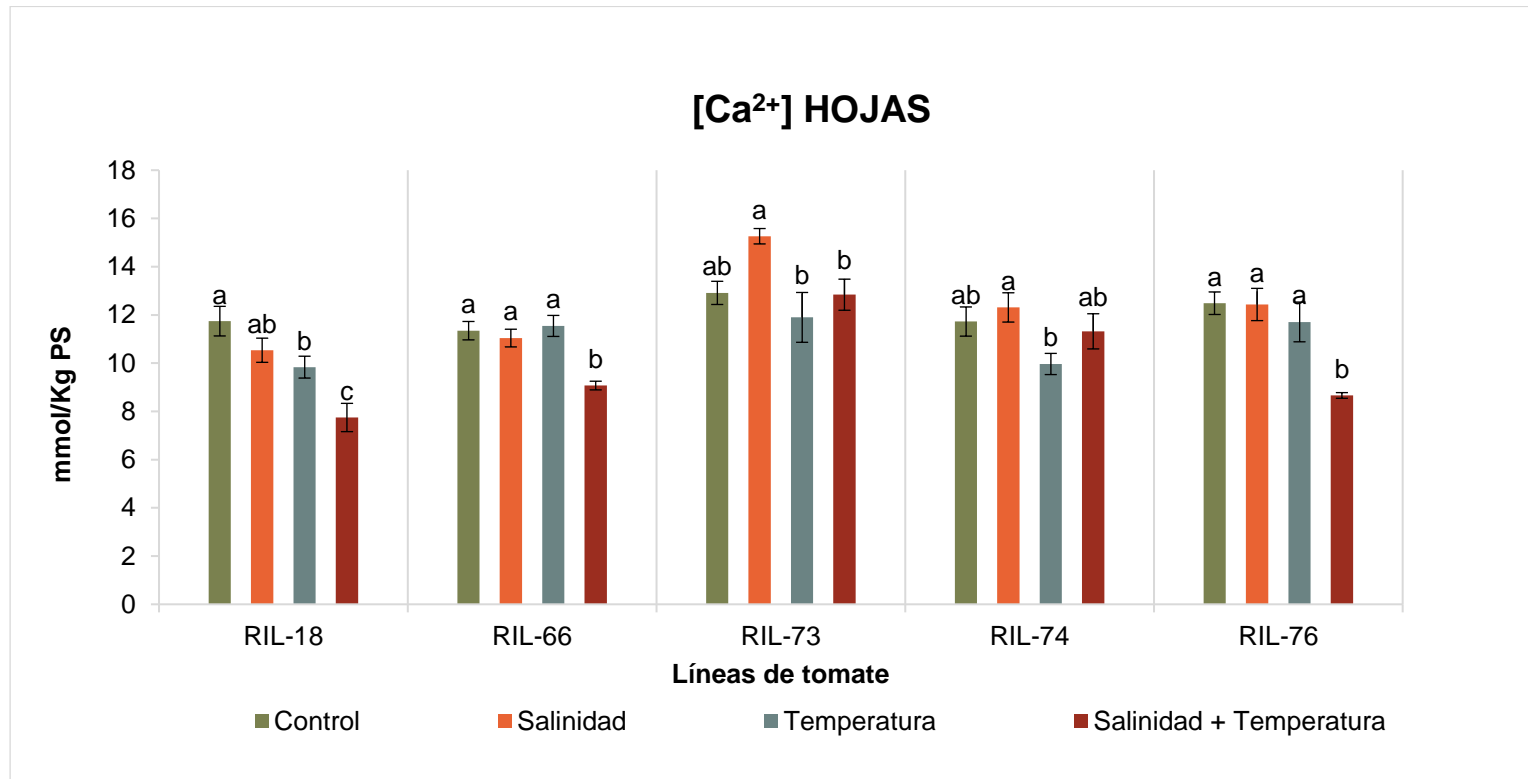


Figura 37: Concentración de Ca<sup>2+</sup> en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). La concentración foliar de Ca<sup>2+</sup> está expresada como mmol kg<sup>-1</sup> peso seco. Los datos representan medias ± SE (n=4) Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a p ≤ 0.05 (Tukey HSD).

### *Concentración foliar de K<sup>+</sup>*

La Figura 38 muestra la concentración de K<sup>+</sup> en las distintas líneas de tomate en los distintos tratamientos control, salinidad, alta temperatura y el estrés combinado de salinidad y temperatura.

A simple vista, cabe destacar que las menores concentraciones de K<sup>+</sup> en la hoja se encuentran en las plantas que fueron sometidas al estrés salino de forma individual en las distintas líneas de tomate. Cuando el estrés de salinidad era aplicado de forma conjunta con el estrés por alta temperatura la concentración de K<sup>+</sup> aumentaba respecto a la concentración de este nutriente encontrado en el tratamiento de salinidad aplicado de forma individual.

Estudiando las líneas de forma concreta, se observa que en la línea RIL-18 (Figura 38), como se ha mencionado anteriormente, la salinidad redujo la concentración de K<sup>+</sup> en las hojas respecto a las plantas control y al resto de tratamientos. El estrés por alta temperatura no causó cambios significativos en la concentración de K<sup>+</sup> respecto a las plantas control. Finalmente, la aplicación de los estreses de manera combinada, causó una disminución en la concentración final de K<sup>+</sup> respecto a las plantas control, pero no mostró diferencias significativas con el resto de tratamientos.

En la línea RIL-66, la concentración de K<sup>+</sup> más elevada se encontró en las hojas de las plantas que fueron sometidas al estrés por alta temperatura de forma individual, respecto a las plantas control y a las plantas del resto de tratamientos. En las plantas de esta línea recombinante que crecieron bajo el efecto de la salinidad simple se halló una concentración de K<sup>+</sup> menor que en las plantas control y que en el resto de tratamientos.

Las líneas RIL-73, RIL-74 y RIL-76 presentaron un comportamiento similar entre ellas. Las concentraciones más bajas de K<sup>+</sup> se encontraron en aquellas plantas que crecieron bajo el efecto del estrés salino aplicado de forma individual, los cuales fueron significativamente menores que los encontrados en las plantas control y en el resto de tratamientos. El estrés por alta temperatura y la combinación de los estreses de salinidad y alta temperatura no tuvo ningún efecto en la concentración final de K<sup>+</sup> en las hojas de las plantas de las diferentes líneas.

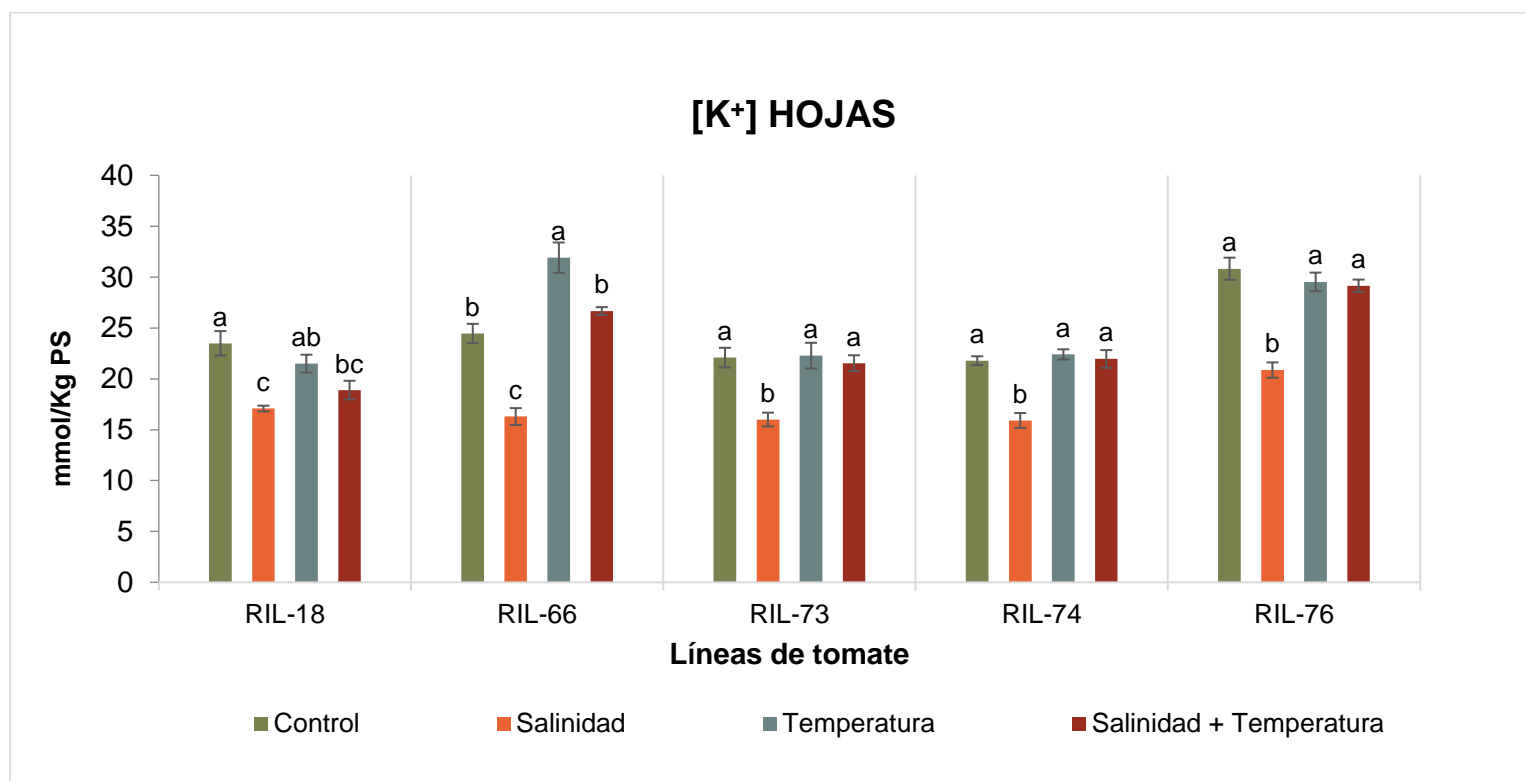


Figura 38: Concentración de K<sup>+</sup> en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). La concentración foliar de K<sup>+</sup> está expresada como mmol kg<sup>-1</sup> peso seco. Los datos representan medias ± SE (n=4) Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a p ≤ 0.05 (Tukey HSD).

### *Concentración foliar de Na<sup>+</sup> y relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>*

Como era de esperar, la concentración de Na<sup>+</sup> en las hojas fue significativamente más elevada en las plantas que habían sido sometidas a los tratamientos salinos respecto a los tratamientos en los que no se aplicó la sal (Figura 39). De todas las líneas, las concentraciones más altas de Na<sup>+</sup> se encontraron en las hojas de la línea RIL-18 que crecieron bajo cualquier condición salina (es decir, salinidad y salinidad + alta temperatura), y no tuvieron diferencias significativas entre ellas.

La línea RIL-66 fue la que menor concentración de Na<sup>+</sup> acumuló en hojas respecto al resto de líneas. Esta concentración fue significativamente mayor cuando a las plantas se les aplicó el estrés de salinidad de forma individual respecto a cuando el estrés de salinidad era combinado junto con la alta temperatura.

Las líneas RIL-73 y RIL-74 presentaron una acumulación de Na<sup>+</sup> semejante, no presentando diferencias en la concentración de este nutriente cuando el estrés era aplicado de forma simple o de forma combinada.

La línea RIL-76, en cambio, sí presentó diferencias significativas entre los dos tratamientos salinos. Al igual que ocurría con la línea RIL-66, la concentración de Na<sup>+</sup> fue más elevada en las hojas de las plantas que fueron sometidas al estrés simple de salinidad que cuando éste era combinado con el de alta temperatura.

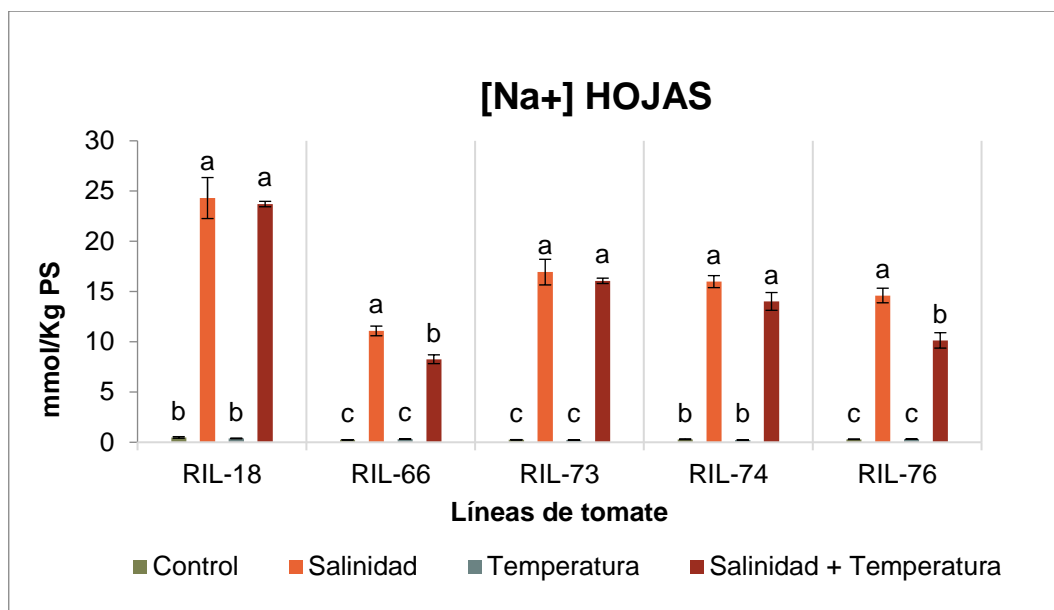


Figura 39: Concentración de  $\text{Na}^+$  en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). La concentración foliar de  $\text{Na}^+$  está expresada como  $\text{mmol kg}^{-1}$  peso seco. Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=4). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

La relación de  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  (Figura 40) en la hoja siguió el patrón contrario que el encontrado al estudiar la acumulación de  $\text{Na}^+$  (Figura 39). La línea que obtuvo un menor índice  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  fue la línea RIL-18, y no se encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos salinos: el de salinidad simple y el de salinidad + alta temperatura.

El resto de líneas (RIL-66, RIL-73, RIL-74 y RIL-76) presentaron un comportamiento similar entre ellas: no se encontraron diferencias significativas en cuanto a relación de  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  entre las plantas que crecieron en condiciones óptimas de cultivo (control) y las plantas que crecieron bajo el efecto del estrés de alta temperatura.



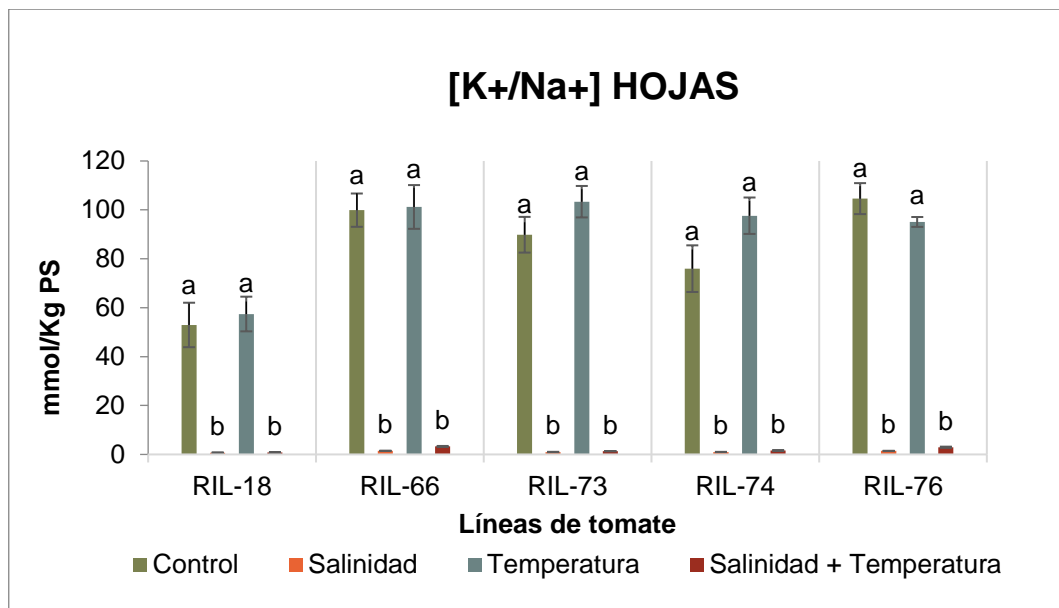


Figura 40: Relación de  $K^+/Na^+$  en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). La concentración foliar de  $K^+/Na^+$  está expresada como  $mmol\ kg^{-1}$  peso seco. Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=4). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

#### *Concentración radicular de $Ca^{2+}$*

La Figura 41 muestra la concentración de  $Ca^{2+}$  hallada en la raíz de las distintas líneas recombinantes de tomate estudiadas. Estos valores fueron menores que los encontrados al analizar la concentración de nutrientes de las hojas, de lo que se deduce un transporte de éstos hacia los órganos de la parte aérea.

En la línea RIL-18, el tratamiento de salinidad no afectó a la concentración final de  $Ca^{2+}$ , ya que los valores obtenidos en dichas plantas fueron similares a los encontrados en las plantas control. El estrés por alta temperatura simple, y el estrés combinado de salinidad y alta temperatura indujo una disminución significativa en la concentración final de  $Ca^{2+}$  en la raíz respecto a las plantas control y a las plantas sometidas a salinidad simple. Los tratamientos en los que se aplicó un estrés por alta temperatura no presentaron diferencias significativas entre ellos.

En la línea RIL-66 (Figura 41), el estrés salino aplicado tanto de forma individual como de forma combinada con alta temperatura redujeron

drásticamente, hasta casi en un 50%, la concentración final de  $\text{Ca}^{2+}$  en la raíz respecto a las plantas control y a las plantas sometidas al estrés por alta temperatura simple.

En la línea RIL-73, ni el estrés simple de salinidad ni el de alta temperatura causaron un efecto en la concentración final de  $\text{Ca}^{2+}$  en la raíz respecto a las plantas control. Curiosamente, cuando los estreses eran aplicados de forma combinada (salinidad + alta temperatura) sí se redujo significativamente la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la raíz respecto a las plantas control.

En la línea RIL-74, todos los tratamientos aplicados (salinidad, alta temperatura y salinidad + alta temperatura) redujeron la concentración final de  $\text{Ca}^{2+}$  en la raíz respecto a las plantas control. Entre dichos tratamientos estresantes no se hallaron diferencias significativas.

Finalmente, la aplicación de los estreses de manera individual no causó ningún efecto en la concentración final de  $\text{Ca}^{2+}$  en la raíz de las plantas de la línea RIL-76. Sin embargo, cuando el estrés era aplicado de manera combinada (salinidad + alta temperatura), la concentración de este nutriente se vio significativamente reducida en casi un 40% con respecto a las plantas control

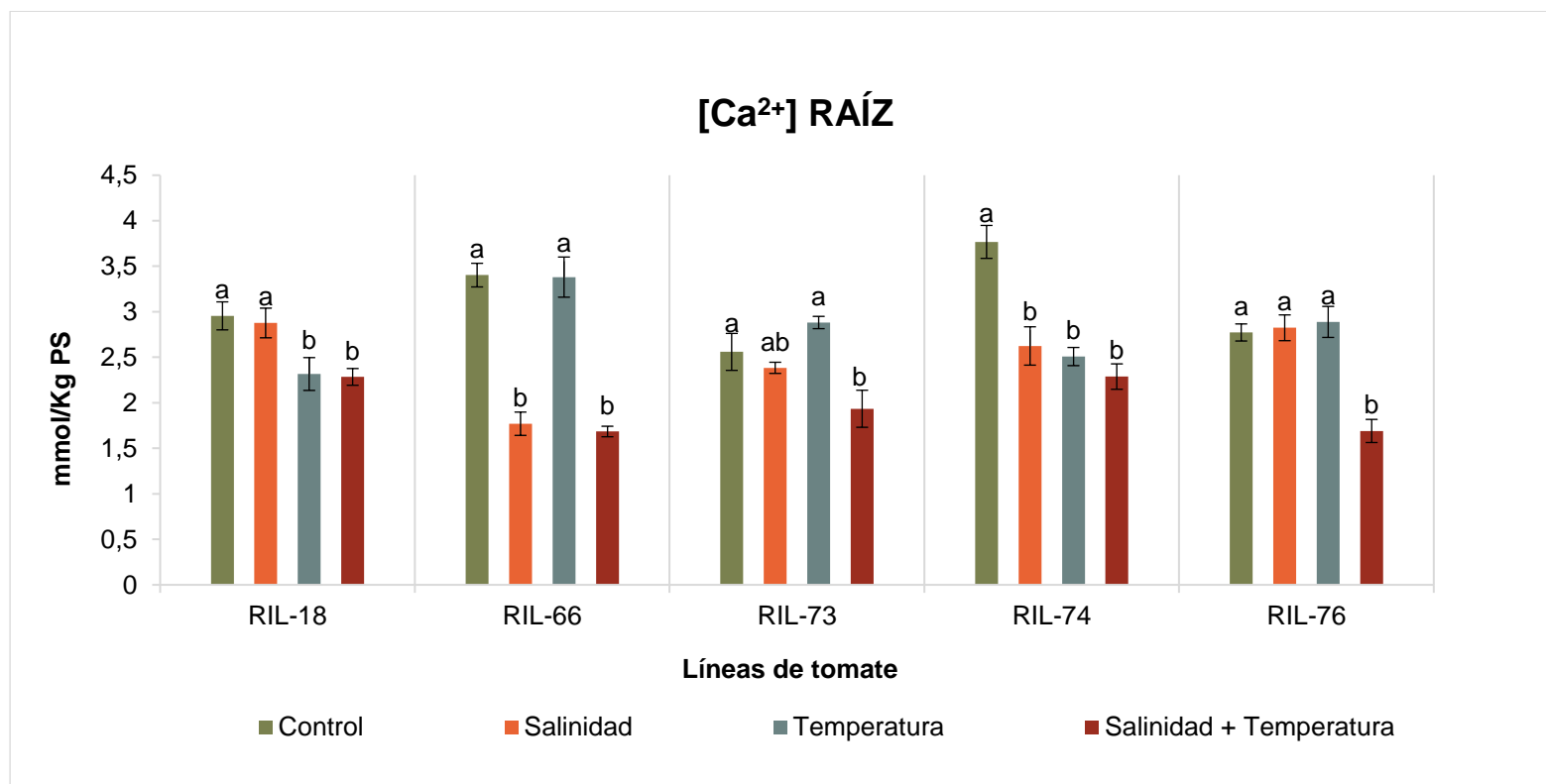


Figura 41: Concentración de Ca<sup>2+</sup> en las raíces de las distintas líneas de tomate en los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Temperatura (35°C) y Salinidad + Temperatura (75 mM NaCl + 35°C). La concentración radicular de Ca<sup>2+</sup> está expresada como mmol kg<sup>-1</sup> peso seco. Los datos representan medias ± SE (n=4) Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a p ≤ 0.05 (Tukey HSD).

### *Concentración radicular de K<sup>+</sup>*

En general, los valores de concentración de K<sup>+</sup> hallados en la raíz (Figura 42) de las distintas líneas de tomate fueron mayores que las encontradas en las hojas (Figura 38).

En la línea RIL-18, los tratamientos aplicados en las plantas (salinidad, alta temperatura y salinidad + alta temperatura) redujeron de forma significativa la concentración de K<sup>+</sup> en las raíces de las plantas sometidas a los estreses respecto a las plantas control. No se encontraron diferencias significativas entre dichos tratamientos.

La línea RIL-66 y la línea RIL-73 tuvieron un comportamiento similar. Las concentraciones más altas de K<sup>+</sup> se encontraron en las plantas control y en las plantas que fueron sometidas al estrés simple de alta temperatura. La salinidad redujo la concentración de K<sup>+</sup> en la raíz respecto a las plantas control. Cuando el estrés era aplicado de manera combinada (salinidad + alta temperatura) la concentración de K<sup>+</sup> era significativamente menor que las plantas control y que el resto de tratamientos.

En la línea RIL-74 (Figura 42), los estreses de salinidad y temperatura aplicados de manera individual redujeron la concentración de K<sup>+</sup> en la raíz por debajo de los valores hallados en las plantas control. El tratamiento de salinidad + temperatura no causó un efecto significativo en la concentración de K<sup>+</sup> respecto a las plantas control.

En la línea RIL-76, al igual que ocurría con la línea anterior, los estreses de salinidad y de temperatura aplicados de forma individual redujeron la concentración de K<sup>+</sup> en la raíz respecto a las plantas control. La concentración más baja de K<sup>+</sup> se encontró en las plantas que fueron sometidas a los estreses combinados de salinidad y temperatura. Este tratamiento redujo la concentración final de K<sup>+</sup> en torno a un 40% respecto a las plantas control, y también fue significativamente menor que cuando los estreses eran aplicados de manera simple.

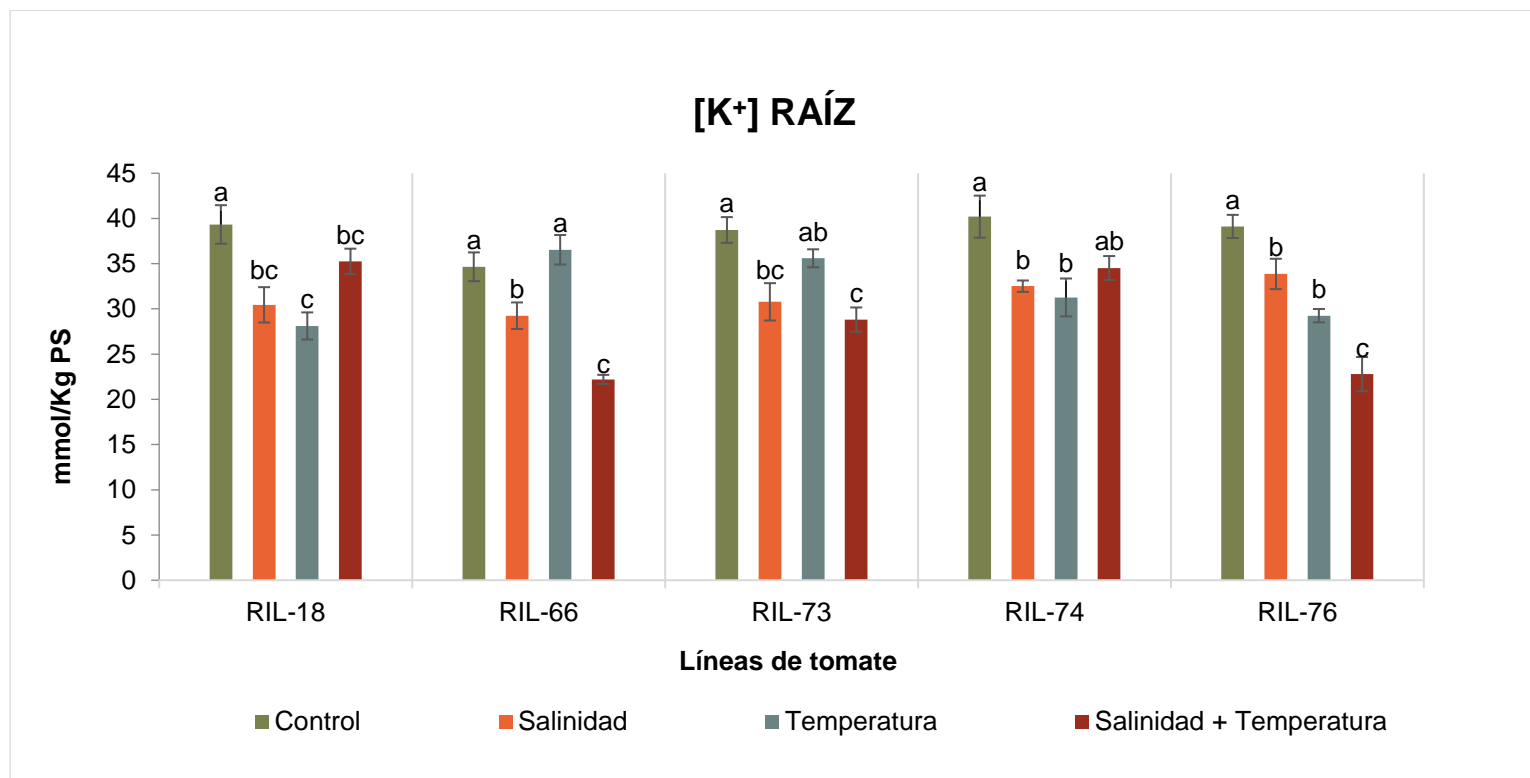


Figura 42: Concentración de K<sup>+</sup> en las raíces de las distintas líneas de tomate en los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). La concentración radicular de K<sup>+</sup> está expresada como mmol kg<sup>-1</sup> peso seco. Los datos representan medias ± SE (n=4). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a p ≤ 0.05 (Tukey HSD).

### Concentración radicular de Na<sup>+</sup> y relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>

Al contrario que ocurría en hojas (Figura 43), la acumulación de Na<sup>+</sup> en la raíz fue ligeramente superior en aquellas plantas que estaban sometidas al estrés combinado de salinidad y alta temperatura que cuando el estrés de salinidad era aplicado de forma individual (Figura 43). Entre dichos tratamientos salinos, no se encontraron diferencias significativas en las líneas RIL-66, RIL-73, RIL-74 y RIL-76. En la línea RIL-18, en cambio, cuando la salinidad era combinada con la alta temperatura la concentración final de Na<sup>+</sup> en las raíces fue significativamente mayor que cuando la salinidad era aplicada de manera individual.

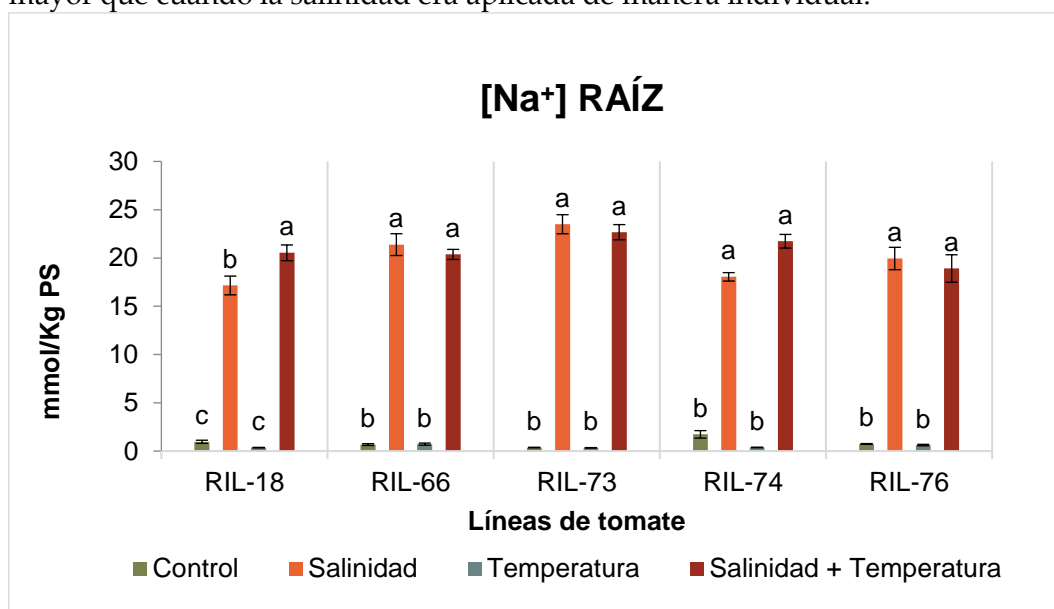


Figura 43: Concentración de Na<sup>+</sup> en las raíces de las distintas líneas de tomate en los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). La concentración radicular de Na<sup>+</sup> está expresada como mmol kg<sup>-1</sup> peso seco. Los datos representan medias ± SE (n=4). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a p ≤ 0.05 (Tukey HSD).

Como ocurría en la relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> en las hojas (Figura 40), la relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> de la raíz (Figura 44) fue mayor en los tratamientos que no tenían estrés salino (Control y alta temperatura) que en los que se aplicó la salinidad.

Las líneas RIL-18 y RIL-74 presentaron un comportamiento similar entre ellas, ya que las plantas que crecieron a 35°C (alta temperatura) presentaron una relación  $K^+/Na^+$  mayor respecto al resto de tratamientos. Las líneas RIL-66, RIL-73 y RIL-76, en cambio, no se vieron diferencias significativas entre los tratamientos en los que no se aplicó la salinidad.

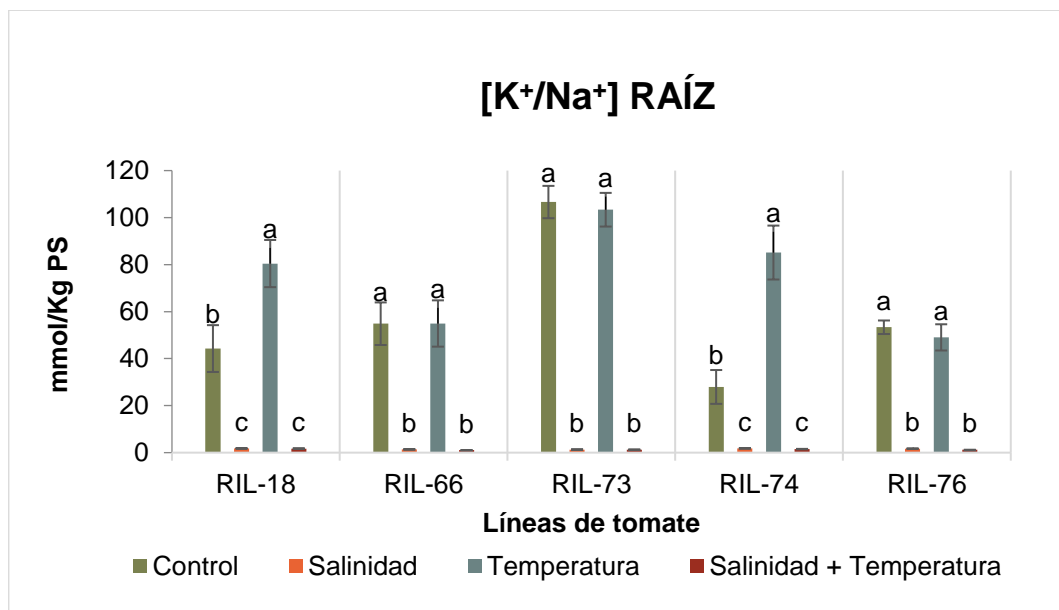


Figura 44: Relación de  $K^+/Na^+$  en las raíces de las distintas líneas de tomate en los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). La concentración radicular de  $K^+/Na^+$  está expresada como  $mmol\ kg^{-1}$  peso seco. Los datos representan medias  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

#### 5.3.4. Estudio de las Relaciones hídricas

El análisis de las relaciones hídricas permitió estudiar cómo afectan la salinidad y la temperatura de manera individual y de manera combinada al potencial hídrico, potencial osmótico y potencial de turgor de las distintas líneas recombinantes de tomate, con el objetivo de establecer si alguno de estos parámetros está en relación directa con los mecanismos de tolerancia a la combinación de salinidad y alta temperatura, y, además, para valorar el estado hídrico de las distintas líneas recombinantes bajo las condiciones de estrés elegidas.

### *Potencial hídrico*

La Figura 45 recoge los datos de potencial hídrico determinados en las distintas líneas recombinantes seleccionadas a tal efecto. En general, y, como era de esperar, se observó que las plantas control de las 5 líneas obtuvieron valores de potencial hídrico menos negativos que las plantas que estaban sometidas a los distintos tratamientos de estrés, tanto de forma individual como de forma combinada.

En la línea RIL-18 y en la RIL-74 (Figura 45), los tratamientos de salinidad y salinidad + alta temperatura, indujeron a un aumento de los valores negativos de potencial hídrico respecto a las plantas control. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en estas líneas cuando la salinidad era aplicada de manera individual respecto a cuando era aplicada de manera combinada junto con la alta temperatura. El tratamiento de alta temperatura simple, en cambio, no afectó al potencial hídrico de las plantas de la línea RIL-74, aunque disminuyó los de la línea RIL-18.

En la línea RIL-66, RIL-73 y RIL-76, los valores más negativos de potencial hídrico se obtuvieron en aquellas plantas que fueron sometidas al tratamiento de salinidad de manera individual respecto al control y al resto de tratamientos. Cuando la salinidad y la alta temperatura fueron aplicadas conjuntamente, el potencial hídrico también fue más negativo en dichas líneas con respecto a las plantas control. El tratamiento de alta temperatura, en cambio, sólo afectó de forma significativa a las líneas RIL-66 y RIL-76 respecto a las plantas control.



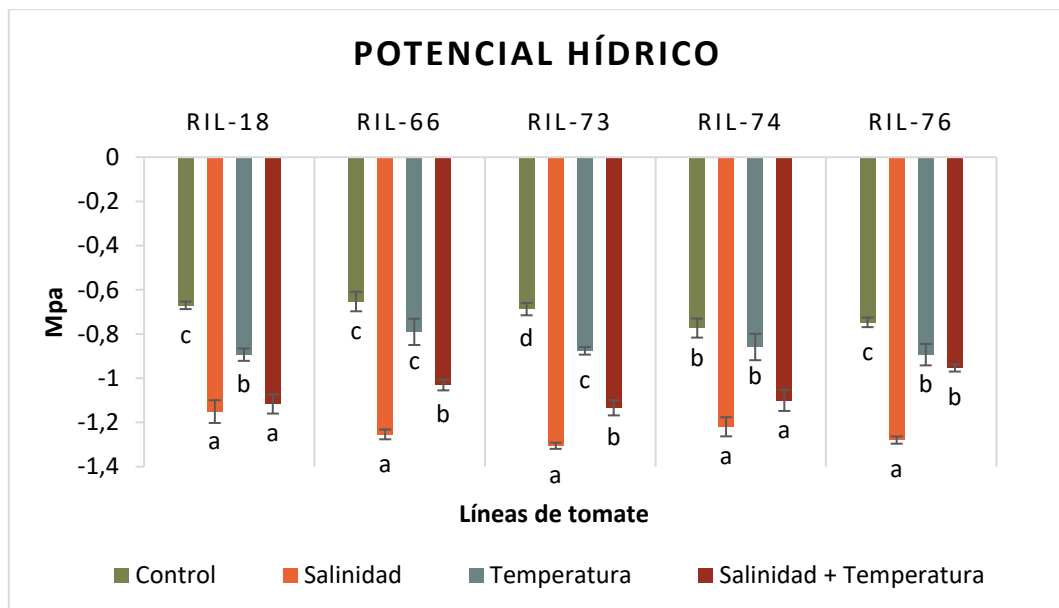


Figura 45: Potencial hídrico ( $\psi_w$ ) de las distintas líneas de tomate sometidas a los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Temperatura (35°C) y Salinidad + Temperatura (75 mM NaCl + 35°C). El potencial hídrico está expresado en Mpa. Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=4). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

### Potencial osmótico

Como ocurría con el potencial hídrico (Figura 45), y como era en este caso también de esperar, el potencial osmótico (Figura 46) de las plantas control fue menos negativo que el obtenido en el resto de tratamientos en todas las líneas de tomate.

En la línea RIL-18, el efecto combinado de la salinidad y la alta temperatura hizo que el potencial osmótico fuese el más negativo, tanto respecto a las plantas control como al resto de tratamientos. La salinidad y la alta temperatura aplicadas de forma individual no causaron diferencias significativas en este parámetro.

En las líneas RIL-66, RIL-73 y RIL-74 los valores de potencial osmótico siguieron un patrón similar. Los valores más negativos de potencial osmótico se encontraron en las plantas que fueron sometidas a los tratamientos de salinidad y de salinidad + alta temperatura respecto a los valores encontrados en las plantas control. Además, entre las plantas sometidas a dichos tratamientos, no se encontraron diferencias significativas. El tratamiento de temperatura aplicado de

forma individual no causó efectos significativos en los valores de potencial osmótico de las plantas respecto a las plantas control.

En la línea RIL-76, los valores de potencial osmótico fueron más negativos en las plantas sometidas al tratamiento de salinidad que en el resto de tratamientos. Los tratamientos de alta temperatura y de salinidad + alta temperatura, no presentaron diferencias significativas entre ellos, pero en dichas plantas se obtuvieron valores más negativos que los valores encontrados en las plantas control.

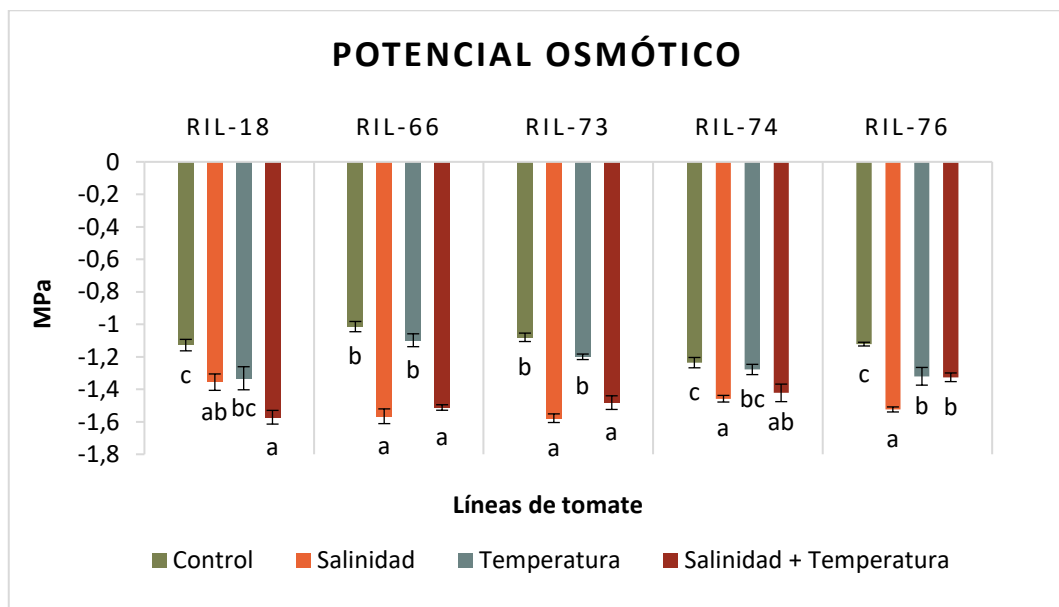


Figura 46: Potencial osmótico ( $\psi_s$ ) de las distintas líneas de tomate sometidas a los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). El potencial osmótico está expresado en Mpa. Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=4) Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

### Potencial de turgor

El potencial de turgor se calculó relacionando los valores obtenidos de potencial hídrico con los de potencial osmótico.

En las líneas RIL-18 y RIL-76 (Figura 47), el tratamiento de salinidad a 25°C redujo de manera significativa el potencial de turgor de las plantas respecto al control y respecto al resto de tratamientos. Los estreses donde la alta temperatura

era un factor (alta temperatura de manera individual y el estrés combinado de salinidad + alta temperatura), no causaron efectos mencionables en los valores de potencial de turgor.

Las líneas RIL-74 y RIL-76 presentaron entre ellas un comportamiento similar, siendo las plantas sometidas a estrés salino simple las que menor potencial de turgor presentaron respecto al control y al resto de tratamientos.

En la línea RIL-66, el potencial de turgor fue significativamente mayor en aquellas sometidas al estrés combinado de salinidad y alta temperatura con respecto a las plantas control. Los tratamientos de salinidad y alta temperatura aplicados de manera aislada no causaron efectos sobre este parámetro en esta línea recombinante.

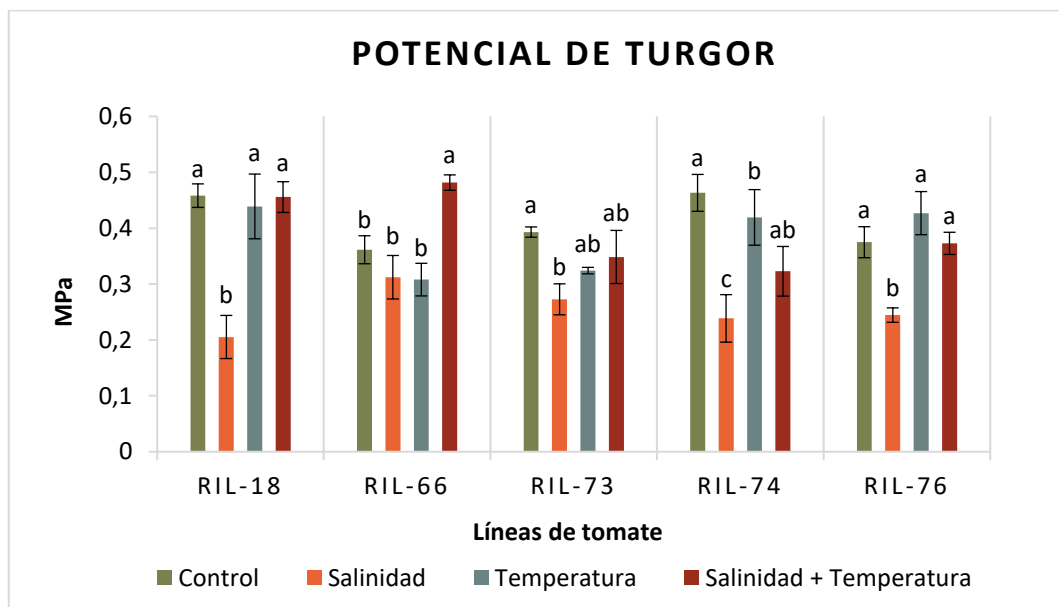


Figura 47: Potencial de turgor ( $\psi_p$ ) de las distintas líneas de tomate sometidas a los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). El potencial osmótico está expresado en Mpa. Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=4) Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

#### 5.4.5. Parámetros fotosintéticos y de fluorescencia de clorofilas

Los parámetros analizados para conocer la eficiencia del proceso fotosintético fueron: la asimilación de CO<sub>2</sub>, la conductancia estomática, el índice de transpiración y la eficiencia del uso de agua (WUE). Además, para estudiar la fluorescencia de las clorofilas, se determinó la eficiencia del PSII y el índice de transporte electrónico (ETR, *electron transport rate*).

##### *Asimilación de CO<sub>2</sub>*

La asimilación de CO<sub>2</sub> permitió conocer la cantidad de CO<sub>2</sub> atmosférico que toman las plantas para incorporarlo al ciclo de Calvin, y, por lo tanto, ser fuente de carbono para la célula.

Ni los tratamientos de salinidad o alta temperatura aplicados de forma individual, ni el tratamiento de estrés combinado de salinidad + alta temperatura mostraron efectos significativos sobre las plantas de las líneas RIL-66 y RIL-73 (Figura 48).

En la línea RIL-18, la asimilación de CO<sub>2</sub> incrementó significativamente en plantas cultivadas bajo condiciones de alta temperatura o de salinidad + alta temperatura respecto a las plantas control.

En la línea RIL-74, los valores más altos de asimilación de CO<sub>2</sub> se encontraron en plantas sometidas un estrés por alta temperatura. En cambio, la aplicación del estrés salino y el estrés combinado de salinidad y alta temperatura no causaron efectos significativos en esta línea respecto a las plantas control.

Por último, en la línea RIL-76, curiosamente las plantas control presentaron los valores más bajos de asimilación de CO<sub>2</sub> respecto al resto de tratamientos, aunque la aplicación de la salinidad de manera individual no tuvo efectos significativos. Los tratamientos de alta temperatura y de salinidad + alta temperatura, aumentaron significativamente los valores de asimilación de CO<sub>2</sub> en esta línea respecto a las plantas control.

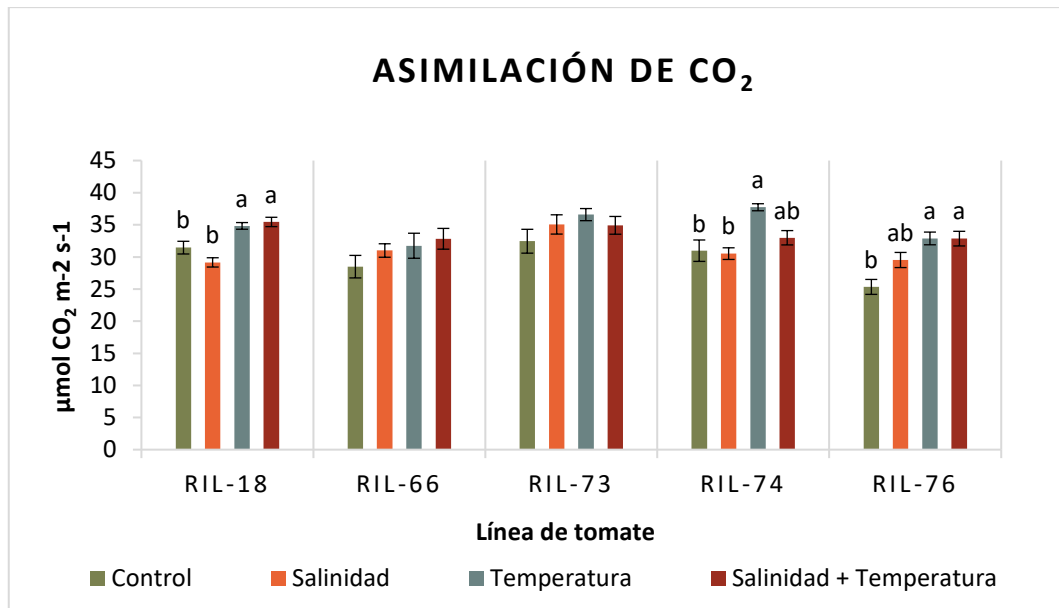


Figura 48: Asimilación de CO<sub>2</sub> de las distintas líneas de tomate sometidas a los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). La asimilación de CO<sub>2</sub> está expresada en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=4) Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

### *Conductancia estomática*

En las líneas RIL-18 y RIL-73, los distintos tratamientos de salinidad, alta temperatura y salinidad + alta temperatura no afectaron de forma significativa a los valores de conductancia estomática (Figura 49).

En la línea RIL-66, los tratamientos de alta temperatura y de estreses combinados indujeron a un aumento de la conductancia estomática respecto al tratamiento de salinidad y a las plantas control, aunque no fue significativo respecto a estas últimas.

Las líneas RIL-74 y RIL-76 también presentaron valores más altos de conductancia estomática bajo los tratamientos de alta temperatura y de salinidad + alta temperatura respecto a las plantas control y al tratamiento de estrés salino simple. Además, estos valores fueron ligeramente más altos cuando la alta temperatura fue aplicada de manera individual que de manera combinada.

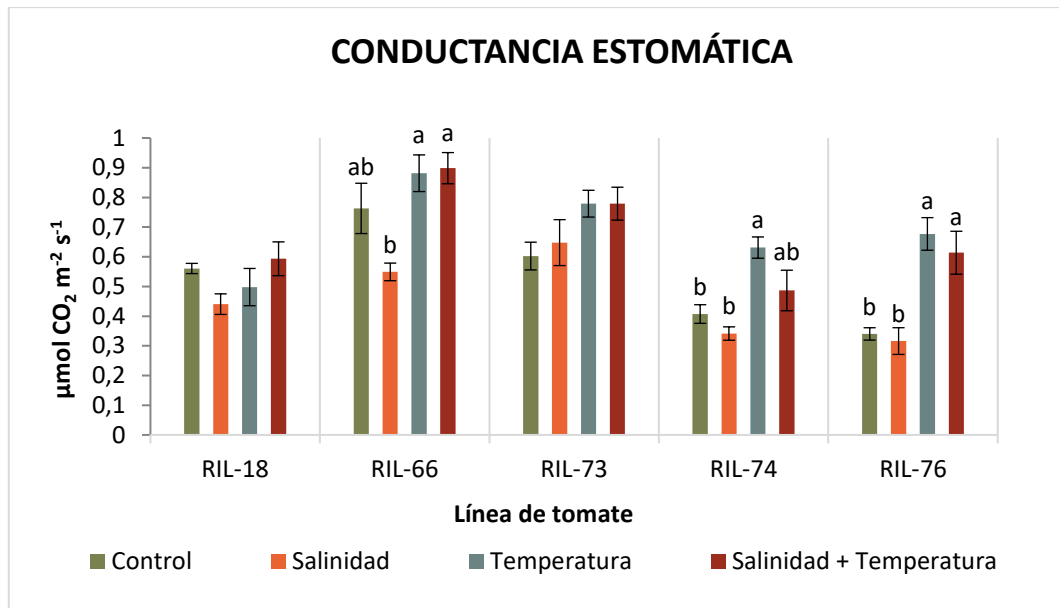


Figura 49: Conductancia estomática de las distintas líneas de tomate sometidas a los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). La conductancia estomática está expresada en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=4). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

### *Índice de transpiración*

El comportamiento observado en los valores obtenidos para el índice de transpiración fue similar en todas las líneas recombinantes analizadas (Figura 50). La aplicación de alta temperatura o de ésta combinada con la salinidad hizo que aumentaran los valores de transpiración respecto a las plantas control y a las plantas con salinidad simple.

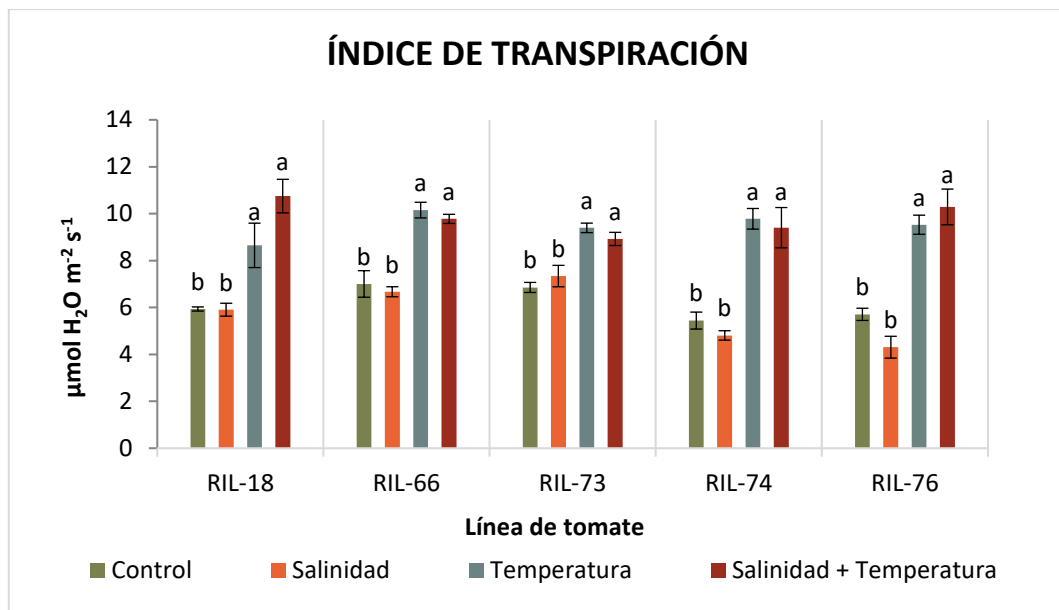


Figura 50: Índice de transpiración de las distintas líneas de tomate sometidas a los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). El índice de transpiración está expresado en  $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Los datos representan medias  $\pm$  SE ( $n=4$ ). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

### *Eficiencia del uso del agua*

La eficiencia del uso del agua (WUE, *water use efficiency*) se obtuvo mediante el cociente entre los valores obtenidos para la fotosíntesis neta y los obtenidos en la tasa de transpiración. Este valor es interesante desde el punto de vista de que permite estudiar si existen o no diferencias entre las distintas líneas recombinantes en el uso del agua en los procesos fotosintéticos y si este factor puede estar ligado a los procesos de tolerancia al estrés abiótico.

En general, todas las líneas recombinantes estudiadas presentaron mayor WUE bajo condiciones óptimas de crecimiento (control) y bajo el estrés salino simple que cuando eran crecidas bajo condiciones de estrés por alta temperatura, aplicada simple o combinada con la salinidad (Figura 51).

Por el contrario, cuando la salinidad era aplicada de manera individual, dicho estrés disminuyó ligeramente este parámetro en la línea RIL-18, y no causó efectos en la línea RIL-73. En las líneas RIL-66, RIL-74 y RIL-76, los valores de WUE fueron

mayores en las plantas sometidas a un estrés salino simple que en las plantas control y que en el resto de tratamientos.

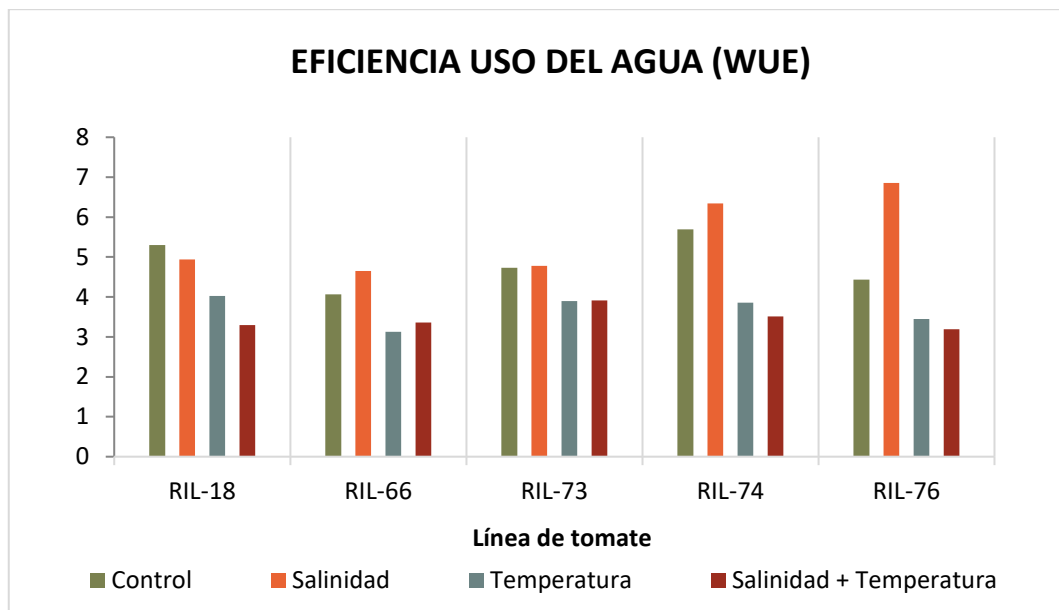


Figura 51: Eficiencia del uso del agua de las distintas líneas de tomate sometidas a los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=4). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

### *Eficiencia del fotosistema II (PSII)*

La línea RIL-18 (Figura 52) no mostró diferencias significativas con respecto a los valores de rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v'/F_m'$ ) entre los distintos tratamientos aplicados a las líneas recombinantes sujetas a este estudio.

En la línea RIL-66, los valores de  $F_v'/F_m'$  fueron mayor en el tratamiento de estrese combinados (salinidad + alta temperatura) que en el resto de tratamientos. Los valores de este parámetro también fueron mayores en las plantas a las que sólo se les aplicó el tratamiento de alta temperatura simple que en las plantas control. La salinidad no afectó de forma significativa a esta línea recombinante con respecto a las plantas control.

Las líneas RIL-73 y RIL-76 se comportaron de manera similar, presentando valores más altos de  $F_v'/F_m'$  en las plantas que habían sido tratadas con alta



temperatura que con el resto de tratamientos. la combinación de salinidad y alta temperatura indujo un aumento dicho valor respecto a las plantas control, pero siguió siendo más bajo que el encontrado cuando la temperatura era aplicada de manera individual. Al igual que en las líneas anteriores, la salinidad no causó ningún efecto en estas plantas.

Por último, en la línea RIL-74, sólo se encontraron diferencias significativas bajo un tratamiento de alta temperatura comparado con plantas tratadas bajo la combinación de salinidad y alta temperatura.

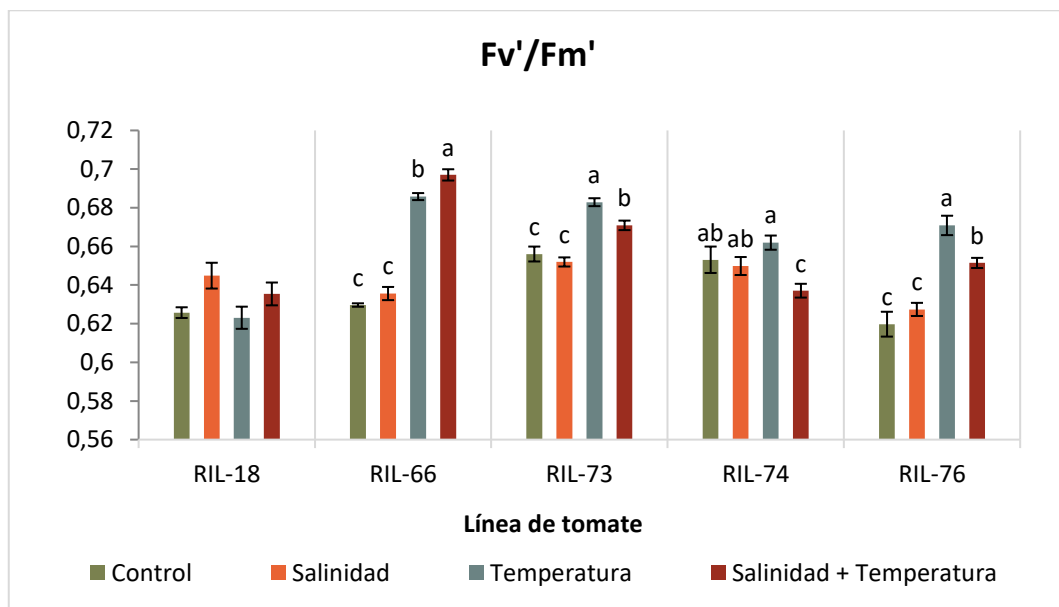


Figura 52: Rendimiento cuántico máximo del PSII en las distintas líneas de tomate sometidas a los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). Los datos representan medias  $\pm$  SE (n = 4) Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

La eficiencia del PSII, teóricamente, es proporcional al rendimiento cuántico fotoquímico del PSII y al igual que el anterior, es un buen indicador del daño celular provocado por estreses abióticos en plantas.

Las líneas RIL-73 y RIL-74 (Figura 53) no presentaron diferencias significativas en la eficiencia del PSII bajo ninguno de los tratamientos ensayados. En las líneas RIL-18, RIL-66 y RIL-76 los tratamientos de alta temperatura y de

salinidad + alta temperatura indujeron un incremento de este parámetro respecto a las plantas control y a aquellas que habían sido tratadas con un estrés salino simple, obteniendo valores ligeramente mayores cuando el estrés era aplicado de manera conjunta con la alta temperatura.

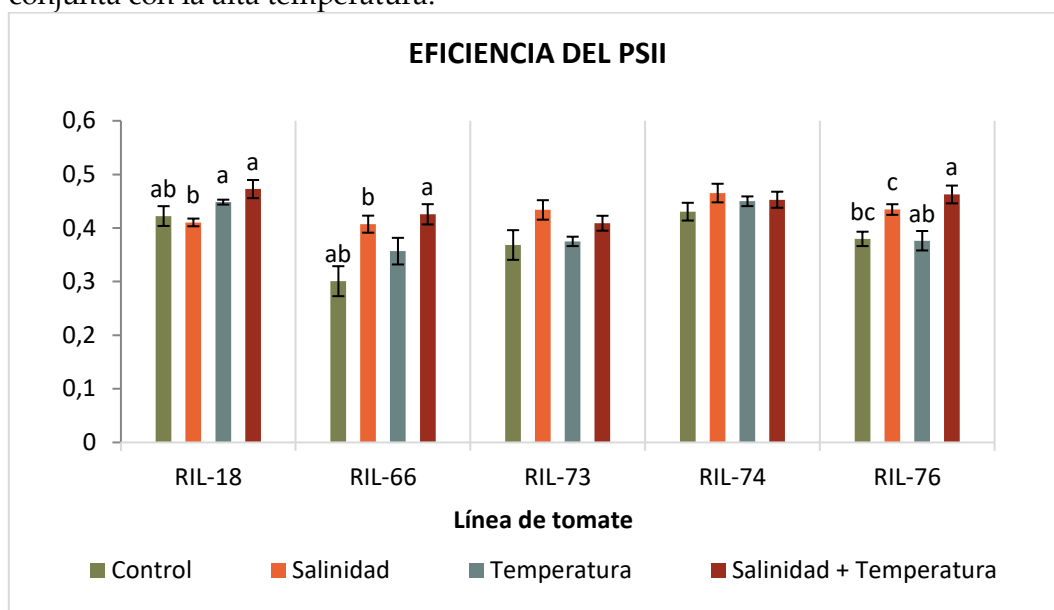


Figura 53: Eficiencia del PSII de las distintas líneas de tomate sometidas a los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=4) Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

#### *Índice de transporte electrónico (ETR, electron transport rate)*

Este parámetro permite estimar la velocidad de transporte de electrones desde el PSII al PSI durante el proceso fotosintético y es otro de los marcadores del daño que un estrés abiótico puede inducir a las membranas del cloroplasto y al aparato fotosintético en sí.

La Figura 54 muestra los resultados obtenidos para este parámetro, que mostraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados en las líneas RIL-18, RIL-74 y RIL-76.

En la línea RIL-18, el mayor ETR se encontró en plantas que crecieron bajo el tratamiento de salinidad + alta temperatura, aunque no se encontraron diferencias significativas con respecto a las plantas control. El ETR más bajo, en cambio, se

encontró en las plantas crecidas bajo salinidad, aunque, como en el caso anterior, tampoco se encontraron diferencias significativas respecto a las plantas control.

La línea RIL-74 presentó unos valores más altos de ETR bajo el tratamiento de alta temperatura, y fue significativamente mayor respecto a las plantas control y a las plantas sometidas al tratamiento de salinidad simple.

Por último, las plantas de la línea RIL-76 sometidas al tratamiento de la combinación de salinidad y alta temperatura, presentaron un mayor ETR respecto a las plantas control.

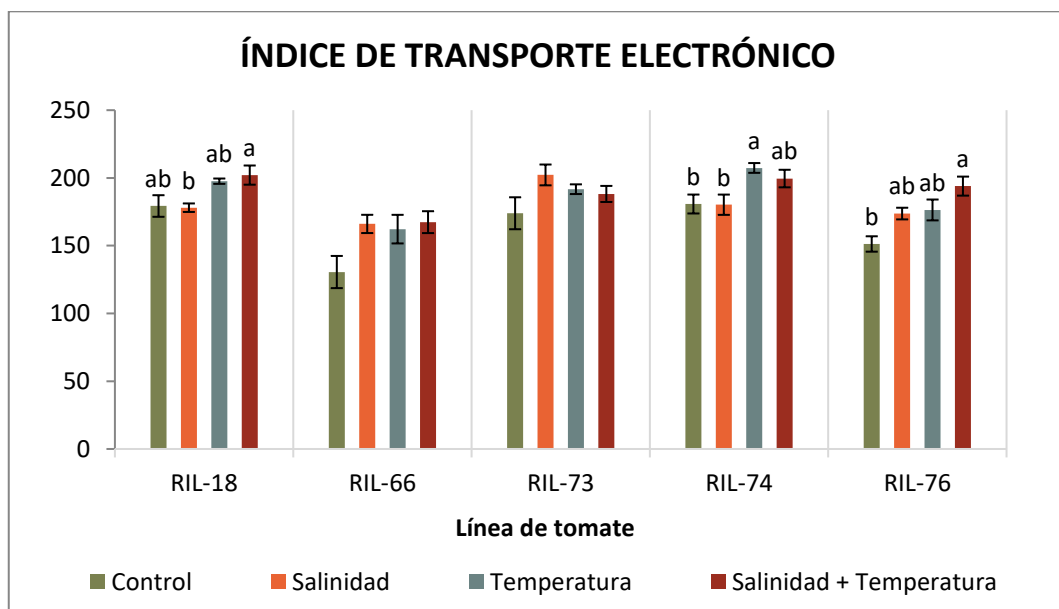


Figura 54: índice de transporte electrónico de las distintas líneas de tomate sometidas a los tratamientos Control, Salinidad (75 mM NaCl), Alta temperatura (35°C) y Salinidad + Alta temperatura (75 mM NaCl + 35°C). Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=4). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

#### 5.4.6. Líneas seleccionadas

Una vez terminado el estudio de las 5 líneas, se seleccionaron dos líneas para llevar a cabo el último experimento propuesto. En base a los resultados obtenidos en los experimentos realizados y teniendo en cuenta los parámetros analizados en las diferentes líneas recombinantes, se seleccionaron la línea más tolerante, RIL-76,

y una línea más sensible al estrés combinado, la RIL-18. La línea menos tolerante fue la RIL-74, pero a lo largo de los experimentos dio problemas de germinación y crecimiento, por lo que se determinó escoger la línea RIL-18 como la variedad sensible para la consecución del último ensayo.

#### 5.4.6. Discusión

Este experimento fue diseñado para estudiar la respuesta fisiológica de las 5 RILs seleccionadas (Tabla 14) frente a los estreses de salinidad y alta temperatura aplicados tanto de manera individual como de manera combinada. En las últimas décadas, numerosos estudios se han centrado en los mecanismos de respuesta que las plantas presentan ante el efecto de dichos estreses, pero solo cuando estos se aplicaban de manera simple (Chew y Halliday, 2011; Hirayama y Shinozaki, 2010). Sin embargo, y basado en las predicciones del Panel Internacional sobre Cambio Climático (IPCC, 2018) se hace necesario el avanzar en el conocimiento sobre la respuesta de las plantas frente a ambos estreses actuando sinérgicamente (Suzuki y col., 2014). Las plantas responden a la salinidad o a la alta temperatura a través de cambios de diferentes mecanismos fisiológicos, metabólicos y moleculares y su posterior integración, lo que permite desarrollar una respuesta específica para que éstas se adapten a los cambios del ambiente (Rivero y col., 2014).

La salinidad es uno de los estreses más perjudiciales para las plantas, ya que afecta a numerosos aspectos moleculares y fisiológicos relacionados con el crecimiento y desarrollo vegetativo (Cuartero y Fernandez-Munoz, 1999; Parida y Das, 2005; Shrivastava y Kumar, 2015). Los resultados anteriormente descritos así lo corroboran, pues la salinidad aplicada de manera individual tuvo un impacto negativo en el crecimiento de las líneas RIL-18, RIL-73 y RIL-74. Las líneas RIL-66 y RIL-76, en cambio, no se vieron afectadas por un aumento en la concentración de sales de la solución nutritiva (Figura 32 y Figura 34), lo que pone de manifiesto que dichas líneas desarrollaron una respuesta adaptativa que condujo a la tolerancia al estrés salino en la planta (Chinnusamy y col., 2004).

El estrés por altas temperaturas también tiene una amplia gama de efectos en las plantas en términos de fisiología, bioquímica y vías de regulación génica (Bita y Gerats, 2013). La susceptibilidad de las plantas a este estrés varía con la etapa de desarrollo en la que se encuentren, (Hasanuzzaman y col., 2013), aunque afecta en

mayor medida al estado reproductivo (Hatfield y col., 2011). En estudios de ambiente controlado se ha demostrado que un aumento de la temperatura puede adelantar el desarrollo fenológico de las plantas en comparación con plantas desarrolladas bajo temperaturas control, provocando que el crecimiento del cultivo sea más rápido y el ciclo más corto, lo que disminuye el rendimiento general de las plantas (Hatfield y Prueger, 2015). Los resultados confirman los estudios de Hatfield y Prueger, puesto que como se puede observar en la Figura 32, el estrés de alta temperatura aplicado de forma individual no causó ningún efecto negativo en el crecimiento de las plantas. Además, todas las RILs seleccionadas fueron tolerantes a este tipo de estrés en más de un 100% (Figura 35), lo que demuestra que el crecimiento de las plantas sometidas a la alta temperatura fue más rápido que el de las plantas control.

En cuanto al estrés combinado, todas las líneas mostraron porcentajes mayores de tolerancia que los que se habían obtenido en los experimentos previos (Figura 36). En los experimentos anteriores, las plantas se cosecharon en el momento previo a la floración, mientras que en este, las plantas se cosecharon cuando todavía estaban en desarrollo vegetativo, lo que indica que el estrés combinado puede afectar de diferente manera dependiendo del estado de desarrollo en el que se encuentre la planta, y que, normalmente, cuando los experimentos se dan en condiciones controladas, sus efectos negativos suelen ser menos devastadores (Mittler, 2006; Rivero y col., 2019).

Las líneas RIL-66 Y RIL-73 variaron su tolerancia al efecto de la combinación de estreses en más de un 40% (Figura 36), lo que demuestra que incluso dentro de una misma línea RIL, los efectos dependen tanto de la especie como del genotipo de las plantas, ya que, en ocasiones, se dan numerosas variaciones interespecíficas e intraespecíficas (Barnabas y col., 2008), así como variaciones epigenéticas producidas por el estrés (Gallusci y col., 2017). Las líneas RIL-18, RIL-74 y RIL-76 tuvieron un comportamiento frente al estrés combinado similar a los ensayos anteriores, ya que sus rangos de tolerancia apenas variaron en un 10%, lo que pone de manifiesto que estas RILs podrían ser interesantes de estudio, puesto que sus resultados pueden replicarse fiablemente para futuros experimentos (Ashrafi y col., 2009). Teniendo en cuenta, de momento, únicamente el crecimiento de las plantas, el estudio de la tolerancia a los estreses de salinidad y alta temperatura

aplicados tanto de manera simple como de manera combinada corroboró que la línea más tolerante seguía siendo la RIL-76 (Figura 34, Figura 35 y Figura 36), y que esta tolerancia en el resto de líneas estudiadas (RIL-18, RIL-66, RIL-73 Y RIL-74) fluctuaba dependiendo de si estos eran aplicados de manera simple o de manera combinada.

La regulación iónica es un factor esencial del mecanismo de tolerancia a los estreses abióticos en las plantas de tomate. La salinidad aumenta la concentración de  $\text{Na}^+$  en las raíces y hojas de las plantas, y altera las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$  también bajo condiciones de estrés, reduciéndose considerablemente generalmente en las hojas (Cuartero y Fernandez-Munoz, 1999).

El  $\text{Ca}^{2+}$  es uno de los iones más versátiles, y está implicado en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Kudla y col., 2010). Ante condiciones climatológicas adversas, como las altas temperaturas, la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol es inducida (Liu y col., 2008), lo que sugiere que este ion está involucrado en los mecanismos reguladores que las plantas activan bajo dicho estrés (Tan y col., 2011; Wang y col., 2009).

Al profundizar en las relaciones iónicas que tenían lugar en las RILs seleccionadas, se observó que, en general, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  fue mayor en las hojas que en la raíz (Figura 37 y Figura 41) y que la combinación de salinidad y alta temperatura, reducía la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto en las hojas como en la raíz de las plantas estudiadas en comparación con las plantas control (Figura 37 y Figura 41). Los estreses de salinidad y, especialmente el de temperatura, aplicados de forma individual, no tuvieron un impacto tan negativo en las plantas como cuando estos eran aplicados de manera conjunta (Rivero y col., 2019), lo que conduce a pensar que el  $\text{Ca}^{2+}$  desempeña un papel fundamental en los mecanismos de defensa inducidos por el estrés por altas temperaturas, ya que la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  es necesaria para desarrollar la tolerancia a dicho estrés (Goswami y col., 2015). No obstante, esta reducción de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  no fue igual en las 5 líneas estudiadas, siendo esta reducción más acusada en las hojas de las RIL-18, RIL-66 y RIL-76 que en las RIL-73 y RIL-74 (Figura 37) bajo la combinación de salinidad y alta temperatura.

Contrariamente a lo que ocurría con el  $\text{Ca}^{2+}$ , el catión  $\text{K}^+$  (Figura 38 y Figura 42), en general, se acumuló más en la raíz que en las hojas de las plantas de las

líneas RILs estudiadas, debido, fundamentalmente, a que el proceso de captación de potasio por la raíz es más rápido que el transporte a través del tallo (Besford y col., 1974), ya que, después de haber alcanzado la raíz, el  $K^+$  debe llegar hasta los vasos xilemáticos, y después, ser transportado hacia la parte aérea. (Nieves-Cordones y col., 2019). Por otro lado, tanto en las hojas como en las raíces de las distintas líneas de tomate estudiadas, la salinidad aplicada de manera individual redujo significativamente la concentración de  $K^+$  tanto en las hojas como en la raíz, lo que demuestra que este catión es uno de los más afectados por el estrés salino (Nieves-Cordones y col., 2019). Por otro lado, cuando el estrés de salinidad fue combinado con la alta temperatura, la reducción de la concentración de  $K^+$  en las hojas fue menos acusada, lo que se correspondió con una disminución de la concentración de  $Na^+$  en dichas plantas, por lo que es probable que algunos de los procesos que se dan en respuesta a la alta temperatura favorezcan la acumulación de  $K^+$  y una menor absorción de  $Na^+$ .

La relación entre  $Na^+$  y  $K^+$  se ha correlacionado con la tolerancia a la salinidad, debido a que, en condiciones salinas, estos cationes comparten muchas similitudes físico-moleculares que conducen al desplazamiento del  $K^+$  por parte del  $Na^+$  en sus funciones fisiológicas cuando éste último está presente en altas concentraciones (Chen y col., 2007). Los resultados en la relación de  $K^+/Na^+$  tanto en la hoja (Figura 40) como en la raíz (Figura 44) de las distintas RILs indican que existe una correspondencia entre este factor y el crecimiento de las plantas, lo que prueba que el mantenimiento de la homeostasis de  $K^+/Na^+$  es crucial para hacer frente al estrés salino y aumentar la tolerancia de las plantas a dicho estrés. (Amtmann y col., 2004).

Las plantas responden a elevadas concentraciones de  $Na^+$  en el exterior manteniendo bajas concentraciones de  $Na^+$  citosólicas, y por lo tanto, un alto ratio  $K^+/Na^+$ . La estrategia principal para el mantenimiento de esta relación en el citosol incluye la extrusión de  $Na^+$  y/o su compartimentación intracelular en la vacuola, dos procesos esenciales para mantener la desintoxicación citosólica provocada por el  $Na^+$  y el ajuste osmótico necesario para tolerar el estrés salino (Nieves-Cordones y col., 2019).

Bajo condiciones de estrés por sequía o salinidad, las relaciones hídricas de la planta se ven alteradas, produciéndose una disminución de los potenciales

hídrico y osmótico que reducen la absorción de agua desde la raíz y, por consiguiente, el desarrollo vegetativo (Romero-Aranda y col., 2001). Los resultados muestran que las plantas que crecieron bajo condiciones de estrés disminuyeron tanto el potencial hídrico (Figura 45) como el osmótico (Figura 46), y que esa reducción de los potenciales fue más acusada en los tratamientos de salinidad, tanto aplicada de manera individual como de manera combinada, que en el estrés de alta temperatura. La explicación reside en que la salinidad reduce la disponibilidad de agua del exterior, y aunque planta disminuya tanto el potencial hídrico como el potencial osmótico para favorecer la absorción de agua por la raíz (Clark, 1990; Sheldon y col., 2017), no es suficiente para hacer frente al estrés, lo que compromete el crecimiento de las plantas. Este hecho se comprueba en resultados de relaciones hídricas descrito, ya que la disminución del potencial osmótico en las plantas guardó relación con una disminución en el peso fresco (Figura 32) y el peso seco (Figura 33) de las en todas las líneas RILs.

En condiciones de estrés, la acumulación de solutos compatibles en la vacuola es necesaria para compensar el ajuste osmótico y aumentar el potencial de turgor (Munns, 1993; Romero-Aranda y col., 2001) que fue menor en las plantas en las que el estrés salino fue aplicado de manera simple o combinado con la alta temperatura (Figura 47). No obstante, un aumento de la presión de turgor no está siempre relacionado con un aumento del contenido de agua en la célula (Rivero y col., 2014), ya que se ha demostrado que las células pueden reducirse bajo condiciones de estrés, reduciendo a su vez la expansión celular y la arquitectura de las hojas (Mart y col., 2016).

En todas las RIL-s estudiadas, la relación  $K^+/Na^+$  en las hojas guardó relación con una disminución del potencial osmótico y un aumento de la presión de turgor en la hoja, lo que demuestra que, bajo situaciones de estrés, la respuesta de las plantas no depende sólo de la adaptación a la toxicidad de  $Na^+$ , si no, también, de la adaptación secundaria a efectos como la deficiencia o el agotamiento del agua. (Liang y col., 2018).

Los estreses de salinidad y alta temperatura afectan de manera diferente a los parámetros fotosintéticos de las plantas. La alteración de estos mecanismos suele ser un buen indicador del estrés, ya que el crecimiento y la fotosíntesis están estrechamente relacionadas, y cualquier restricción que ocurra en el intercambio



gaseoso puede limitar el desarrollo vegetativo de las plantas (Kocal y col., 2008). Los resultados muestran que, en todas las líneas RILs estudiadas (RIL-18, RIL-66, RIL-73, RIL-74 y RIL-76), el estrés salino aplicado de manera individual apenas varió dichos parámetros en relación con las plantas control (Figura 48, Figura 49 y Figura 50). Por el contrario, en las plantas que crecieron bajo la acción de la alta temperatura y el estrés combinado de salinidad y alta temperatura, estos parámetros fotosintéticos aumentaron en relación a las plantas control y a las que habían crecido sólo bajo el estrés salino. En las plantas expuestas a la salinidad, el cierre estomático, producido para evitar la pérdida de agua por transpiración, causa el agotamiento del contenido de agua celular y una reducción en el transporte de compuestos asimilados, que son las principales causas de inhibición de la fotosíntesis (Hare y col., 1998), por lo que es probable que el comportamiento de las líneas RILs seleccionadas se explique atendiendo al estudio de (Penella y col., 2016), donde se expone que las plantas son capaces de preservar el rendimiento fotosintético mediante el aumento de osmoprotectores, minimizando así el daño producido por el estrés.

Por otro lado, la temperatura elevada afecta principalmente a las reacciones bioquímicas de la fotosíntesis, y, dependiendo de la intensidad y la duración del estrés, las altas temperaturas pueden dañar de manera irreversible la RuBisCo, complejos de evolución del oxígeno, la estructura del cloroplasto y los centros de reacción del PSII (Allakhverdiev y col., 2008; Attaran y col., 2014; Havaux, 1993). En los resultados anteriormente descritos, ese aumento en los parámetros fotosintéticos de las plantas sometidas al estrés de temperatura, tanto de manera simple como de manera combinada, puede explicarse debido a que las plantas, ante la temperatura elevada, aumentaron la tasa de transpiración para regular el aumento de la temperatura de la hoja (Figura 50) y, al mismo tiempo, proteger a los fotosistemas (Ilan y col., 1995). Para ello, las plantas deben abrir los estomas y, como consecuencia, se produce una mayor tasa de fijación de CO<sub>2</sub>. Este aumento de la tasa fotosintética también se relacionó con un aumento en el índice de transporte electrónico del PSII al PSI en las distintas RILs estudiadas (Figura 54).

El parámetro  $Fv'/Fm'$  refleja la máxima eficiencia cuántica del PSII, y es un buen indicador del grado de estrés que está sufriendo una planta. En condiciones normales, la mayor parte de la energía luminosa absorbida por las moléculas de

clorofila tiene como destino la fotosíntesis, pero, en situaciones de estrés, en vez de pasar al proceso fotosintético de la planta, esa energía puede disiparse en forma de calor o ser remitida como luz (Carter y Knapp, 2001). Por consiguiente, en las plantas que son menos sensibles a los estreses abióticos la fluorescencia de las clorofilas y la tasa fotosintética estarán relacionadas. Los resultados de las líneas descritas indican que un aumento en los índices relacionados con la fluorescencia de las clorofilas (Figura 52) supuso también un aumento de la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> (Figura 48) y la conductancia estomática (Figura 49) en las líneas RIL-66, RIL-73 y RIL-76. Casualmente, en las líneas menos tolerantes (RIL-18 y RIL-74), estos parámetros no estaban correlacionados con un aumento en la tasa fotosintética. Sharma y col. (2015) demostraron que los parámetros derivados de la fluorescencia de las clorofilas también estaban correlacionados positivamente con el peso seco de la planta, lo que, a su vez, podría estar relacionado con la sensibilidad del aparato fotosintético a las altas temperaturas y a los mecanismos fisiológicos subyacentes a la tolerancia de las plantas a dicho estrés. Nuestros resultados encajan con esta teoría, puesto que en la línea RIL-76, la línea más tolerante, un aumento en  $F_v'/F_m'$  se correlacionó positivamente con un aumento de la fotosíntesis (0,655\*\*) y del peso seco de las plantas (0,854\*\*).

En base al estudio de los resultados obtenidos durante el ensayo, se seleccionaron las líneas RIL-76, definida como línea tolerante, y la línea RIL-18, definida como línea sensible, para la consecución del último experimento.

#### 5.4. EXPERIMENTO 4: DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA AGRONÓMICA ENTRE PLANTAS TOLERANTES Y SENSIBLES A LA COMBINACIÓN DE ESTRESSES ABIÓTICOS

Se estudió el efecto combinado de la salinidad y la alta temperatura en las dos líneas de plantas de tomate seleccionadas: RIL-18 y RIL-76. Este estudio estuvo enfocado en el efecto de la combinación de la alta temperatura con diferentes niveles de salinidad sobre dos estados fenológicos de las plantas: estado vegetativo y estado de reproducción, y sobre la respuesta agronómica.

Para ello, las plantas fueron cultivadas en dos módulos de invernadero independientes durante cinco meses, tal y como se ha descrito en el apartado Material y Métodos (Experimento 4). Las plantas control fueron cultivadas a una temperatura máxima de 25°C, y fueron irrigadas con una solución nutritiva que contenía 15 mM de NaCl. Para el resto de tratamientos, las plantas fueron cultivadas a una temperatura máxima de 35°C y los niveles salinos de 15 mM, 60 mM y 120 mM.

La biomasa de las plantas se evaluó en dos momentos distintos: a mitad del ensayo, cuando las plantas todavía estaban en estado vegetativo y al final del experimento (estado reproductivo). El estado nutricional de las plantas también fue estudiado en estos dos estados de desarrollo. Además, se evaluó la calidad comercial de los frutos, y se midieron parámetros como el intercambio gaseoso de las plantas.

#### 5.4.1. Índice de supervivencia

Al someter a las plantas a diferentes niveles salinos, se pudo estudiar el índice de supervivencia de las dos líneas seleccionadas, es decir, las plantas que siguieron vivas al final del experimento a pesar de los estreses combinados de alta temperatura y el aumento de la salinidad. De esta manera se pudo validar si la tolerancia de las líneas seleccionadas, y verificada en los ensayos anteriores, seguía siendo efectiva bajo diferentes condiciones de cultivo de campo reales. Para ello, se determinó el número de las plantas que habían sobrevivido a los diferentes estreses salinos en base a las plantas que había al principio del experimento y las que finalmente sobrevivieron (Figura 55).

Al principio del experimento se cultivaron 18 plantas de cada línea recombinante. 6 de esas plantas fueron cosechadas en la fase de crecimiento vegetativo para determinar la producción de biomasa y la composición nutricional de las plantas en este estadio, por lo que para calcular el índice de supervivencia al final del experimento se contó con un total de 12 plantas.

Las plantas que habían sido cultivadas a 25°C (condiciones óptimas de cultivo) se desarrollaron y crecieron en buenas condiciones, aunque al final del experimento, sobrevivieron 11 plantas de la línea RIL-76 y 10 de la línea RIL-18 (Figura 55). En el siguiente tratamiento, 11 plantas sobrevivieron a la combinación de estrés de alta temperatura y un nivel salino de 15 mM, lo que supuso una supervivencia de aproximadamente el 90% en ambas líneas. Cuando la salinidad aumentaba a 60 mM a 35°C de temperatura, la supervivencia bajó al 66% en ambas líneas, lo que supuso la pérdida de 4 plantas en cada una de las líneas.

Cuando las plantas fueron sometidas a 120 mM de NaCl en condiciones de alta temperatura, se observó que el índice de supervivencia de las plantas fue mayor en la línea RIL-76 (66%) que en la línea RIL-18, que fue de un 33%, con una pérdida de 4 y 8 plantas respectivamente.

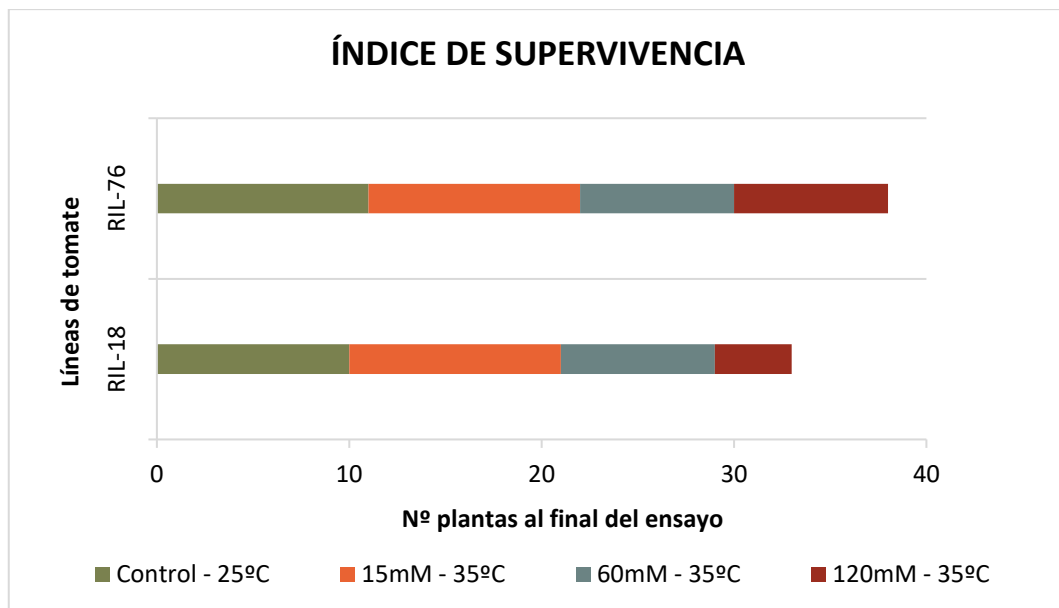


Figura 55: Índice de supervivencia de las líneas RIL-18 y RIL-76 cultivadas a diferentes temperaturas (25°C y 35°C) y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM). Este índice está expresado como el número de plantas que sobrevivieron hasta el final del experimento.

#### 5.4.2. Biomasa

En la Figura 56 se muestra el peso fresco de la parte aérea de las plantas en los dos estados fenológicos estudiados: estado vegetativo y estado de reproducción.

Al determinar el peso fresco de la parte aérea de las plantas durante la fase de desarrollo vegetativo (Figura 56), se observó que, en ambas líneas, conforme aumentaba el estrés salino al que estaban sometidas las plantas, disminuía el peso fresco de la parte aérea. El estrés de temperatura (35°C y 15 mM de NaCl) no produjo cambios significativos en la biomasa de las plantas de las distintas líneas, aunque se observó que en la línea RIL-18 hubo una mejora en el peso fresco bajo dichas condiciones comparadas con las plantas control. En la línea RIL-76, en cambio, se observó un ligero descenso en la biomasa de las plantas de dicho tratamiento.

Durante la fase reproductiva (Figura 57), una temperatura de 35°C afectó significativamente a las plantas de la línea RIL-76, haciendo que éstas tuvieran un

peso fresco superior a las de la misma línea cultivada a 25°C y superior a las de la línea RIL-18. En la línea RIL-18 también se observó esta tendencia, pero el aumento de peso de la parte aérea de las plantas cultivadas a 35°C no fue significativo respecto a las cultivadas a 25°C.

Las plantas de la línea RIL-76 presentaron una mayor biomasa en la parte aérea bajo los tratamientos de 15 mM y 60 mM a 35°C que las plantas control. Entre dichos tratamientos, el aumento de salinidad bajo condiciones de alta temperatura no causó ningún efecto. Las plantas que menos se desarrollaron vegetativamente fueron las que crecieron bajo la condición salina de 120 mM a 35°C de temperatura.

En la línea RIL-18 el comportamiento de las plantas fue similar, salvo por que los tratamientos de 15 mM y 60 mM a 35°C, donde no se observaron diferencias significativas respecto a las plantas control (Figura 57).

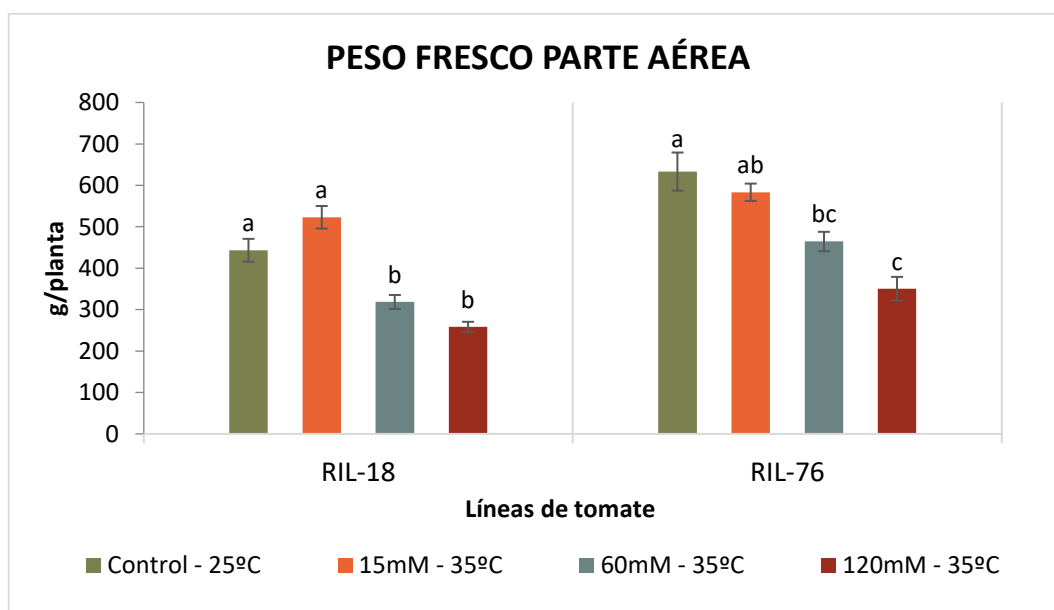


Figura 56: Peso fresco de las plantas de tomate en estado vegetativo de las líneas RIL-18 y RIL-76 cultivadas a diferentes temperaturas (25°C y 35°C) y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM). Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=3). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

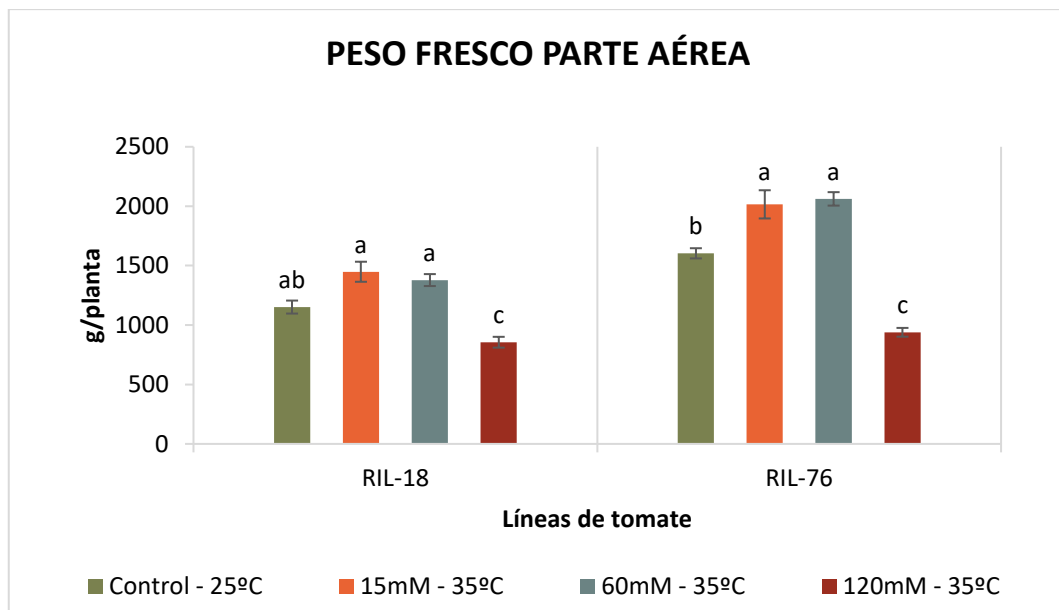


Figura 57: Peso fresco de las plantas de tomate en estado de reproducción de las líneas RIL-18 y RIL-76 cultivadas a diferentes temperaturas (25°C y 35°C) y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM). Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=10 a 25°C; n = 11 a 15 mM; n=8 a 60 mM; n=4 a 120 mM para la línea 18) (n=11 a 25°C; n = 11 a 15 mM; n=8 a 60 mM; n=8 a 120 mM para la línea 76). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

#### 5.4.3. Estado nutricional de las plantas

Se estudió el estado nutricional de las plantas en tres estados de desarrollo diferentes. El muestro 1 se realizó cuando la planta estaba en fase vegetativa, el muestro 2 cuando la planta estaba en fase reproductiva, y el muestro 3 al final del experimento. En los distintos muestreos se estudiaron los macronutrientes Ca, K, Na y P y los micronutrientes B, Fe, Mn y Zn.

##### *Macronutrientes*

La Figura 58 muestra la concentración foliar de  $\text{Ca}^{2+}$  en las líneas RIL-18 Y RIL-76 en las distintas etapas de desarrollo del cultivo. A grandes rasgos, el comportamiento en ambas líneas a lo largo del tiempo fue similar. En estado vegetativo, ambas líneas presentaron unos valores similares de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en todos los tratamientos, que disminuyeron en el muestro 2, cuando la planta estaba en su fase de reproducción. Al final del ensayo, la concentración foliar de

Ca<sup>2+</sup> se incrementó notablemente respecto al muestreo 2 en todos los tratamientos, y sólo ligeramente respecto al muestreo 1.

En el muestro 1 (fase vegetativa) de la línea RIL-18 (Figura 58), la concentración de Ca<sup>2+</sup> no presentó diferencias significativas entre el tratamiento control y los tratamientos de 15 mM y 60 mM de NaCl a 35°C. En cambio, si se apreció un descenso de casi el 40% en la concentración de calcio en las plantas sometidas a 120 mM de salinidad combinada con la alta temperatura respecto a las plantas control. En el muestreo 2 (fase reproductiva), la concentración de Ca<sup>2+</sup> fue ligeramente superior en las hojas de las plantas cultivadas bajo condiciones control que en el resto de tratamientos. Finalmente, al final del ensayo (muestreo 3), la concentración de Ca<sup>2+</sup> siguió siendo mayor en las plantas control que en el resto de tratamientos. Las plantas cultivadas a 60 mM y 120 mM de salinidad y 35°C de temperatura no presentaron diferencias significativas entre ellas en la concentración final de calcio en la hoja, pero sí fueron significativamente menores respecto a las plantas del tratamiento control y en las plantas cultivadas a 35°C con 15 mM de salinidad.

Continuando en la Figura 58 en el muestro 1 y el muestreo 2 de la línea RIL-76, el comportamiento de la concentración foliar de Ca<sup>2+</sup> fue similar al encontrado en la línea RIL-18: Los valores más bajos de este catión se encontraron en las plantas cultivadas bajo condiciones extremas (120 mM de salinidad y alta temperatura) respecto al resto de tratamientos. Finalmente, y al igual que ocurría con la línea RIL-18, Las plantas cultivadas a 60 mM y 120 mM de salinidad y 35°C de temperatura no presentaron diferencias significativas entre ellas en la concentración final de Ca<sup>2+</sup> en la hoja, pero sí fueron significativamente menores que en el tratamiento control y en las plantas cultivadas a 35°C con 15 mM de salinidad.



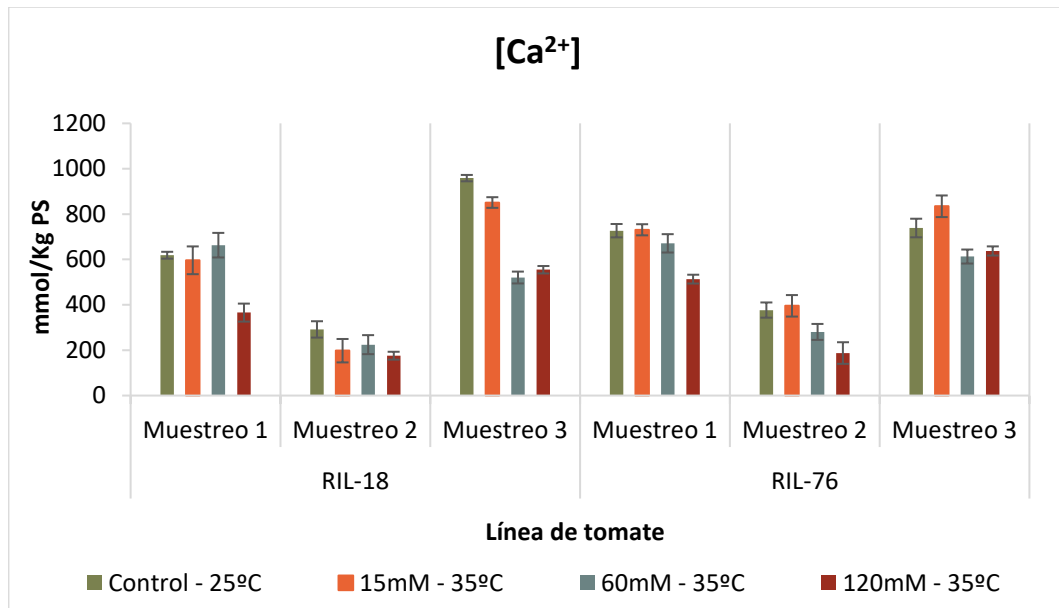


Figura 58: Concentración de Ca<sup>2+</sup> en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25 °C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. La concentración foliar de Ca<sup>2+</sup> está expresada como mmol kg<sup>-1</sup> peso seco. Los datos representan medias  $\pm$  SE (n = 3) para los muestreos 1 y 2. Para el muestreo 3 (n=10 a 25°C; n = 11 a 15 mM; n=8 a 60 mM; n=4 a 120 mM para la línea 18) (n=11 a 25°C; n = 11 a 15 mM; n=8 a 60 mM; n=8 a 120 mM para la línea 76).

La concentración de K<sup>+</sup> en las hojas de las dos líneas recombinantes (Figura 59) se mantuvo en aproximadamente los mismos valores durante los muestreos 1 y 2. En la línea RIL-18 no se observaron diferencias significativas en la concentración de K<sup>+</sup> entre los distintos tratamientos. En la línea RIL-76, en cambio, sí se observó una disminución en la concentración de K<sup>+</sup> en las hojas de las plantas de tomate que crecieron bajo condiciones de estrés combinado con una salinidad de 120 mM respecto al resto de tratamientos.

En el muestreo 3, las concentraciones más altas de K<sup>+</sup> de la línea RIL-18 se encontraron en las plantas control y en las plantas cultivadas a 35°C con una salinidad de 15 mM, las cuales fueron significativamente más elevadas que en los tratamientos de 60 mM y 120 mM de NaCl a 35°C. En la línea RIL-76, la

concentración de  $K^+$  fue significativamente mayor en las plantas cultivadas bajo una salinidad de 15mM a 35°C que las plantas control y que el resto de tratamientos.

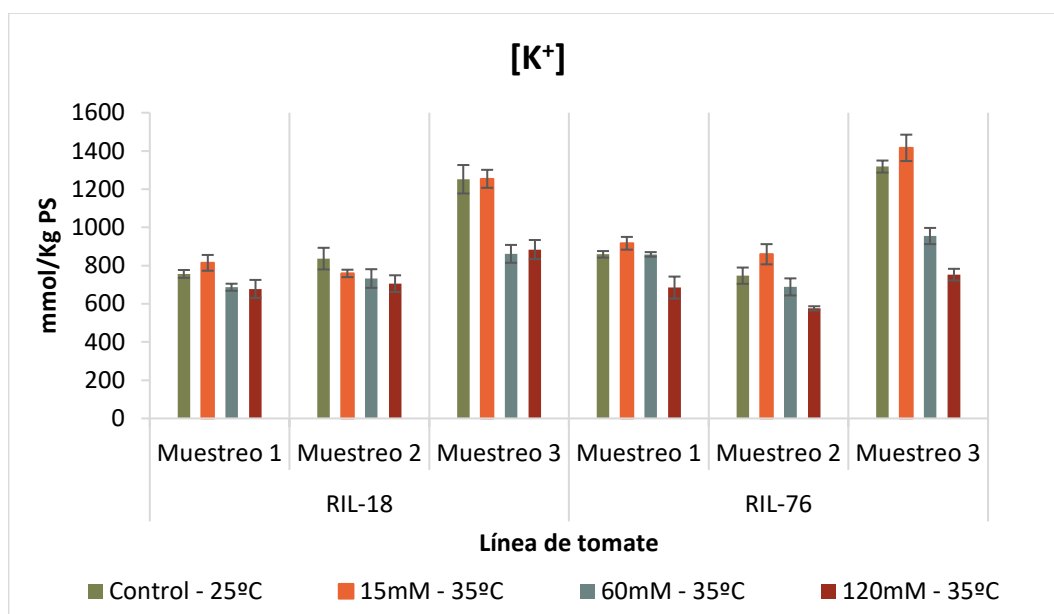


Figura 59: Concentración de  $K^+$  en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25 °C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. La concentración foliar de  $K^+$  está expresada como mmol  $kg^{-1}$  peso seco. Los datos representan medias  $\pm$  SE ( $n = 3$ ) para los muestreos 1 y 2. Para el muestreo 3 ( $n=10$  a 25°C;  $n = 11$  a 15 mM;  $n=8$  a 60 mM;  $n=4$  a 120 mM para la línea 18) ( $n=11$  a 25°C;  $n = 11$  a 15 mM;  $n=8$  a 60 mM;  $n=8$  a 120 mM para la línea 76).

En los diferentes muestreos de ambas líneas, RIL-18 y RIL-76, como era de esperar, la concentración de  $Na^+$  en la hoja (Figura 60) fue significativamente superior en las plantas cultivadas bajo los efectos de 60 mM y 120 mM de salinidad a 35°C que en las plantas cultivadas a 15 mM de NaCl en las mismas condiciones de temperatura y que las plantas control. Además, en ambas líneas, la concentración de  $Na^+$  en la hoja fue aumentando progresivamente a lo largo del tiempo en cada uno de los tratamientos. Las concentraciones más altas de  $Na^+$ , se encontraron en el muestreo 3 (final del experimento) de la línea RIL-76 en las plantas sometidas a una salinidad de 60 mM y 120 mM y 35°C de temperatura. Este aumento de la concentración fue mayor respecto al resto de tratamientos de la misma línea a las plantas cultivadas en las mismas condiciones de la línea RIL-18.

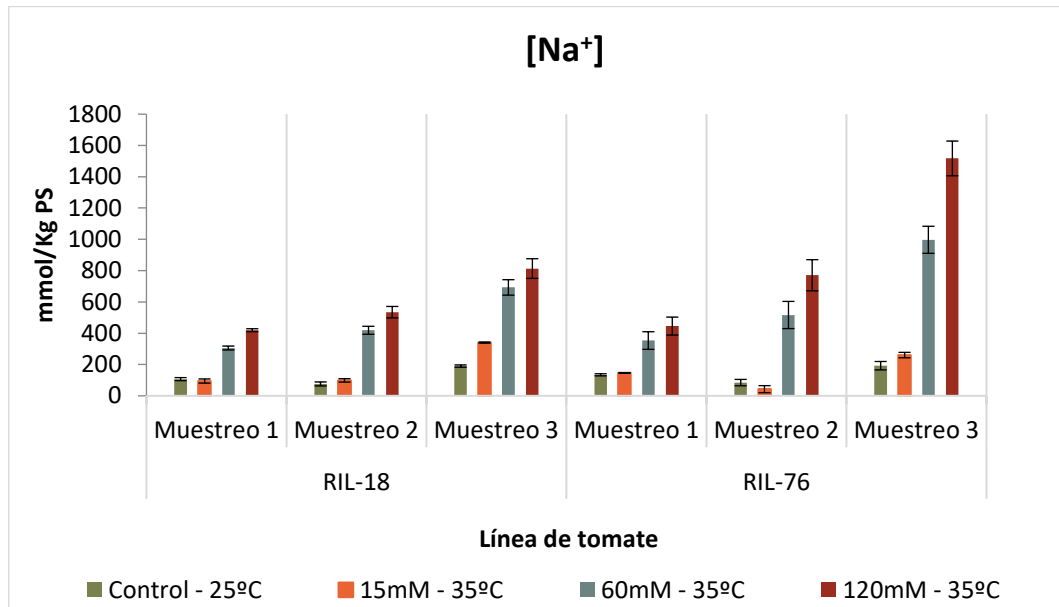


Figura 60: Concentración de Na<sup>+</sup> en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25°C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. La concentración foliar de Na<sup>+</sup> está expresada como mmol kg<sup>-1</sup> peso seco. Los datos representan medias ± SE (n = 3) para los muestreos 1 y 2. Para el muestreo 3 (n=10 a 25°C; n = 11 a 15 mM; n=8 a 60 mM; n=4 a 120 mM para la línea 18) (n=11 a 25°C; n = 11 a 15 mM; n=8 a 60 mM; n=8 a 120 mM para la línea 76).

En general, las concentraciones de fósforo (P) fueron mayores en las plantas de la línea RIL-18 que en las hojas de las plantas de la línea RIL-76 (Figura 61). En la línea RIL-18, además, las concentraciones de P fueron mayores bajo condiciones control y en aquellas plantas cultivadas bajo una salinidad de 120 mM a 35°C de temperatura respecto al resto de tratamientos. En el muestreo 2 (fase reproductiva) de la línea RIL-76, los valores más elevados de P se encontraron en las plantas control y en las plantas que crecieron a 35°C bajo el efecto salino de 15 mM de NaCl. En el muestreo 3 (final del experimento) se observó la misma tendencia, y se observó también, que al igual que ocurría en la línea RIL-18, la concentración de P fue mayor en las plantas que se cultivaron a 120 mM de salinidad y 35°C de temperatura.

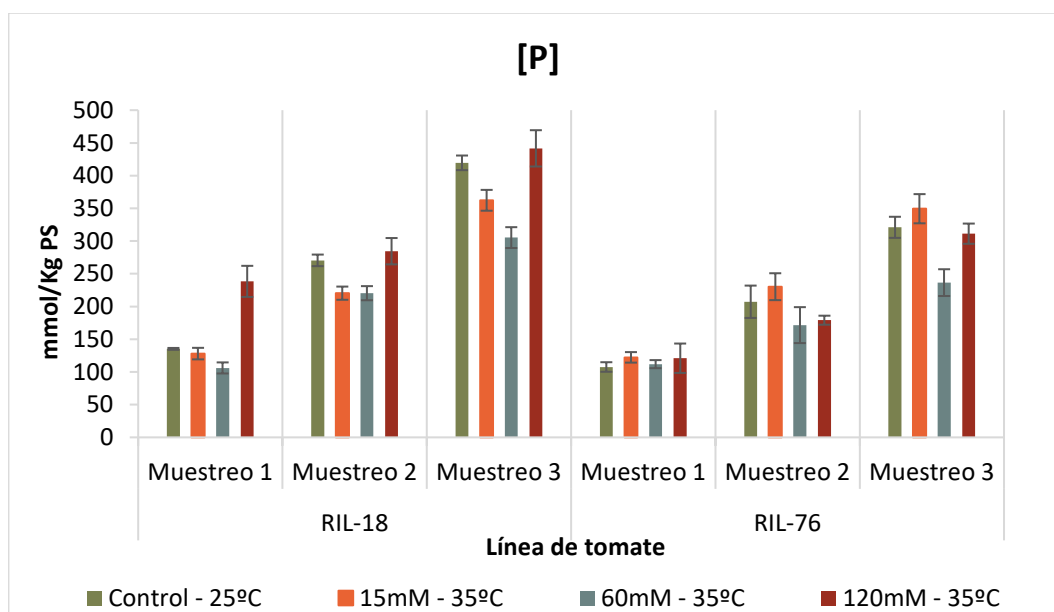


Figura 61: Concentración de P en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25 °C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. La concentración foliar de P está expresada como mmol kg<sup>-1</sup> peso seco. Los datos representan medias ± SE (n = 3) para los muestreos 1 y 2. Para el muestreo 3 (n=10 a 25°C; n = 11 a 15 mM; n=8 a 60 mM; n=4 a 120 mM para la línea 18) (n=11 a 25°C; n = 11 a 15 mM; n=8 a 60 mM; n=8 a 120 mM para la línea 76).

Tabla 15: Estadística de los macronutrientes estudiados en las hojas de las plantas en los distintos estados fenológicos del cultivo. Las estrellas dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD) para los distintos macronutrientes estudiados en cada uno de los muestreos.

	Línea	Ca	K	Na	P
<b>Muestreo 1</b>	RIL-18	**		***	***
<b>Muestreo 1</b>	RIL-76	*	*	***	
<b>Muestreo 2</b>	RIL-18	*	*	***	
<b>Muestreo 2</b>	RIL-76	**	**	***	*
<b>Muestreo 3</b>	RIL-18	***	***	***	**
<b>Muestreo 3</b>	RIL-76	**	***	***	**

### *Micronutrientes*

En ambas líneas recombinantes (RIL-18 y RIL-76), la concentración final de boro (B) en las hojas (Figura 62) experimentó un aumento significativo hacia el final

del experimento (muestreo 3) respecto a los muestreos anteriores en todos los tratamientos aplicados.

En el muestreo 3 de la línea RIL-18, la concentración más elevada de B se presentó en las plantas que crecieron bajo el efecto del tratamiento a 35°C y 15 mM de NaCl comparado con el resto de tratamientos, incluido el control, que a su vez presentaba una concentración de B mayor que el encontrado en los tratamientos a 35°C y donde la salinidad era más elevada (60 mM y 120 mM). En la línea RIL-76 la tendencia fue la misma, pero en este caso, todos los tratamientos de estrés combinado (15 mM, 60 mM y 120 mM de salinidad a 35°C) presentaron mayor concentración de B en las hojas que el tratamiento control.

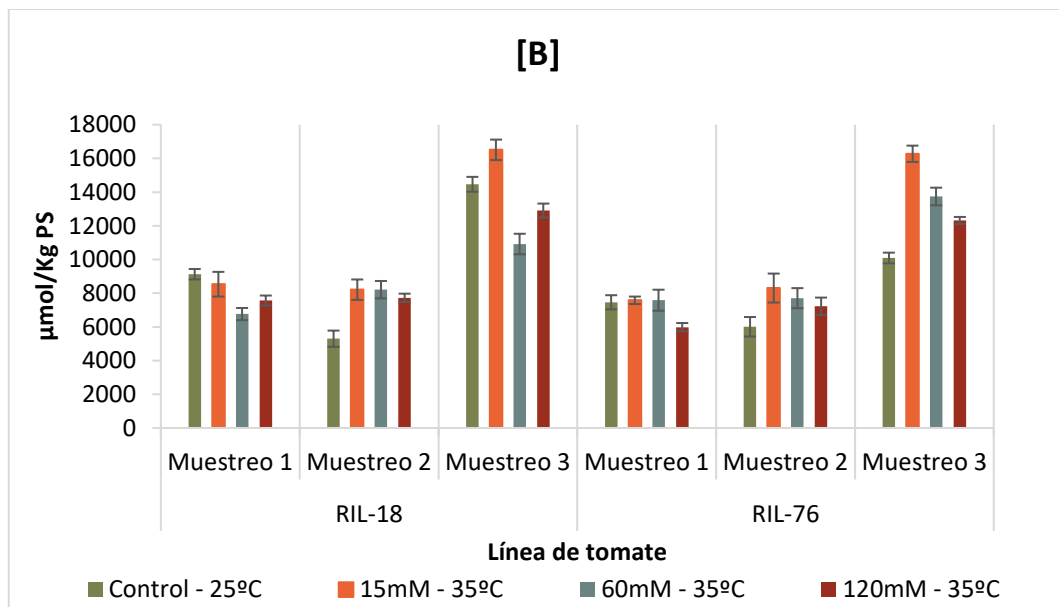


Figura 62: Concentración de B en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25 °C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. La concentración foliar de B está expresada como  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  peso seco. Los datos representan medias  $\pm$  SE ( $n = 3$ ) para los muestreos 1 y 2. Para el muestreo 3 ( $n=10$  a 25°C;  $n = 11$  a 15 mM;  $n=8$  a 60 mM;  $n=4$  a 120 mM para la línea 18) ( $n=11$  a 25°C;  $n = 11$  a 15 mM;  $n=8$  a 60 mM;  $n=8$  a 120 mM para la línea 76).

La concentración de Fe en las hojas fue aumentando progresivamente desde que se realizó el primer muestro hasta el final del experimento (Figura 63). En ambas líneas, al final del ensayo, la concentración de Fe fue mayor en hojas de las

plantas que fueron cultivadas bajo el efecto de la salinidad extrema (120 mM) combinada con la alta temperatura respecto al resto de tratamientos.

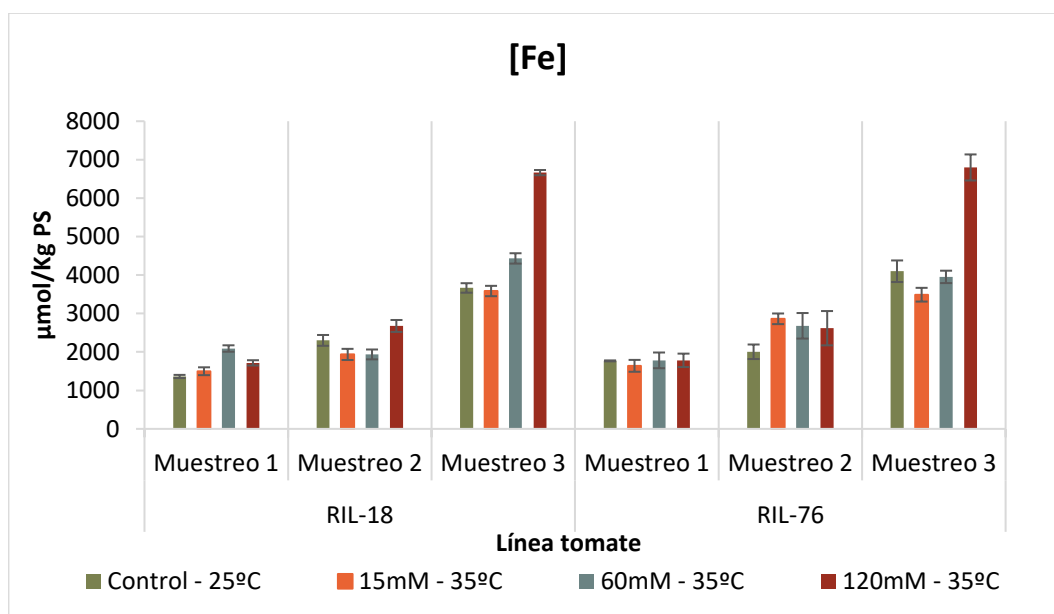


Figura 63: Concentración de Fe en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25 °C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. La concentración foliar de Fe está expresada como  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  peso seco. Los datos representan medias  $\pm$  SE ( $n = 3$ ) para los muestreos 1 y 2. Para el muestreo 3 ( $n=10$  a 25°C;  $n = 11$  a 15 mM;  $n=8$  a 60 mM;  $n=4$  a 120 mM para la línea 18) ( $n=11$  a 25°C;  $n = 11$  a 15 mM;  $n=8$  a 60 mM;  $n=8$  a 120 mM para la línea 76).

La concentración de manganeso (Mn) también aumentó en las hojas de las plantas hacia el final del experimento en ambas líneas: RIL-18 y RIL-76 (Figura 64). En el muestreo 2 (fase reproductiva) de la línea RIL-18, la concentración de Mn se presentó más elevada en las plantas control que en el resto de tratamientos, que no presentaron diferencias significativas entre ellos. En el muestreo 3 (final del experimento), la concentración de Mn aumentó ligeramente en las plantas cultivadas a 35°C con 15 mM de salinidad respecto a las plantas control. Las plantas cultivadas bajo el efecto de los niveles salinos 60 mM y 120 mM presentaron concentraciones de Mn significativamente menores que las plantas control.

En los muestreos 2 y 3 de la línea RIL-76, las plantas cultivadas a 35°C y con distintos niveles de salinidad (15 mM, 60 mM y 120 mM de NaCl) presentaron concentraciones más elevadas de Mn en sus hojas que las plantas control.

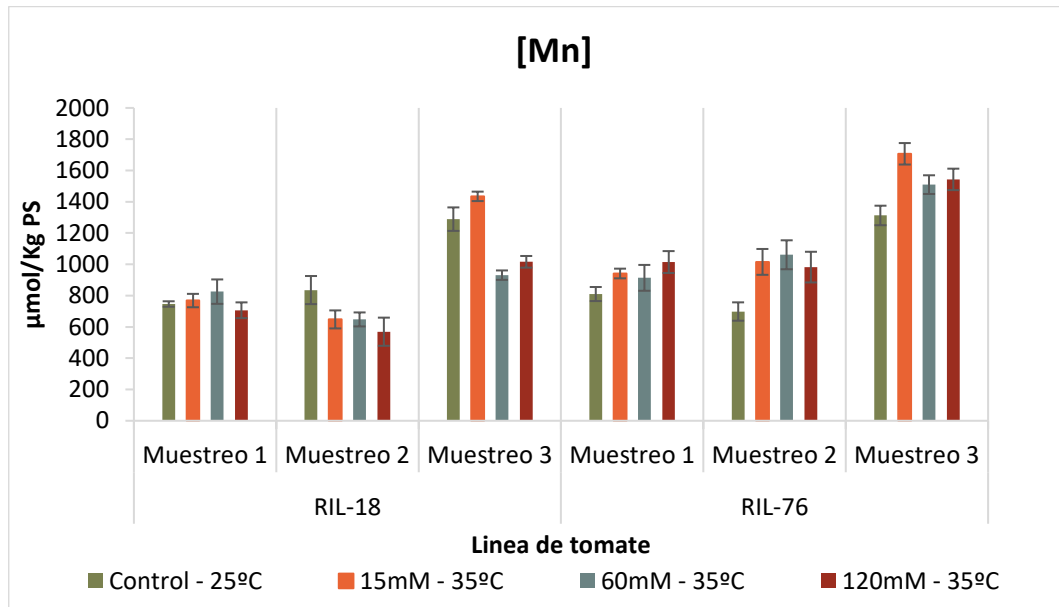


Figura 64: Concentración de Mn en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25°C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. La concentración foliar de Mn está expresada como  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  peso seco. Los datos representan medias  $\pm$  SE ( $n = 3$ ) para los muestreos 1 y 2. Para el muestreo 3 ( $n=10$  a 25°C;  $n = 11$  a 15 mM;  $n=8$  a 60 mM;  $n=4$  a 120 mM para la línea 18) ( $n=11$  a 25°C;  $n = 11$  a 15 mM;  $n=8$  a 60 mM;  $n=8$  a 120 mM para la línea 76).

La concentración de zinc (Zn) en la hoja también fue incrementando hacia el final del experimento, tanto en la línea RIL-18 como en la línea RIL-76. (Figura 65). En ambas líneas recombinantes, las concentraciones más elevadas de Zn se encontraron en las plantas que fueron cultivadas bajo condiciones de estrés de alta temperatura combinada con 120 mM de NaCl respecto al tratamiento control y al esto de tratamientos.

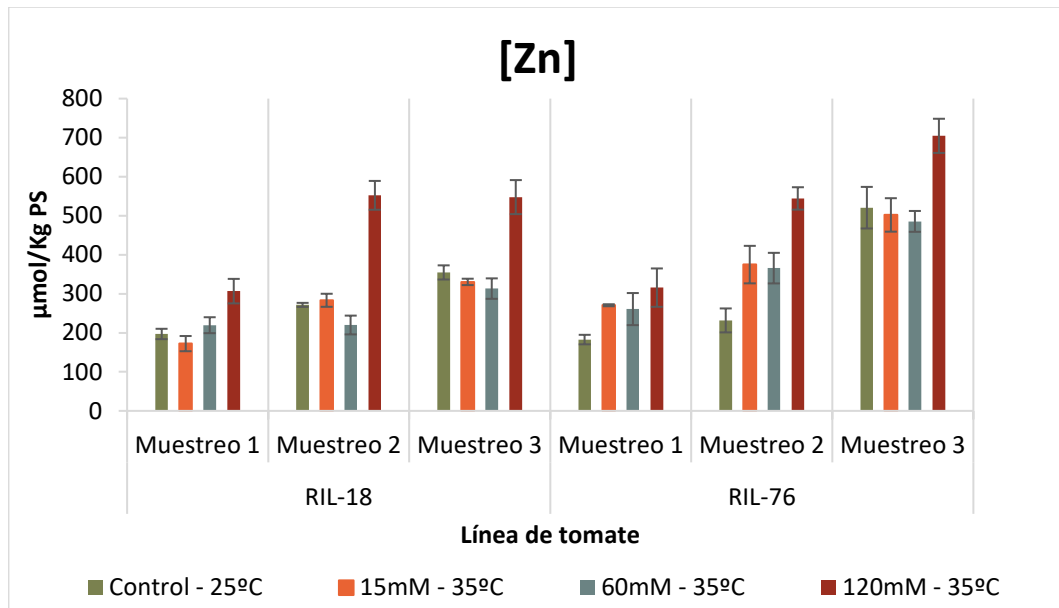


Figura 65: Concentración de Zn en las hojas de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25 °C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. La concentración foliar de Zn está expresada como  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  peso seco. Los datos representan medias  $\pm$  SE ( $n = 3$ ) para los muestreos 1 y 2. Para el muestreo 3 ( $n=10$  a 25°C;  $n = 11$  a 15 mM;  $n=8$  a 60 mM;  $n=4$  a 120 mM para la línea 18) ( $n=11$  a 25°C;  $n = 11$  a 15 mM;  $n=8$  a 60 mM;  $n=8$  a 120 mM para la línea 76).

Tabla 16: Estadística de los micronutrientes estudiados en las hojas de las plantas en los distintos estados fenológicos del cultivo. Las estrellas dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD) para los distintos micronutrientes estudiados en cada uno de los muestreos.

	Línea	B	Fe	Mn	Zn
Muestreo 1	RIL-18	*	**		*
Muestreo 1	RIL-76				*
Muestreo 2	RIL-18	*	**	**	***
Muestreo 2	RIL-76	*	*	*	**
Muestreo 3	RIL-18	***	***	***	*
Muestreo 3	RIL-76	***	***	**	*

#### 5.4.4. Parámetros fotosintéticos

Durante la consecución de este experimento, y, en concreto, 5 semanas después de comenzar los distintos tratamientos, se llevó a cabo la determinación



de los distintos parámetros fotosintéticos en las dos líneas recombinantes de tomate de interés. Estos parámetros fueron: asimilación de CO<sub>2</sub>, conductancia estomática y transpiración.

#### *Asimilación de CO<sub>2</sub>*

Un aumento de temperatura de 25°C a 35°C no causó diferencias significativas en la asimilación de CO<sub>2</sub> (Figura 66), aunque sí se observó un ligero incremento de este parámetro. A 25°C, las plantas de la línea RIL-18 tuvieron una mayor tasa fotosintética que las plantas de la línea RIL-76 de este mismo tratamiento.

En la línea RIL-18 se observó que a 60 mM de NaCl, la tasa fotosintética disminuía respecto al control y a las tratadas con 15 mM o 120 mM de NaCl, que no obtuvieron diferencias significativas entre ellas. En la línea RIL-76, la asimilación de CO<sub>2</sub> disminuyó conforme incrementaba el nivel salino de los tratamientos, aunque no se encontraron diferencias significativas entre el control y las plantas cultivadas a 35°C con 15 mM y 60 mM de NaCl.

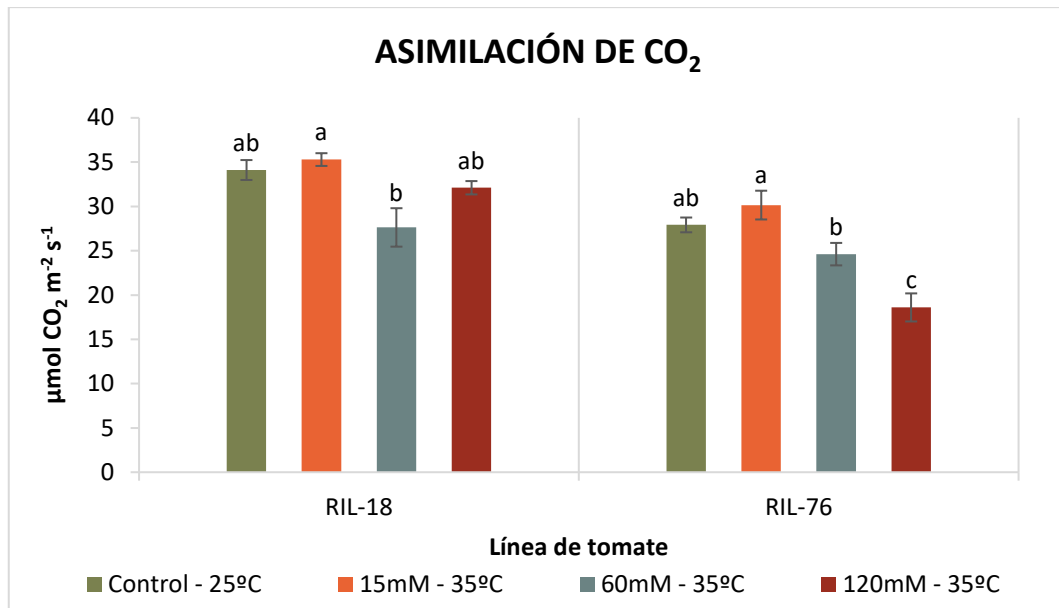


Figura 66: Asimilación de CO<sub>2</sub> de las plantas de tomate de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. La asimilación de CO<sub>2</sub> está expresada en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=4). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

### *Conductancia estomática*

En el caso de la conductancia estomática, no se encontraron diferencias significativas entre las plantas de los distintos tratamientos de la línea RIL-18 (Figura 67). En cambio, en la línea RIL-76, se observó que la conductancia estomática disminuyó significativamente en las plantas que crecieron a 35°C de temperatura con una salinidad de 120 mM respecto a las plantas control y al resto de tratamientos.

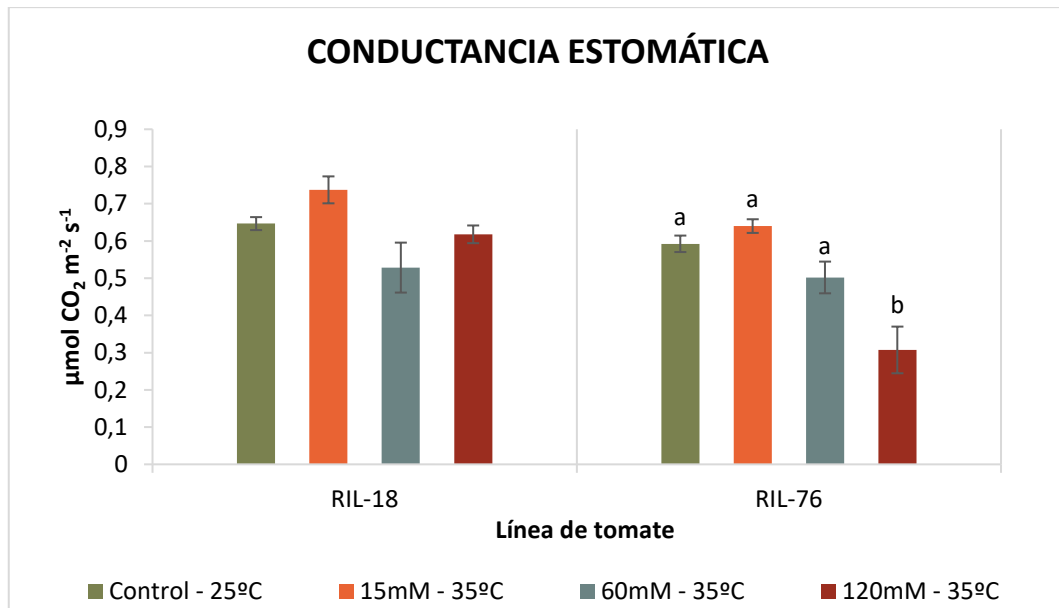


Figura 67: Conductancia estomática de las plantas de tomate de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. La asimilación de CO<sub>2</sub> está expresada en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=4). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

### *Índice de transpiración*

Al estudiar la transpiración de las plantas de las líneas RIL-18 y RIL-76, como ocurría con la conductancia estomática, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos de la línea RIL-18 (Figura 68). El índice de transpiración de las plantas de la línea RIL-76 también tuvo un comportamiento similar al descrito para la conductancia estomática de estas plantas. Los valores más bajos se encontraron en las plantas que crecieron bajo el estrés combinado de 35°C y 120 mM de NaCl, respecto al tratamiento control y respecto al resto de tratamientos.

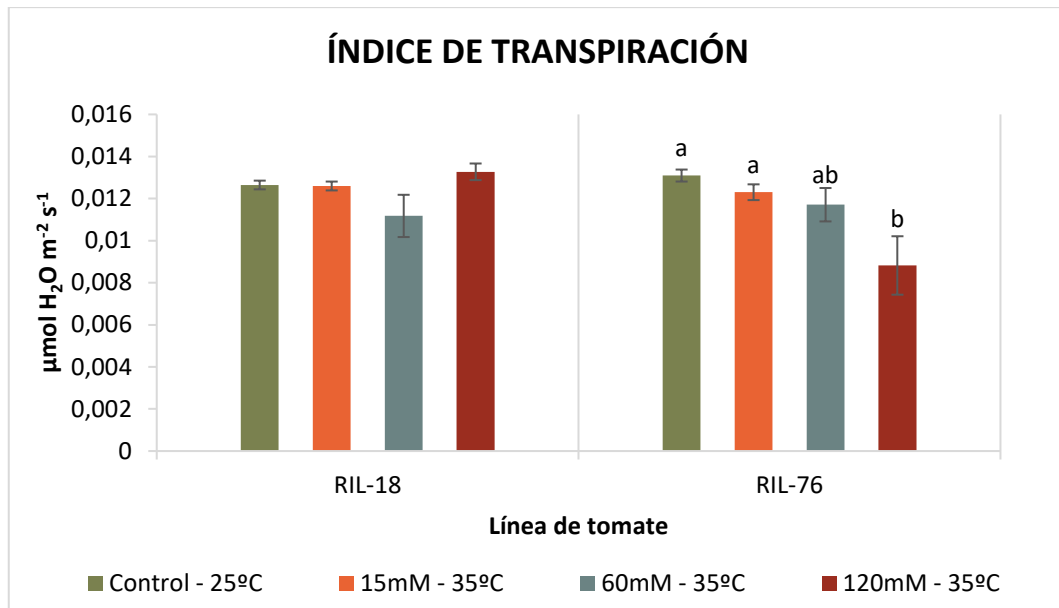


Figura 68: Tasa de transpiración de las plantas de tomate de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. La tasa de transpiración está expresada en  $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=4). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

#### 5.4.5. Producción del fruto de tomate

Los datos de producción de tomate total fueron recogidos durante toda la fase reproductiva de la planta (Figura 69). Teniendo en cuenta que, bajo los tratamientos de salinidad más altos, la supervivencia de las plantas correspondientes a la línea RIL-18 fue significativamente menor que las de la línea RIL-76, es lógico tener presente que la producción obtenida bajo estos tratamientos también fue significativamente diferente, aunque los datos se presentan siempre en gramos de fruto obtenidos por planta.

En general, la producción de frutos de tomate fue más alta en las plantas de la línea RIL-76 que la línea RIL-18. En ambas líneas, la producción de fruto de tomate fue mayor en las plantas que crecieron en condiciones óptimas de cultivo que en las plantas a las que se aplicó el estrés combinado de salinidad, a distintos niveles, y alta temperatura.

A 35°C, las plantas que crecieron con una salinidad de 15 mM presentaron una cosecha significativamente más baja que las plantas control en ambas líneas, aunque ese descenso fue más acusado en la línea RIL-18, con una disminución de la producción de más del 30% frente al 15% de disminución de la línea RIL-76.

Los tratamientos de 60 mM y 120 mM de NaCl, combinados con la alta temperatura, redujeron drásticamente la cosecha respecto a las plantas control en ambas líneas, siendo de nuevo más acusado en la línea RIL-18, con una pérdida de la producción del 80% frente al 75% de pérdidas de la línea RIL-76. Entre estos tratamientos no se encontraron diferencias significativas en la producción final de las plantas.

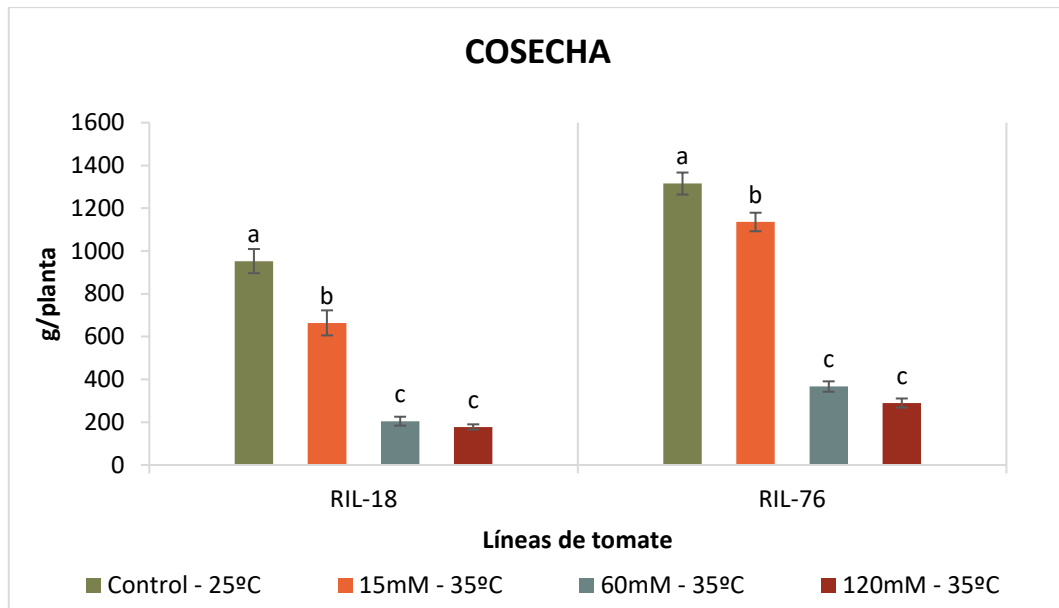


Figura 69: Producción de tomate de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=10 a 25°C; n=11 a 15mM; n=8 a 60 mM; n=4 a 120 mM para la línea 18) (n=11 a 25°C; n = 11 a 15 mM; n=8 a 60 mM; n=8 a 120 mM para la línea 76). La producción de tomate está expresada en g/planta. Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

Al estudiar la producción de tomate, también se estudió la biomasa total de las plantas calculada a partir del peso fresco de la parte aérea, y la producción total recogida tras la fase reproductiva (Figura 70).

La biomasa total fue mayor en las plantas de la línea RIL-76, tanto a 25°C como a 35°C, respecto a las plantas de la línea RIL-18, bajo los distintos tratamientos. En ambas líneas, no se encontraron diferencias significativas en la biomasa total entre las plantas control y las plantas cultivadas a 35°C con una salinidad de 15 mM. En la línea RIL-18, la biomasa total disminuyó en las plantas sometidas al estrés combinado de alta temperatura y los niveles salinos de 60 mM y 120 mM respecto a las plantas control, y no se apreciaron diferencias significativas entre las plantas de dichos tratamientos, aunque las plantas cultivadas a 120mM de salinidad mostraron un ligero descenso respecto a las cultivadas con un nivel salino de 60 mM.

La línea RIL-76 se comportó de manera similar a la línea RIL-18, ya que las plantas cultivadas bajo los efectos de la alta temperatura junto con una salinidad de 15 mM disminuyeron significativamente su biomasa total respecto a las plantas cultivadas en condiciones óptimas. También se observó un descenso en la biomasa de las plantas cultivadas a 35°C con una salinidad de 60 mM y 120 mM de NaCl respecto a las plantas control, que fue significativamente más acusado en las plantas a las que se les aplicó una salinidad del 120 mM de NaCl.

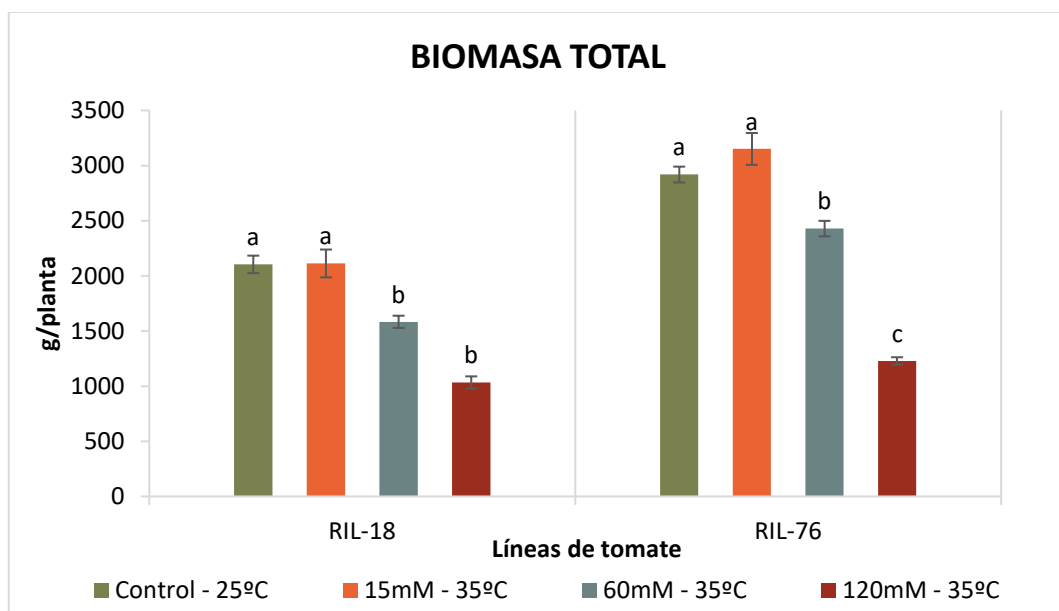


Figura 70: Biomasa total (parte aérea + producción) de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=10 a 25°C; n=11 a 15 mM; n=8 a 60 mM; n=4 a 120 mM para la línea 18) (n=11 a 25°C; n = 11 a 15 mM; n=8 a 60 mM; n=8 a 120 mM para la línea 76). La producción de tomate está expresada en g/planta. Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

#### 5.4.6. Parámetros de calidad de los frutos

Conforme se fueron recolectando los frutos de las plantas de tomate de las líneas seleccionadas RIL-18 y RIL-76, se realizó un estudio de calidad, en el que se determinaron parámetros físicos, como el peso del fruto o el tamaño, y parámetros químicos, como la conductividad eléctrica, los azúcares solubles, el pH, y la acidez del fruto.

##### *Peso del fruto*

Al determinar el peso de los frutos seleccionados para tenerlos en cuenta dentro de los parámetros de calidad evaluados, éstos fueron similares para ambas líneas recombinantes (Figura 71). Tanto en la línea RIL-18 como en la RIL-76, los frutos de tomate más grandes se encontraron en las plantas que crecieron bajo condiciones óptimas de cultivo (control). Cuando las plantas crecieron bajo el efecto de la alta temperatura y la salinidad, el peso del fruto fue disminuyendo y éste iba siendo menor conforme aumentaba el estrés salino, desde 15 mM a 120 mM de NaCl. Entre las plantas cultivadas bajo el efecto de la combinación de estreses (35°C y 60 mM o 120 mM de NaCl) no se encontraron diferencias significativas en el peso de sus frutos.



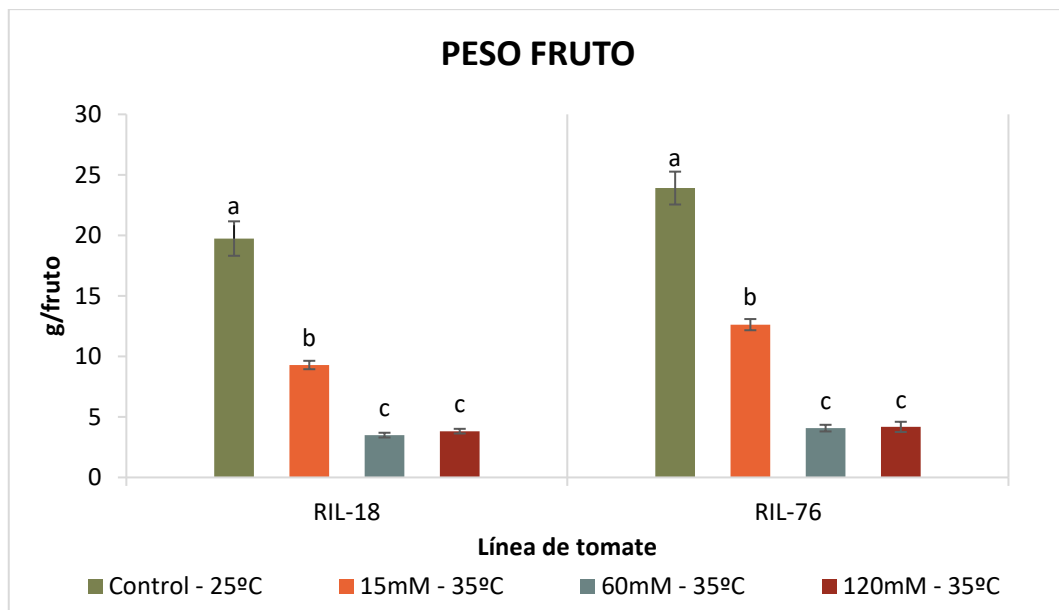


Figura 71: Promedio del peso de los frutos de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. El peso del fruto está expresado en gramos. Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=6). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

### Tamaño

Se midieron los diámetros longitudinal y ecuatorial (Figura 72 y Figura 73 respectivamente), de los frutos recolectados en ambas líneas recombinantes, llegándose a la conclusión de que los frutos de las plantas cultivadas a 25°C tenían un mayor tamaño que los de las plantas cultivadas a 35°C.

En la línea RIL-18, el diámetro longitudinal no presentó diferencias significativas entre los frutos de los distintos tratamientos de las plantas que fueron cultivadas a 35°C y diferentes dosis de NaCl (15 mM, 60 mM y 120 mM). Los frutos de las plantas cultivadas a 35°C de la línea RIL-76, en cambio, mostraron un mayor diámetro cuando eran cultivados con una salinidad de 15 mM que aquellos recolectados de plantas que se cultivaron con 60 mM y 120 mM de NaCl.

El diámetro ecuatorial de los frutos de las plantas cultivadas a 35°C de ambas líneas, también fue significativamente mayor en las plantas que crecieron con 15 mM que las que crecieron con 60 mM y 120 mM de NaCl.

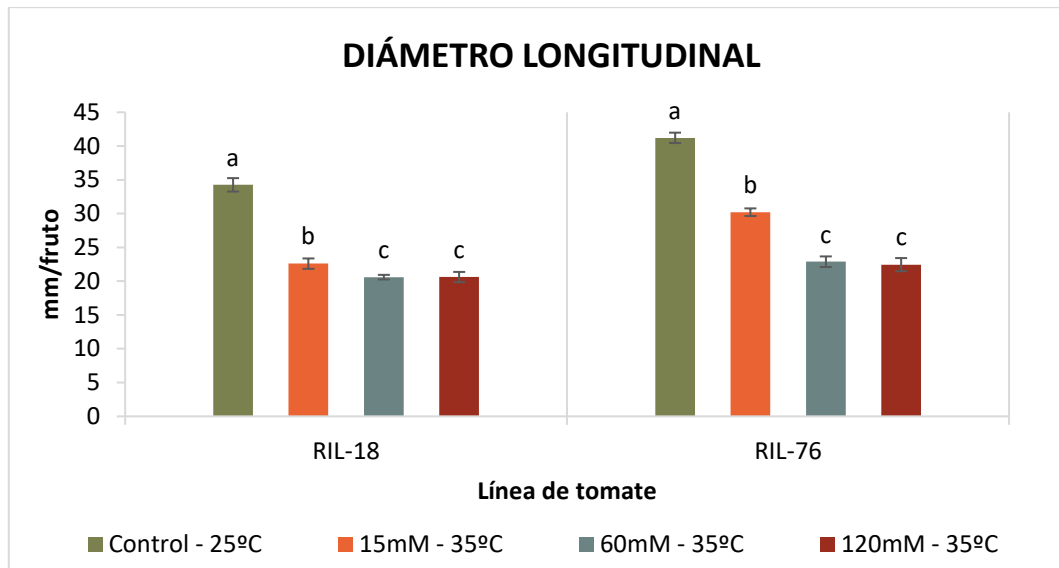


Figura 72: Promedio del diámetro longitudinal de los frutos de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. El diámetro longitudinal está expresado en milímetros. Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=6). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

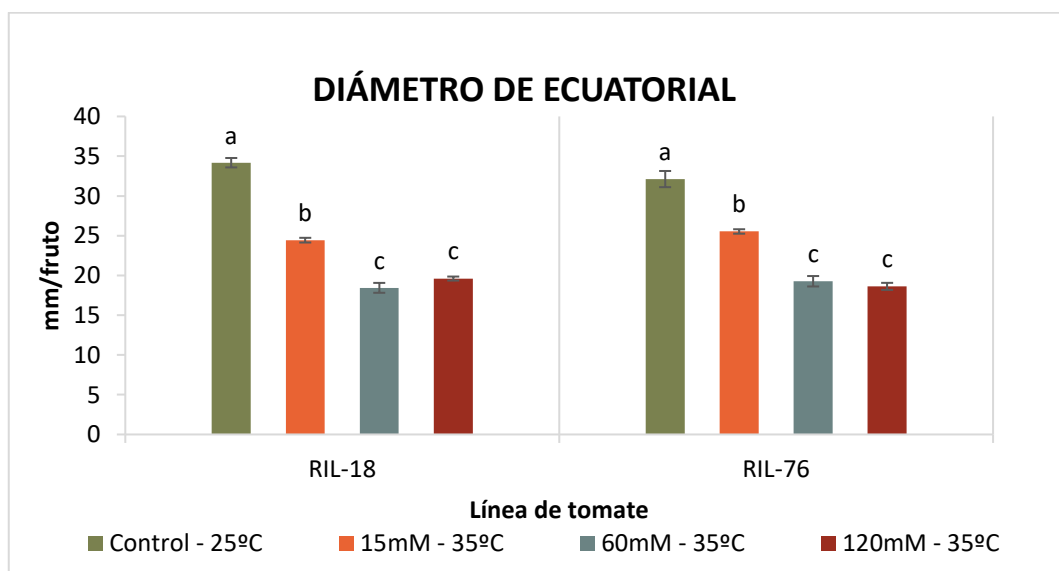


Figura 73: Promedio del diámetro ecuatorial de los frutos de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. El diámetro ecuatorial está expresado en milímetros. Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=6). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

*Determinación de la conductividad eléctrica (CE) en frutos*

Se determinó la CE del zumo resultante de los tomates recolectados anteriormente, y se observó que un incremento en la temperatura de crecimiento de las plantas aumentó significativamente la CE del zumo de tomate, tanto en la línea RIL-18 como en la RIL-76 (Figura 74).

Los frutos de las plantas de la línea RIL-18 que crecieron bajo el efecto de la alta temperatura y los niveles salinos de 60 mM Y 120 mM, presentaron una CE significativamente más alta que los frutos control y que los frutos cultivados a 35°C con 15 mM de NaCl.

En la línea RIL-76, la CE más alta se dio en los frutos cultivados bajo la combinación de estreses a 35°C y 120 mM de NaCl, la cual fue significativamente mayor que la encontrados en el resto de tratamientos.

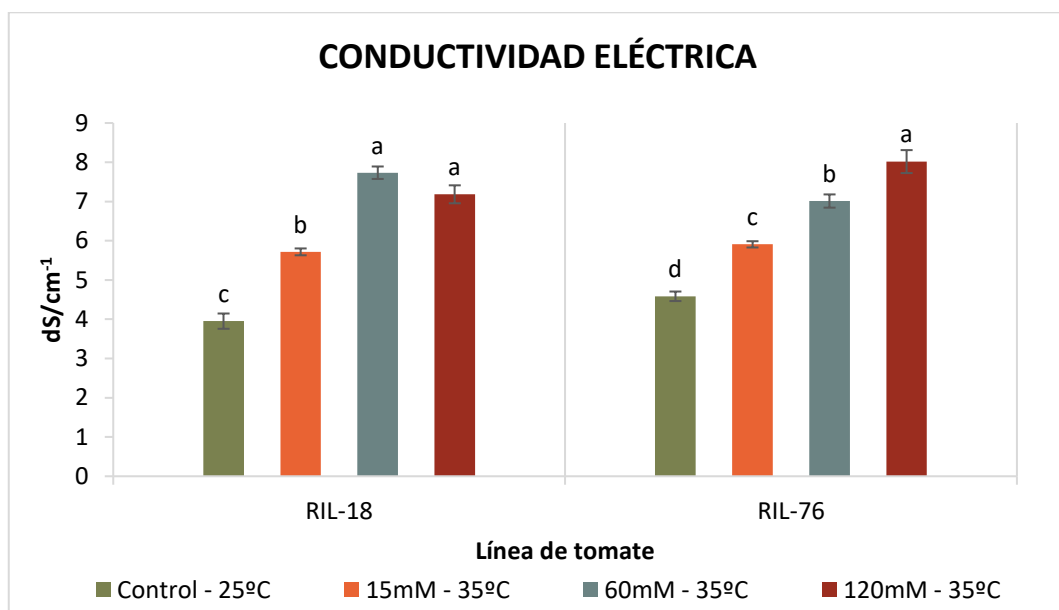


Figura 74: Conductividad eléctrica de los frutos de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. La conductividad eléctrica está expresada en  $\text{ds}/\text{s}^{-1}$ . Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=6). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

### *Determinación de grados °Brix*

Al igual que ocurría con la CE, la determinación de °Brix en el zumo de los frutos estudiados reveló un aumento de la concentración de azúcares en los frutos de las plantas cultivadas a 35°C respecto a los de las plantas cultivadas a 25°C, que fue aumentando conforme aumentaba el nivel salino al que estaban sometidas las plantas en ambas líneas (Figura 75). Tanto en línea RIL-18 como en la RIL-76, los grados °Brix fueron significativamente más altos en los frutos de las plantas que crecieron bajo el efecto de la alta temperatura y los niveles salinos 60 mM y 120 mM, que no presentaron diferencias significativas entre ellos.

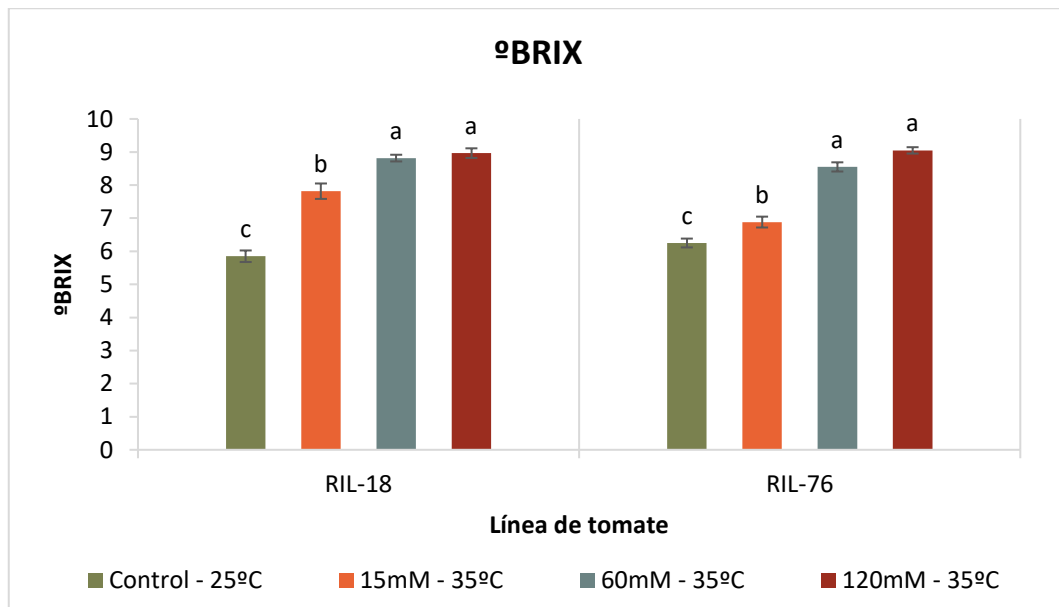


Figura 75: °Brix de los frutos de las líneas 18 y en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=6). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

### *Determinación de pH*

Se determinó el pH en el zumo del tomate en las líneas RIL-18 y RIL-76 y se observó que, a 35°C en ambas líneas, el pH de los frutos estudiados disminuía conforme aumentaba el estrés salino al que estaban sometidas las plantas (Figura 76).

En la línea RIL-18, no se encontraron diferencias significativas entre las plantas control y las plantas cultivadas a 35°C con 15 mM de NaCl. Los valores más bajos de pH se encontraron en las plantas cultivadas con 120 mM de salinidad y 35°C de temperatura, siendo estos valores significativamente menores que en el resto de tratamientos.

En la línea RIL-76, no se encontraron diferencias significativas entre las plantas control y las plantas cultivadas a 35°C bajo los niveles salinos 15 mM y 60 mM de NaCl, aunque sí se apreciaba un ligero descenso en estas últimas. Los valores más bajos, al igual que ocurría en la línea RIL-18, se encontraron en los frutos de las plantas cultivadas con 120 mM de NaCl.

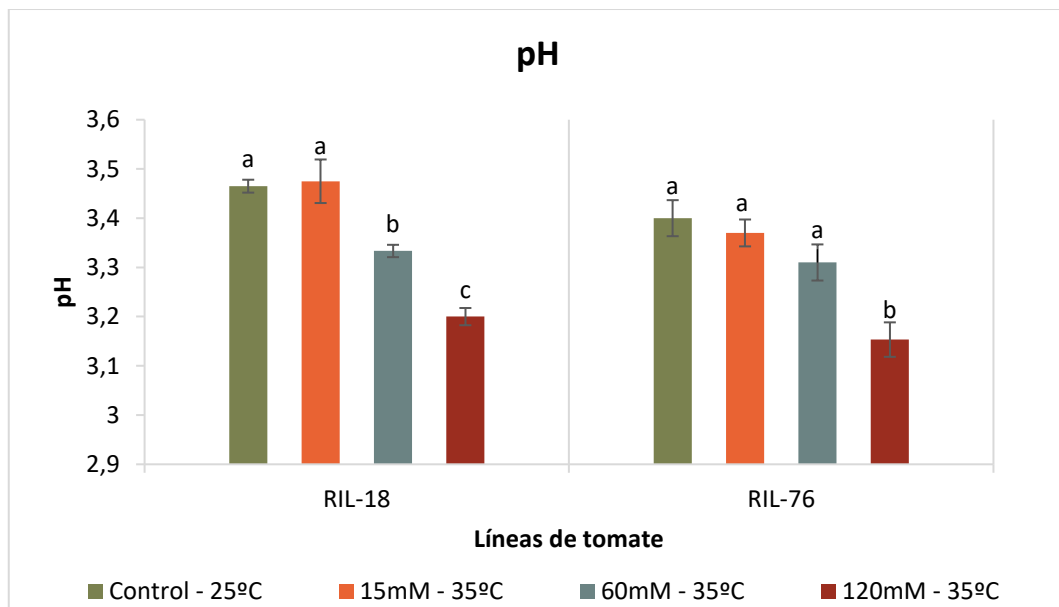


Figura 76: pH de los frutos de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=6). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

#### *Determinación de la acidez valorable*

Al determinar la acidez del zumo de tomate de los frutos estudiados mediante la valoración con NaOH, se observó que, a 35°C, en ambas líneas la acidez de los frutos aumentaba conforme aumentaba el nivel del estrés salino al que estaban sometidas las plantas Figura 77.

Tanto en la línea RIL-18 como en la línea RIL-76, no se encontraron diferencias significativas entre en la acidez de los frutos de las plantas cultivadas a 25°C y las cultivadas a 35°C bajo una salinidad de 15 mM de NaCl. Los valores más altos de acidez se encontraron en las plantas cultivadas bajo los estreses combinados de alta temperatura y 120 mM de NaCl.

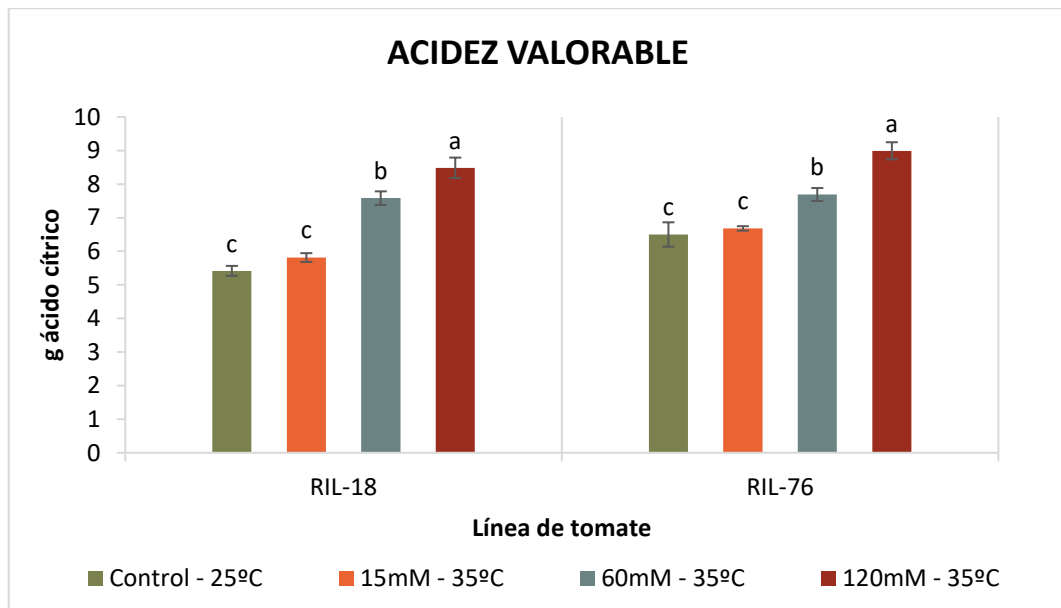


Figura 77: Acidez del fruto de las líneas RIL-18 y RIL-76 en los tratamientos control a 25°C y distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. La acidez del fruto está expresada en gramos de ácido cítrico. Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=6). Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

### *Estado nutricional del fruto*

Una vez determinados los parámetros de calidad de los frutos, se procedió estudiar el estado nutricional de los mismos, determinándose la concentración de los macronutrientes  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ .

En la línea RIL-18 (Figura 78), la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el fruto fue mayor en las plantas cultivadas a 35°C bajo el efecto de los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM de NaCl) que en el tratamiento control. Además, estos tratamientos no presentaron diferencias significativas entre ellos.

En la línea RIL-76 el comportamiento fue similar al descrito anteriormente, salvo que los frutos de las plantas cultivadas bajo condiciones de salinidad y temperatura extrema (120 mM y 35°C) obtuvieron valores semejantes de  $\text{Ca}^{2+}$  al encontrado en las plantas control.

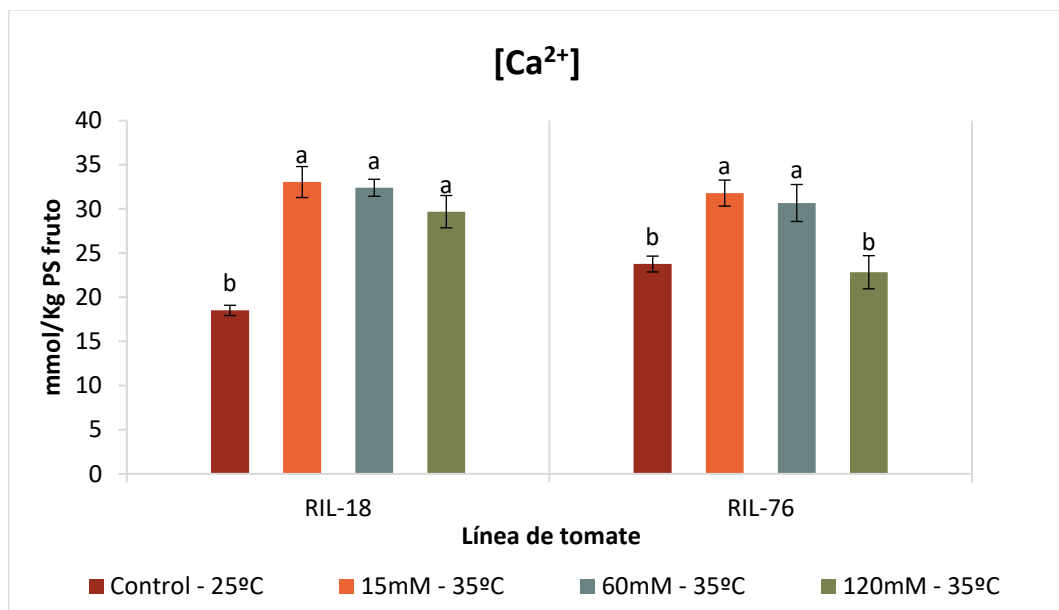


Figura 78: Concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en los frutos de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25 °C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. La concentración está expresada como mmol  $\text{kg}^{-1}$  peso seco. Los datos representan medias  $\pm$  SE (n=6) Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  (Tukey HSD).

Al estudiar la concentración de  $\text{K}^+$  en el fruto de la línea RIL-18 (Figura 79), se observó que los valores de este catión eran significativamente menores a 35°C con respecto a las plantas control..

En la línea RIL-76, las concentraciones más altas de  $\text{K}^+$  se encontraron en los frutos de las plantas cultivadas a 35°C bajo el efecto salino de 15 mM de NaCl, aunque sin diferencias significativas respecto a los frutos del tratamiento control.

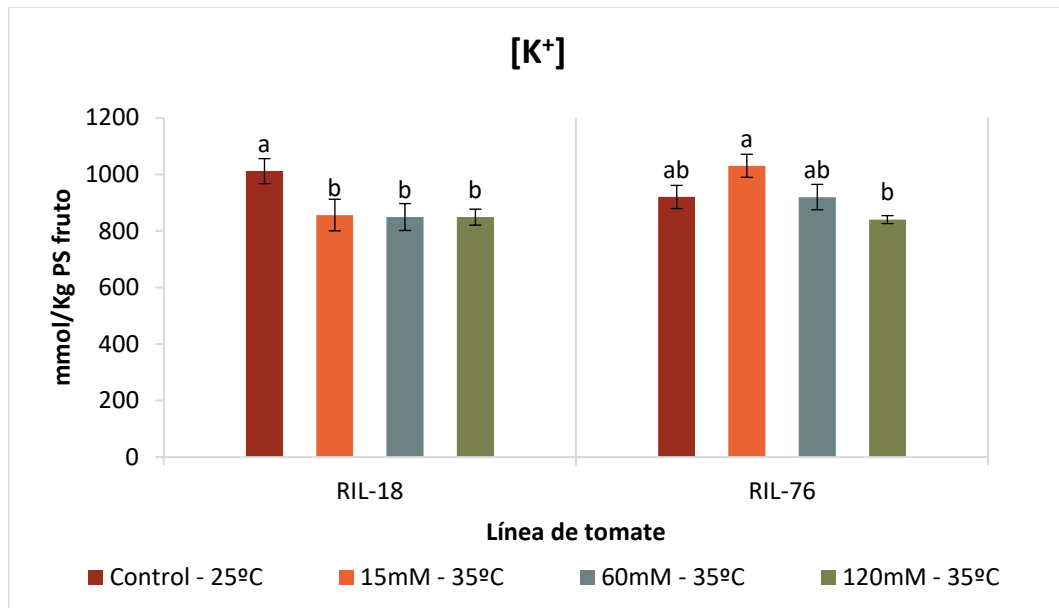


Figura 79: Concentración de K<sup>+</sup> en los frutos de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25 °C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. La concentración está expresada como mmol kg<sup>-1</sup> peso seco. Los datos representan medias ± SE (n=6) Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a p ≤ 0.05 (Tukey HSD).

La Figura 80 muestra la concentración de Mg<sup>2+</sup> en frutos de ambas líneas recombinantes. En la línea RIL-18, no se observaron diferencias significativas en la concentración de Mg<sup>2+</sup> obtenida en frutos entre los distintos tratamientos, aunque se aprecia un ligero descenso en esta concentración en los frutos de plantas cultivadas a 35°C respecto a las plantas control.

En la línea RIL-76, la concentración de Mg<sup>2+</sup> fue mayor en los frutos de las plantas que crecieron bajo el efecto de la alta temperatura y 15 mM de salinidad que en el resto de tratamientos, incluido el control.



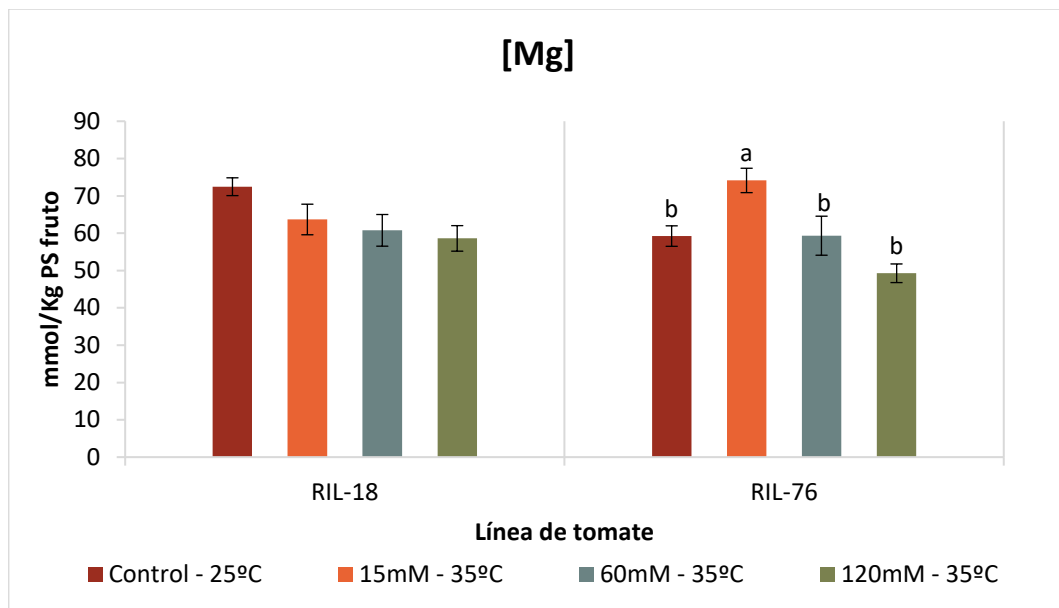


Figura 80: Concentración de Mg<sup>2+</sup> en los frutos de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25 °C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. La concentración está expresada como mmol kg<sup>-1</sup> peso seco. Los datos representan medias ± SE (n=6) Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a p ≤ 0.05 (Tukey HSD).

Al estudiar la concentración de Na<sup>+</sup> (Figura 81), se observó que en la línea RIL-18 la concentración de Na<sup>+</sup> fue aumentando conforme aumentaban los niveles salinos a los que estaban sometidas las plantas a 35°C. Los valores más altos de Na<sup>+</sup> se encontraron en los frutos de las plantas cultivadas a 120 mM bajo condiciones de alta temperatura. Entre las plantas control y las plantas cultivadas a 35°C con 15 mM de NaCl no se encontraron diferencias significativas en la concentración de este catión.

Los frutos de las plantas de la línea RIL-76 cultivadas a 35°C bajo los niveles salinos de 60 mM y 120 mM presentaron concentraciones de Na<sup>+</sup> semejantes, los cuales fueron significativamente mayores que las obtenidas en las plantas control. Al igual que ocurría en la línea RIL-18, entre las plantas control y las plantas cultivadas a 35°C con 15 mM de NaCl no se encontraron diferencias significativas.

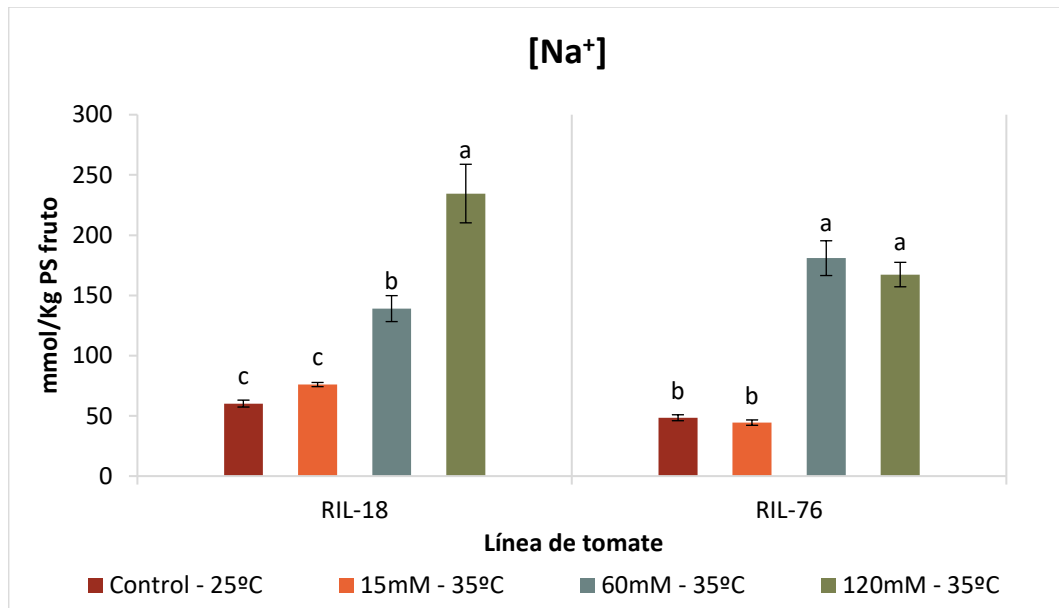


Figura 81: Concentración de Na<sup>+</sup> en los frutos de las distintas líneas de tomate en los tratamientos control a 25 °C y los distintos niveles salinos (15 mM, 60 mM y 120 mM) a 35°C. La concentración está expresada como mmol kg<sup>-1</sup> peso seco. Los datos representan medias ± SE (n=6) Las barras con letras diferentes dentro de cada panel representan datos con diferencias significativas a p ≤ 0.05 (Tukey HSD).

#### 5.4.7. Discusión

Las regiones semiáridas de todo mundo, como es el caso del arco mediterráneo, sufren de escasez de agua de buena calidad, lo que fomenta el uso de agua salina de los acuíferos para riego, que contienen concentraciones excesivas de sales solubles, principalmente cloruros (3-6 dS m<sup>-1</sup>) (Fernandez-Garcia y col., 2004). En estas zonas, además, la influencia del estrés salino se ve agravada en la mayoría de las ocasiones por la acción simultánea de otros factores, como temperaturas elevadas por prolongados periodos de tiempo, lo que hace que los daños producidos por estos estreses combinados en el rendimiento de los cultivos sean más devastadoras que cuando los estreses se dan por separado (Mittler, 2006). Las plantas de tomate se consideran moderadamente sensibles a la salinidad, ya que el crecimiento y el rendimiento del cultivo comienzan a disminuir cuando la conductividad eléctrica de la solución nutritiva con la que se riega supera los 2.5–4.0 dS m<sup>-1</sup> (Rosadi y col., 2014). Este nivel de salinidad mejora la calidad de los frutos, dado que las células tienden a acumular

sólidos solubles totales y compuestos antioxidantes en mayor medida para hacer frente a estas condiciones de estrés (Rodríguez-Ortega y col., 2019). Es por ello que para la consecución de este experimento, las plantas control fueron irrigadas con solución nutritiva Hoagland completa (Tabla 5 y

Tabla 6) preparada a partir de agua desionizada y 15 mM de NaCl, lo que no comprometía el desarrollo vegetativo de las plantas y aumentaba la calidad de los frutos.

Como se ha relatado anteriormente, las plantas responden a la alta temperatura o a ambientes salinos a través de múltiples mecanismos fisiológicos, metabólicos y moleculares. Estos mecanismos están interconectados para crear respuestas específicas que conduzcan a la aclimatación de la planta a ambientes extremos (Conde y col., 2011). Además, el estrés combinado puede afectar de manera diferente a las plantas dependiendo del estado de desarrollo en el que se encuentren. La germinación, el crecimiento vegetativo, la floración o la reproducción pueden ser afectadas de manera diferente ante el mismo estrés, y, por otro lado, puede afectar también de manera diferente a los distintos tejidos que componen la planta (Mittler, 2006; Rivero y col., 2019).

Al analizar los resultados obtenidos, se observó que una exposición prolongada a 60 mM de NaCl (durante los 4 meses que duró el experimento), mermó el número de plantas de plantas en un 33% en ambas líneas RIL-76 y RIL-18 (Figura 55), y que a 120 mM de NaCl, sobrevivieron un 33% más de plantas de la línea RIL-76, considerada como la línea tolerante, que de la línea RIL-18, considerada como la línea sensible. Estos datos contrastan con los experimentos anteriores, en los que no se perdió ninguna planta durante la consecución de los distintos ensayos. El primer efecto que puede observarse de la salinidad en las plantas es el "efecto osmótico", ya que las raíces están expuestas al exceso de sal en el medio de crecimiento, lo que limita la absorción de agua, creando un déficit de agua en la planta con efectos negativos en el crecimiento. A medida que aumenta el tiempo de exposición a la sal, las plantas comienzan a sufrir fitotoxicidad iónica, debido a la acumulación de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  en las células vegetales, y a los desequilibrios nutricionales que esta acumulación conlleva, ya que también se inhibe la absorción

de algunos nutrientes (Flores y col., 2016; Oztekin y Tuzel, 2011; Zhang y col., 2017). Es probable, por lo tanto, que, en las plantas de los anteriores experimentos, que estaban expuestas durante periodos más cortos de tiempo a la salinidad (21 y 15 días en los experimentos del Capítulo 2, y 7 días en el Capítulo 3), no llegara a producirse la “fase de agotamiento” del estrés como ha ocurrido en este experimento. Este efecto, en cambio, sí se habría producido en las plantas que se perdieron durante este experimento, provocando daños en los procesos fisiológicos y metabólicos como la fotosíntesis, la respiración, la división celular y la síntesis de ROS. Durante las condiciones ideales de crecimiento, el sistema antioxidante de la planta controla firmemente la producción y utilización de ROS (Hameed y col., 2013), lo que reduce considerablemente el daño oxidativo gracias a la acción de las enzimas que participan en dicho sistema (Gapinska y col., 2008). Es probable, por lo tanto, que la exposición de las plantas durante un tiempo prolongado al estrés haya terminado agotando al sistema antioxidante celular, provocando la acumulación masiva de ROS, lo que finalmente provocó una disminución en el crecimiento vegetativo y en el rendimiento (Tuna, 2014), y, en casos extremos, la muerte en las plantas (Zizkova y col., 2015).

No obstante, el índice de supervivencia (Figura 55) de las dos líneas seleccionadas volvió a corroborar que la línea RIL-76 seguía siendo la más tolerante, puesto que un mayor número de plantas sobrevivió a la combinación de estreses, y, además, las plantas que sobrevivieron presentaron un mayor desarrollo vegetativo que las de la línea RIL-18 cultivadas bajo las mismas condiciones (Figura 56 y Figura 57). Por lo tanto, se confirma la teoría expuesta en el Capítulo 2, donde se mencionaba que, en base a los resultados obtenidos, es probable que la RIL-76 haya heredado los genes involucrados en la respuesta al estrés extremo que provienen del parental silvestre (*S. pimpinellifolium* L) y que no están presentes en la variedad comercial (*S. lycopersicum* L.) (Razali y col., 2018).

En cuando al crecimiento de las plantas, ambas líneas RILs presentaron distintos comportamientos en los dos muestreos que se hicieron a diferentes estados fenológicos. En estado vegetativo, la alta temperatura incrementó el crecimiento de la línea RIL-18 (Figura 56), pero no el de la línea RIL-76 (Figura 56). Los estreses combinados de alta temperatura y salinidad a 60 mM y 120 mM de NaCl, en cambio, redujeron el crecimiento de las plantas en ambas líneas

recombinantes. En el segundo muestreo (Figura 57), cuando las plantas ya habían alcanzado el estado reproductivo, se observó que tanto la alta temperatura como el estrés combinado de alta temperatura y 60 mM de NaCl habían incrementado el crecimiento de las plantas, y, por el contrario, una salinidad de 120 mM de NaCl redujo considerablemente el peso fresco de las plantas. De nuevo se comprueba que el efecto de la sensibilidad o la tolerancia a condiciones salinas puede diferir según el medio de cultivo, el grado de salinidad usada y la etapa de crecimiento de la planta seleccionada para aplicar dichos estreses (Mittler, 2006). Por otro lado cabe señalar que la exposición de la planta a altas temperaturas puede acelerar la tasa de desarrollo fenológico de las mismas (Hatfield y Prueger, 2015).

Sorprendentemente, en los experimentos anteriores, el crecimiento de las plantas expuestas al efecto de la combinación de estreses (75 mM de salinidad y alta temperatura) nunca había superado el de las plantas control, por lo que es posible que las plantas de ambas líneas sean capaces de tolerar un máximo de salinidad comprendido entre los 60 mM aplicados en este experimento, y los 75 mM aplicado en los experimentos anteriores, ya que, a 120 mM, la reducción del crecimiento de las plantas sí fue considerable. En este sentido, se demuestra que el parental silvestre, *S. pimpinellifolium* L., de las líneas RILs estudiadas, podría contener genes con un gran potencial de tolerancia a la salinidad (Hernandez, 2019) y que las líneas estudiadas RIL-18 y RIL-76 podrían expresarlos, en diferente medida, para hacer frente a las condiciones de estrés abiótico.

El ionoma de la planta puede proporcionar información sobre el estado nutricional de la planta en distintos estadios de crecimiento (Salt y col., 2008). En general, los estreses abióticos de salinidad y alta temperatura generan un déficit hídrico en las plantas que afecta a numerosos procesos metabólicos, fisiológicos y moleculares involucrados en la productividad del cultivo, ya que aunque la absorción de agua y nutrientes son procesos independientes en la raíz, la necesidad de agua disponible para el crecimiento y transporte de nutrientes están íntimamente relacionadas (Sanchez-Rodriguez y col., 2014).

El calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) es un nutriente esencial para el crecimiento de las plantas, ya que, entre otras funciones, cumple varios roles estructurales en la pared celular y las membranas, además de actuar de mensajero intracelular y de contra-cación para los iones orgánicos e inorgánicos en la vacuola (White y Broadley, 2003). Nuestros

resultados indican que, durante el crecimiento vegetativo de las plantas de ambas líneas RIL-18 y RIL-76 (Figura 58), el  $\text{Ca}^{2+}$  se encontró en mayor concentración en las hojas que cuando la planta estaba en estado reproductivo, lo que demuestra que durante la fructificación, el  $\text{Ca}^{2+}$  fluyó desde las raíces no solo hacia las hojas, si no también hacia el fruto en formación (de Freitas y col., 2014).

Numerosos estudios han demostrado que el  $\text{Ca}^{2+}$  está involucrado en la tolerancia al estrés producido por la alta temperatura en las plantas (Gong y col., 1997; Larkindale y Knight, 2002; Tan y col., 2011). En este sentido, se observó que cuando las plantas de ambas líneas eran cultivadas a  $35^{\circ}\text{C}$  en las mismas condiciones salinas que las plantas cultivadas a  $25^{\circ}\text{C}$ , las plantas de la línea RIL-76 presentaban mayor concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  que las plantas control, al contrario de lo que ocurría en la línea RIL-18. Este comportamiento sugiere, por lo tanto, que es probable que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en las plantas de la línea RIL-76 forme parte de la respuesta adaptativa al estrés que presentan dichas plantas, haciéndolas más tolerantes a las altas temperaturas. Por otro lado, en esta misma línea, también se observó que la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la hoja se correlacionaba negativamente con la acumulación de  $\text{Na}^{+}$  (Figura 60), lo que no ocurría en la línea RIL-18. Estos datos conducen a pensar, como apuntaba (Cramer, 2002) que es posible que las altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  hayan reducido la permeabilidad de la membrana plasmática a  $\text{Na}^{+}$  y su acumulación por la entrada pasiva, lo que, a su vez, haya disminuído la toxicidad producida por la acumulación de  $\text{Na}^{+}$  en las células. Numerosos estudios han demostrado que esa relación entre el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Na}^{+}$  está implicada en los mecanismos de resistencia de las plantas a la salinidad (Hadi y Karimi, 2012; Kaya y col., 2002; Kurusu y col., 2015), por lo que puese ser que este comportamiento en la línea RIL-76 sea una de las causas de su tolerancia.

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  también guardó relación con la acumulación de  $\text{K}^{+}$  en las hojas durante los tres estados fenólicos estudiados de la línea RIL-76 (Figura 59). Precisamente, la importancia del  $\text{Ca}^{2+}$  frente a la salinidad reside en que al ser capaz de reducir la absorción de  $\text{Na}^{+}$ , provocando un aumento en la absorción de  $\text{K}^{+}$  (Grattan y Grieve, 1999; Munns et al., 2002), lo que resulta en un aumento del crecimiento de las plantas. Este comportamiento se vio reflejado en los resultados de peso fresco de las líneas estudiadas, ya que la línea RIL-76 presentó un mayor

desarrollo vegetativo que la RIL-18, lo que podría apoyar la hipótesis descrita anteriormente (Grattan y Grieve, 1999; Munns et al., 2002).

Junto con el  $K^+$  y el N, el P, también es uno de los nutrientes más importantes, ya que estimula el crecimiento de las raíces y la producción floral, así como el crecimiento temprano de los frutos (Sainju y col., 2003). A lo largo del experimento, el P se fue concentrando en las hojas en ambas RILs estudiadas (Figura 61), ya que aunque es un elemento relativamente inmóvil en relación con otros nutrientes, y ante situaciones de estrés, la planta es capaz de movilizarlo de manera efectiva desde las partes más maduras hasta el tejido en crecimiento activo (van de Wiel y col., 2015). Por otro lado, y al igual que ocurría en los estudios de (Chaichi y col., 2017), el P también se encontró en mayor concentración en aquel tratamiento en el que la salinidad fue más extrema combinado con la alta temperatura (120 mM de NaCl a 35°C) que en el resto de tratamientos, debido posiblemente al desequilibrio iónico que influye en los mecanismos biofísicos y/o metabólicos del crecimiento de las plantas (Nedjimi, 2011). En relación a las distintas líneas, el P se encontró en mayor concentración en las hojas de las plantas sometidas al estrés combinado de línea RIL-18 respecto a su control que en la línea RIL-76. Este hecho puede tener su posible explicación en que la línea RIL-18, al ser más sensible a los estreses combinados que la línea RIL-76, pudiese tener mayor concentración de fósforo inorgánico ( $P_i$ ) debido al gasto de ATP generado en la respuesta antioxidante de la planta (Patil y Chavan, 2011), ya que especies de plantas, e incluso diferentes genotipos dentro de la misma especie, pueden diferir en la eficiencia celular del P (Balemi y col., 2012; Föhse y col., 1988).

Aunque en menor medida que los macronutrientes, los micronutrientes también son necesarios para el crecimiento de las plantas, y la alteración de la homeostasis de estos puede causar deficiencias, e incluso, toxicidad (Sainju y col., 2003) a nivel celular. Los micronutrientes juegan diferentes funciones en la mediación del estrés salino debido a su participación en distintos mecanismos, como el mantenimiento del equilibrio hídrico, la absorción y asimilación de nutrientes, el intercambio de gases y la disminución del estrés oxidativo mediante modificación de las expresiones génicas, además de ser cofactor metálico de algunas proteínas, como la SOD o la nitrato reductasa (Chakraborty y col., 2016; Hussain y col., 2018). Bajo condiciones de salinidad extrema (120 mM) y 35°C de

temperatura, las concentraciones de Fe (Figura 63) y Zn (Figura 65) aumentaron en ambas líneas RIL-18 y RIL-76 notablemente, sobre todo al final del ensayo, lo que pueda ser debido a la sobreexpresión de enzimas del sistema antioxidante celular, ya que estos elementos son cofactores de la SOD (Shenker y col., 2004). Aunque el Fe es esencial para el crecimiento de las plantas, también puede ser altamente reactivo y tóxico en concentraciones elevadas, ya que puede alterar el metabolismo de las mitocondrias y los cloroplastos y producir daño oxidativo a través de la reacción de Fenton (Morrissey y Guerinot, 2009). Por otro lado, el Zn puede aliviar el estrés producido por la toxicidad derivada de la acumulación de metales pesados (Hassan y col., 2017), lo que conduce a pensar que la alta concentración de Zn encontrada en dichas plantas también forme parte de un mecanismo de defensa de las mismas ante la alta acumulación de Fe.

El B participa en el crecimiento reproductivo del tomate, e influye en la floración y la producción final de los frutos (Sainju y col., 2003). Nuestros resultados indican que la concentración de B en ambas líneas RIL-18 Y RIL-76 fue menor en los tratamientos en los que la salinidad a 60mM y 120mM era combinada con el estrés de alta temperatura que en las plantas que crecieron bajo condiciones óptimas (Figura 62), lo que corresponde con los datos de producción obtenidos durante en el ensayo.

Por último, al estudiar la homeostasis del Mn en las distintas líneas RILs (Figura 64), se comprobó que la línea RIL-76 presentaba mayor concentración de este microelemento que en las plantas que crecían bajo el efecto de la salinidad y la alta temperatura que en las plantas control, al contrario de lo que ocurría en la RIL-18. Como ocurría con el Zn y el Fe, el Mn también participa como cofactor de varias enzimas, comola SOD (Shenker y col., 2004), por lo que es posible que un aumento de la concentración de este microelemento esté indirectamente relacionado con la sobreexpresión de proteínas implicadas en la detoxificación de las ROS en las plantas que crecieron bajo condiciones climatológicas extremas. Esto podría llevarnos a hipotizar que la línea RIL-76 sea capaz de tener una maquinaria antioxidante más efectiva que la línea RIL-18.

A pesar de que hay numerosos indicios que demuestran que la línea RIL-76 presentó una mejor respuesta hacia los estreses combinados de salinidad y alta temperatura que la línea RIL-18, los resultados relacionadoc con los parámetros de



intercambio gaseoso en las plantas (Figura 66, Figura 67 y Figura 68, respectivamente) relevan un comportamiento inesperado, ya que éstos se vieron más alterados por las condiciones extremas en las plantas de la línea tolerante (RIL-76) que en la línea sensible (RIL-18) respecto a los respectivos conotroles. No obstante, Nösberger y col. (2006) y Rossi y col. (2015) demostraron que las tasas más altas de fotosíntesis no necesariamente conducen a aumentos en la biomasa y el rendimiento debido a la interacción en las redes reguladoras del metabolismo de las hojas de las plantas. Además, los factores genéticos involucrados en la regulación de la fotosíntesis siguen siendo desconocidos (Flood y col., 2011), aunque ya se están realizando estudios con líneas introgresadas de tomate para identificar los genes que regulan la fotosíntesis, el metabolismo primario y el crecimiento de las plantas y su interacción, con el fin último de mejorar el rendimiento de los cultivos (de Oliveira Silva y col., 2018).

Como se ha ido diciendo a lo largo de todos los ensayos realizados, los estreses abióticos de salinidad y temperatura suelen actuar conjuntamente y pueden dar lugar a devastadoras pérdidas económicas en la agricultura mundial (Rivero y col., 2014), ya que es una de las principales limitaciones para la producción de cultivos y la seguridad alimentaria en todo el mundo (Fahad y col., 2017; Mittler, 2006). Los resultados de producción de este experimento demostraron que la acción de dichos estreses actuando de manera conjunta mermó significativamente la producción de las líneas RILs seleccionadas, tanto la RIL-76 como la RIL-18 (Figura 69). No obstante, esa reducción de la producción no fue proporcional a la concentración salina aplicada, puesto que no hubo diferencias significativas entre la producción de las plantas cultivadas a 35°C con 60 mM de salinidad respecto a las plantas cultivadas en las mismas condiciones de temperatura con 120 mM de NaCl. Comparando los resultados de la cosecha con los datos de biomasa total, se observó que los estreses combinados fueron más devastadores con la producción de las plantas que con su crecimiento vegetativo, lo que demuestra que la vulnerabilidad de los procesos de desarrollo involucrados en la reproducción, como la floración y la producción de frutos y semillas a los estreses combinados (Rivero y col., 2019). Sorprendentemente, también se observó que cuando los estreses se combinaban de manera extrema (35°C y 120 mM NaCl) se redujo de forma significativa la biomasa total (Figura 70) de la línea RIL-76, considerada como la más tolerante, respecto al estrés donde la salinidad aplicada

fue de 60 mM, al contrario de lo que ocurría en la línea RIL-18, donde no hubo diferencias entre el tratamiento de 60 mM y el de 120 mM a 35°C de temperatura.

No obstante, los resultados de producción distan mucho de los esperados, ya que en una explotación comercial de bajo rendimiento se pueden obtener aproximadamente 10 Kg de fruta por m<sup>2</sup>, mientras que en una explotación moderna en invernadero puede llegar hasta los 50 Kg/m<sup>2</sup> en cada ciclo de cultivo (Sonneveld y Voogt, 2009). En ese sentido, el estudio realizado por Rao y col. (2013) destaca que los comportamientos fisiológicos relacionados con la adaptación al estrés y la producción de las plantas de la variedad *S. pimpinellifolium* L. son dos conjuntos de rasgos independientes que no están correlacionados, y que el avance genético ha permitido demostrar que el desarrollo vegetativo de las plantas junto con la relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>, y no la producción, son los componentes más críticos para la supervivencia de las plantas. Como se ha mencionado anteriormente, en el proceso de domesticación del tomate se han ido seleccionando variedades por sus características de producción y la calidad de sus frutos. Sin embargo, el escenario de cambio climático actual está propiciando que se tenga en cuenta la tolerancia a estreses abióticos extremos, como la salinidad y la alta temperatura, para la selección de nuevas variedades.

La calidad del tomate para consumo en fresco está determinada por su apariencia: color, tamaño y forma, así como por su dureza, textura, sus cualidades organolépticas y sus beneficios nutracéticos (Domis y col., 2002). A simple vista, los tomates cosechados bajo condiciones óptimas de cultivo de las dos líneas (RIL-18 y RIL-76) no presentaban una apariencia comercial, puesto que tanto la disposición de los frutos en el racimo como la apariencia de estos se asemejaban más a los frutos del parental silvestre *S. Pimpinellifolium* L. que a los frutos comerciales que actualmente se distribuyen en el mercado.



Imagen 8: Detalle de los racimos de las líneas RIL-18 y RIL-76

Según la FAO, 2019, el tomate más común de todos tiene una forma ligeramente aplanada, pesa de 70 a 150 gramos, y, generalmente, mide de 50mm a 70mm. En el estudio de calidad de las RILs seleccionadas, los frutos de tomate de las plantas cultivadas en condiciones óptimas (Figura 71) pesaron en torno a 20 gr, y los diámetros tanto ecuatorial como longitudinal fueron de 35 mm aproximadamente, lo que dista mucho del tamaño comúnmente establecido. Además, el estrés de temperatura redujo el tamaño de los frutos en ambas líneas, y, cuando se aplicaron, además, los distintos niveles salinos, el tamaño de los frutos se vio todavía más afectado, ya que disminuyó considerablemente respecto al tamaño de los frutos de las plantas control. Cuartero y Fernandez-Munoz (1999) demostraron que los frutos de las plantas de tomate cultivadas bajo condiciones salinas crecen de manera normal durante la fase de división celular, y que es durante la expansión del fruto donde la salinidad compromete su tamaño debido a la reducción de la entrada de agua a las células frutales. Sin embargo, el aumento de la salinidad de 60 mM a 120 mM de NaCl no causó ningún efecto en el tamaño de los frutos, por lo que es de suponer que una salinidad de 60 mM bajo condiciones de alta temperatura fue suficiente para que afectar de forma considerable al rendimiento de los frutos, principalmente debido a la pérdida de peso fresco. Esto

contrasta con el estudio llevado a cabo por Zhang y col. (2017) donde se pone de manifiesto que el estrés de salinidad durante las etapas de floración y fructificación causa una reducción en el rendimiento del tomate debido a la cantidad de fruta producida y no al tamaño de la fruta. En el caso de las líneas recombinantes RIL-18 y RIL-76, la salinidad y la alta temperatura afectaron tanto a la cosecha final como al tamaño de los frutos.

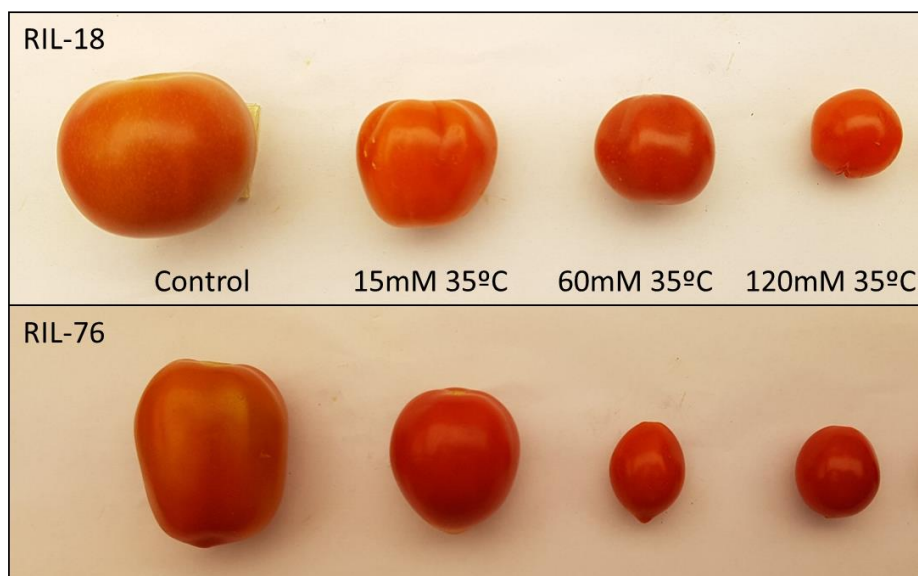


Imagen 9: Tomates recolectados de cada uno de los tratamientos de ambas líneas RILs estudiadas RIL-18 y RIL-76.

Por otro lado, la calidad sensorial depende de numerosos factores como el color, la textura, el aroma y la composición de metabolitos primarios y secundarios, como azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos. Varios estudios han establecido que la calidad organoléptica del tomate para consumo fresco está condicionada principalmente por los azúcares y los ácidos presentes, que son los que contribuyen a un buen sabor (Vogel y col., 2010). Por lo tanto, los parámetros más destacados a tener en cuenta para valorar la calidad del tomate, a parte del tamaño del fruto, son los sólidos solubles, el pH y la acidez valorable (Saltveit y Technology, 2005). De estos, como se ha dicho anteriormente, el que más influye en el sabor del tomate son los °Brix, que estima la cantidad de sólidos solubles totales

contenidos en el fruto: aproximadamente la mitad de estos son azúcares reductores, y, el resto, ácidos orgánicos y otros elementos (Ties y Barringer, 2012).

Todos los tratamientos salinos aplicados a las líneas RILs seleccionadas bajo condiciones de alta temperatura aumentaron el índice de sólidos solubles en el fruto (Figura 75), así como la conductividad eléctrica (Figura 74) y la acidez valorable (Figura 77), tal y como han recogido numerosos estudios sobre cómo afecta la salinidad a la calidad del fruto de tomate (Beckles, 2012; Flores y col., 2010; Flores y col., 2003; Lu y col., 2010). En base a estos resultados, tal y como recogen otros estudios (Ehret y Ho, 1986; Yurtseven y col., 2005), se podría decir que los estreses de temperatura y salinidad aplicados de manera conjunta mejoraron la calidad del fruto de tomate en términos de concentración de azúcares solubles y ácidos, pero ese aumento en la calidad organoléptica fue acompañada por una pérdida de rendimiento, principalmente debida a la reducción del peso y del tamaño de los frutos frescos.

Por otro lado, el pH del fruto suele estar entre 3,9 y 4,9, y su variación depende del contenido en ácidos orgánicos que presente el zumo. (Barringer, 2004). Estos datos contrastan con los encontrados en el pH de los frutos de ambas líneas RILs (Figura 76), que fueron de entre 3,2, en la combinación de estreses extrema, y 3,5 en condiciones control, valores más bajos de los hallados generalmente. Los ácidos cítrico y málico y el fosfato representan alrededor del 93% de la acidez valorable de los tomates, y un aumento en la concentración de fosfato resulta en una disminución en  $[H^+]$ , mientras que un aumento en los ácidos cítrico y málico aumenta la acidez de los frutos (Anthon y col., 2011; Paulson y Stevens, 1974). En base a estos estudios, los resultados sugieren que es probable que la que la salinidad aumentara la concentración de los ácidos cítrico y málico, aumentando así la concentración de  $[H^+]$  en el fruto y, por consecuencia, disminuyendo su pH y aumentando su acidez, ya que, a vista de los resultados, la temperatura no causó ningún efecto significativo ni en el pH (Figura 76) ni en la acidez de los frutos (Figura 77): En cambio, cuando las plantas eran crecidas con una salinidad de 60 mM o de 120 mM de NaCl combinada con la alta temperatura, el pH se reducía conforme aumentaba la concentración salina en la solución.

A pesar del resto de parámetros, el contenido de azúcar es más importante en términos de sabor (Sato y col., 2006) debido a que su aumento mejora no solo el

valor de mercado de la fruta fresca, si no también su procesamiento, ya que aumenta el sabor dulce y disminuye el contenido de agua (Barry y col., 1996). Sin embargo, tal y como se ha visto en los resultados, aunque la combinación de estreses aumentó el contenido de azúcar en los frutos, también limitó la productividad de las plantas, y tuvo efectos adversos sobre el vigor y el rendimiento de los ambas líneas RILs (Munns y Tester, 2008), debido a una disminución en tamaño de fruta y la cosecha final por planta de tomate (Magán y col., 2008). Actualmente también se están realizando estudios basados en la identificación de genes con los que poder entender la química y la genética responsables del sabor característico del tomate, y poder identificar así asociaciones entre las características bioquímicas o físicas de la fruta y los rasgos sensoriales. (Klee y Tieman, 2018; Tieman y col., 2017).

Es por ello que el futuro de la calidad del tomate reside en encontrar especies y genotipos que sean tolerantes a condiciones extremas, y sobre todo, a la combinación de estreses, para así tener una buena producción que se corresponda con una buena calidad de los frutos (Khanbabalo y col., 2018).

La nutrición también es fundamental para el rendimiento de los cultivos. La composición de la materia mineral de los frutos caracteriza sus condiciones nutricionales e indica los potenciales de rendimiento. Las cantidades excesivas de  $K^+$  y  $Mg^+$  en el tomate inhiben la absorción de  $Ca^{2+}$ , lo que puede causar podredumbre (Adams y Ho, 1993; Demirbas, 2010). La combinación de los estreses de salinidad y la alta temperatura no afectó de manera significativa a la concentración de  $K^+$  (Figura 79) o  $Mg^{2+}$  (Figura 80) en los frutos de la línea RIL-76, aunque sí que disminuyó la concentración de  $K^+$  de los de la línea RIL-18. Por el contrario, la combinación de estreses hizo que aumentara la concentración de  $Ca^{2+}$  en los frutos (Figura 78), lo que explica por qué no se encontró podredumbre apical en ellos (Mestre y col., 2012). Cuando el  $Mg^{2+}$  se encuentra en concentraciones deficientes, el tamaño de los frutos puede verse drásticamente mermado (Carvajal y col., 1999; Hao y Papadopoulos, 2004). Sin embargo, en las RILs seleccionadas, la concentración final de  $Mg^{2+}$  obtenida no fue determinante en el tamaño del fruto.

Por último, la concentración de  $Na^+$  aumentó en el fruto conforme fue aumentando la concentración de NaCl en los tratamientos salinos, aunque el incremento fue menos acusado en la línea RIL-76 que en la RIL-18. Tal y como

argumenta Ali y Ismail (2014) en sus estudios, la salinidad, no solo disminuye el tamaño de la fruta fresca, si no que también disminuye el contenido de compuestos importantes en su calidad, como  $\beta$ -caroteno y licopeno, mientras que aumenta la concentración de  $\text{Na}^+$  en el fruto.

Los resultados de este último experimento, por lo tanto, sugieren que estas líneas recombinantes son un buen modelo de estudio para abordar la respuesta de las plantas de tomate a la combinación de estreses y los mecanismos implicados en dicha tolerancia, aunque no son la mejor opción como aproximación a la mejora genética del fruto.





## **VI - CONCLUSIONES**



## VI. CONCLUSIONES

1. El aumento de los niveles de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  en la solución nutritiva mejoró la tolerancia de las plantas de tomate a la combinación de salinidad y alta temperatura. Este aporte extra de nutrientes aumentó el crecimiento vegetativo de las plantas debido a un incremento de la tasa fotosintética y a una disminución de la peroxidación lipídica. El control del daño oxidativo estuvo mediado por la regulación transcripcional de las principales enzimas implicadas en la detoxificación de ROS.
2. La combinación de los estreses de salinidad y alta temperatura redujo el crecimiento de las líneas RILs estudiadas. No obstante, no todas las líneas respondieron de igual manera, ya que presentaron distintos rangos de tolerancia frente a dicha combinación. Hubo líneas que no se vieron afectadas por el tratamiento de combinación y otras que redujeron su crecimiento hasta un 63% con respecto a sus respectivos controles sin estreses.
3. Al estudiar el comportamiento de las líneas en condiciones controladas de estrés combinado se corroboró que la línea seleccionada como más tolerante a la combinación de estreses, RIL-76, y la seleccionada como sensible, RIL-18, presentaron una respuesta de tolerancia similar a la de los experimentos realizados previamente.
4. Se observó una correlación entre el desarrollo vegetativo de las plantas y la relación  $K^+/Na^+$  en tejido vegetal de tomate. La línea definida como la más tolerante, RIL-76, presentó una relación  $K^+/Na^+$  mayor que la línea seleccionada como sensible, RIL-18. Además, el aumento de esta relación se correspondía con una disminución del potencial osmótico de la planta y

un aumento en el potencial de turgencia. En la línea más tolerante, RIL-76, la fluorescencia de las clorofilas se relacionó con un aumento en la tasa fotosintética de las hojas y el peso seco de las plantas, hecho que no ocurría en la línea más sensible RIL-18.

5. La diferencia de tolerancia a la combinación de estreses entre las líneas seleccionadas se mantuvo durante las diferentes etapas de desarrollo. Esto se constató en el último experimento en condiciones de invernadero, donde se observó una mayor mortandad en las plantas de la línea RIL-18 que en las de línea RIL-76.
6. Durante el desarrollo vegetativo y el estado de producción de las plantas, las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^{+}$  en las hojas fueron mayores en la línea más tolerante, RIL-76, que en la línea más sensible, RIL-18. Además, la concentración de  $\text{Na}^{+}$ , tanto en las hojas como en el fruto, fue menor en la línea RIL-76 que en la línea RIL-18.
7. La acción de los estreses combinados de salinidad y temperatura redujo drásticamente el desarrollo vegetativo, la producción de fruto y la calidad de los mismos en las líneas seleccionadas para el ensayo de producción. En ambas líneas la producción se vio afectada principalmente por la reducción en el tamaño de los frutos.
8. Finalmente, se demostró que líneas RILs de tomate son de gran interés para el estudio de la respuesta a la combinación de estreses. Sin embargo, la línea que se seleccionó como tolerante puede que no sea la mejor opción como aproximación para el uso en programas de mejora genética del fruto, ya que no presentaba las características agronómicas del parental comercial.

## **VII – LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN**



## VII. LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Después de estudiar la respuesta fisiológica de las plantas de tomate ante la combinación de los estreses de salinidad y alta temperatura, el siguiente paso sería identificar cuáles son los procesos metabólicos y moleculares que intervienen en la tolerancia a dicho estreses con el fin de establecer criterios para mejorar y obtener variedades más tolerantes.

Actualmente se está llevando a cabo el estudio fisiológico, ionómico, metabolómico y transcriptómico del metabolismo del nitrógeno en dos de las líneas RILs estudiadas. El desarrollo de variedades vegetales que sean tolerantes a la combinación de estreses y que, además, presenten una mejor eficiencia en el uso de nitrógeno, permitirá a la agricultura moderna disminuir la contaminación ambiental derivada del mal uso de fertilizantes, en especial de los nitratos, en zonas como la cuenca del Mediterráneo y, más concretamente, en zonas como la Región de Murcia.

Por otro lado, tal y como se ha visto en los resultados del Experimento 4, una de las conclusiones a las que se ha llegado es que los frutos de tomate que se obtuvieron tanto de la línea seleccionada definida como tolerante (RIL-76) como de la línea definida como sensible (RIL-18), no obtuvieron los parámetros de calidad esperados, ya que no cumplían con los criterios comerciales de los tomates del mercado actual. Por lo tanto, otro de los estudios que también se está llevando a cabo guarda relación con el metabolismo de los azúcares en los frutos de dichas líneas isogénicas. Estos estudios permitirán establecer las bases de la mejora de la calidad del fruto de tomate en líneas tolerantes a la combinación de estreses como la línea RIL-76, para así conseguir plantas que, además de ser tolerantes a condiciones abióticas extremas, sus frutos cumplan con las exigencias del mercado.

No obstante, como se ha podido comprobar durante la revisión bibliográfica de la Tesis Doctoral, estos estudios multidisciplinarios suelen llevarse a cabo mediante la colaboración de diferentes países y centros de investigación, ya que, de esta manera, se consigue abarcar una perspectiva más amplia del comportamiento de las plantas. En ese sentido, es necesario contar tanto con

medios humanos como medios económicos con los que hacer viables estudios de mayor impacto que calen no sólo en el ámbito científico, si no también en la sociedad actual.

Debido a las predicciones actuales referentes al cambio climático y al aumento de la población mundial, la investigación de variedades agrícolas que sean más tolerantes a la combinación de estreses abióticos como la salinidad y la alta temperatura va a tener una importancia vital en las próximas décadas, obligando al sector de la agricultura a reinventarse para hacer frente a los desafíos que plantea el futuro.



## **VIII - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, G., Khattak, J., Abbas, G., Ishaque, M., Aslam, M., & Abbasi, Z. (2013). Profit maximizing level of potassium fertilizer in wheat production under arid environment. *45*(3), 961-965.

Adams, P., & Ho, L. (1993). Effects of environment on the uptake and distribution of calcium in tomato and on the incidence of blossom-end rot. *154*(1), 127-132.

Aguirre, R., & May, J. M. (2008). Inflammation in the vascular bed: importance of vitamin C. *119*(1), 96-103.

Ahanger, M. A., Tomar, N. S., Tittal, M., Argal, S., & Agarwal, R. M. (2017). Plant growth under water/salt stress: ROS production; antioxidants and significance of added potassium under such conditions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *23*(4), 731-744.

Ahmad, P., Alyemeni, M. N., Ahanger, M. A., Wijaya, L., Alam, P., Kumar, A., & Ashraf, M. (2018). Upregulation of antioxidant and glyoxalase systems mitigates NaCl stress in Brassica juncea by supplementation of zinc and calcium. *Journal of Plant Interactions*, *13*(1), 151-162.

Ahmad, P., Jaleel, C. A., Salem, M. A., Nabi, G., & Sharma, S. (2010). Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology*, *30*(3), 161-175.

Ahmed, I. M., Dai, H., Zheng, W., Cao, F., Zhang, G., Sun, D., & Wu, F. (2013). Genotypic differences in physiological characteristics in the tolerance to drought and salinity combined stress between Tibetan wild and cultivated barley. *Plant Physiology and Biochemistry*, *63*, 49-60.

Aktas, H., Karni, L., Chang, D. C., Turhan, E., Bar-Tal, A., & Aloni, B. (2005). The suppression of salinity-associated oxygen radicals production, in pepper (*Capsicum annuum*) fruit, by manganese, zinc and calcium in relation to its sensitivity to blossom-end rot. *Physiologia Plantarum*, *123*(1), 67-74.

Ali, H. E. M., & Ismail, G. S. M. (2014). Tomato fruit quality as influenced by salinity and nitric oxide. *38*(1), 122-129.

Allakhverdiev, S. I., Kreslavski, V. D., Klimov, V. V., Los, D. A., Carpentier, R., & Mohanty, P. (2008). Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis Research*, *98*(1-3), 541-550.

Amtmann, A., Armengaud, P., & Volkov, V. (2004). Potassium nutrition and salt stress. *Membrane Transport in Plants*, *15*, 293-339.

Anthon, G. E., LeStrange, M., Barrett, D. M., & Agriculture. (2011). Changes in pH, acids, sugars and other quality parameters during extended vine holding of ripe processing tomatoes. *91*(7), 1175-1181.

Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, *141*(2), 391-396.

Ashraf, M. (2002). Salt tolerance of cotton: Some new advances. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *21*(1), 1-30.

Ashrafi, H., Kinkade, M., & Foolad, M. R. (2009). A new genetic linkage map of tomato based on a *Solanum lycopersicum* × *S. pimpinellifolium* RIL population displaying locations of candidate pathogen response genes. *Genome*, *52*(11), 935-956.

Attaran, E., Major, I. T., Cruz, J. A., Rosa, B. A., Koo, A. J. K., Chen, J., . . . Howe, G. A. (2014). Temporal Dynamics of Growth and Photosynthesis Suppression in Response to Jasmonate Signaling. *Plant Physiology*, *165*(3), 1302-1314.

Babu, N. R., & Devaraj, V. R. (2008). High temperature and salt stress response in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Australian Journal of Crop Science*, *2*(2), 40-48.

Bacha, H., Rodenas, R., Lopez-Gomez, E., Garcia-Legaz, M. F., Nieves-Cordones, M., Rivero, R. M., Rubio, F. (2015). High Ca<sup>2+</sup> reverts the repression of high-affinity K<sup>+</sup> uptake produced by Na<sup>+</sup> in *Solanum lycopersicum* L. (var. microtom) plants. *Journal of Plant Physiology*, *180*, 72-79.

Bai, X. F., Dai, L. Q., Sun, H. M., Chen, M. T., & Sun, Y. L. (2019). Effects of moderate soil salinity on osmotic adjustment and energy strategy in soybean under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139, 307-313.

Bai, Y., & Lindhout, P. (2007). Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany*, 100(5), 1085-1094.

Balemi, T., Negisho, K., & nutrition, p. (2012). Management of soil phosphorus and plant adaptation mechanisms to phosphorus stress for sustainable crop production: a review. *12(3)*, 547-562.

Balfagon, D., Zandalinas, S. I., & Gomez-Cadenas, A. (2019). High temperatures change the perspective: Integrating hormonal responses in citrus plants under co-occurring abiotic stress conditions. *Physiologia Plantarum*, 165(2), 183-197.

Baral, A. (2019). Bananas tackling drought and heat - with DREBs and more. *Physiologia Plantarum*, 165(2), 128-130.

Barnabas, B., Jager, K., & Feher, A. (2008). The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell and Environment*, 31(1), 11-38.

Barry, G. F., Kishore, G. M., & Stark, D. M. (1996). Decreased oil content in plant seeds. In: Google Patents.

Battisti, D. S., & Naylor, R. L. (2009). Historical Warnings of Future Food Insecurity with Unprecedented Seasonal Heat. *Science*, 323(5911), 240-244.

Beckles, D. M. (2012). Factors affecting the postharvest soluble solids and sugar content of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *63(1)*, 129-140.

Bertin, N., & Genard, M. (2018). Tomato quality as influenced by preharvest factors. *Scientia Horticulturae*, 233, 264-276.

Besford, R., Maw, G., & Soil. (1974). Uptake and distribution of potassium in tomato plants. *41(3)*, 601-618.

Bhattacharjee, S. (2008). Calcium-dependent signaling pathway in the heat-induced oxidative injury in *Amaranthus lividus*. *Biologia Plantarum*, 52(1), 137-140.

- Bhowmik, D., Kumar, K. S., Paswan, S., Srivastava, S., & Phytochemistry. (2012). Tomato-a natural medicine and its health benefits. *1*(1), 33-43.
- Bitá, C. E., & Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science*, *4*.
- Blanca, J., Canizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Diez, M. J., & Nuez, F. (2012). Variation Revealed by SNP Genotyping and Morphology Provides Insight into the Origin of the Tomato. *Plos One*, *7*(10).
- Blanca, J., Montero-Pau, J., Sauvage, C., Bauchet, G., Illa, E., Diez, M. J., . . . Canizares, J. (2015). Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *Bmc Genomics*, *16*.
- Bohn, G. W., & Tucker, C. M. (1940). Studies on Fusarium wilt of the tomato. I. Immunity in *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill, and its inheritance in hybrids. (311).
- Bohra, J. S., & Doerffling, K. (1993). Potassium nutrition of rice (*Oryza sativa* L) varieties under NaCl salinity. *Plant and Soil*, *152*(2), 299-303.
- Bohs, L., & Olmstead, R. G. (1997). Phylogenetic relationships in *Solanum* (Solanaceae) based on *ndhF* sequences. 5-17.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248-254.
- Bramley, P. M. (2000). Is lycopene beneficial to human health? , *54*(3), 233-236.
- Breto, M., Asins, M., & Carbonell, E. (1993). Genetic variability in *Lycopersicon* species and their genetic relationships. *86*(1), 113-120.
- Broman, K. W. (2005). The genomes of recombinant inbred lines. *Genetics*, *169*(2), 1133-1146.
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). [30] Microsomal lipid peroxidation. In S. Fleischer & L. Packer (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 52, pp. 302-310): Academic Press.

Calvo-Polanco, M., Sanchez-Romera, B., Aroca, R., Jose Asins, M., Declerck, S., Dodd, I. C., Manuel Ruiz-Lozano, J. (2016). Exploring the use of recombinant inbred lines in combination with beneficial microbial inoculants (AM fungus and PGPR) to improve drought stress tolerance in tomato. *Environmental and Experimental Botany*, 131, 47-57.

Camejo, D., Rodriguez, P., Morales, A., Dell'Amico, J. M., Torrecillas, A., & Alarcon, J. J. (2005). High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *Journal of Plant Physiology*, 162(3), 281-289.

Canene-Adams, K., Campbell, J. K., Zaripheh, S., Jeffery, E. H., & Erdman Jr, J. W. (2005). The tomato as a functional food. *135*(5), 1226-1230.

Capel, C., del Carmen, A. F., Alba, J. M., Lima-Silva, V., Hernandez-Gras, F., Salinas, M., Lozano, R. (2015). Wide-genome QTL mapping of fruit quality traits in a tomato RIL population derived from the wild-relative species *Solanum pimpinellifolium* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(10), 2019-2035.

Capula-Rodríguez, R., Valdez-Aguilar, L. A., Cartmill, D. L., Cartmill, A. D., Alia-Tejagal, I., & Analysis, P. (2016). Supplementary calcium and potassium improve the response of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to simultaneous alkalinity, salinity, and boron stress. *47*(4), 505-511.

Caro, M., Cruz, V., Cuartero, J., Estan, M. T., & Bolarin, M. C. (1991). Salinity tolerance of normal-fruited and cherry tomato cultivars. *Plant and Soil*, 136(2), 249-255.

Carter, G. A., & Knapp, A. K. (2001). Leaf optical properties in higher plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration. *88*(4), 677-684.

Carvajal, M., Martinez, V., & Cerda, A. (1999). Influence of magnesium and salinity on tomato plants grown in hydroponic culture. *22*(1), 177-190.

Chaichi, M. R., Keshavarz-Afshar, R., Lu, B., & Rostamza, M. (2017). Growth and nutrient uptake of tomato in response to application of saline water, biological fertilizer, and surfactant. *Journal of Plant Nutrition*, 40(4), 457-466.

Chakraborty, K., Sairam, R. K., & Bhaduri, D. (2016). Effects of different levels of soil salinity on yield attributes, accumulation of nitrogen, and micronutrients in Brassica spp. *Journal of Plant Nutrition*, 39(7), 1026-1037.

Chamarro, J. (1995). *Anatomía y fisiología de la planta*. Paper presented at the El cultivo del tomate.

Chamarro Lapuerta, J. (1995). El cultivo de tomate. 2, 43-92.

Chen, H., & Jiang, J. G. (2010). Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environmental Reviews*, 18, 309-319.

Chen, Z., Pottosin, I. I., Cuin, T. A., Fuglsang, A. T., Tester, M., Jha, D., . . . Shabala, S. (2007). Root plasma membrane transporters controlling K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> homeostasis in salt-stressed barley. *Plant Physiology*, 145(4), 1714-1725.

Chew, Y. H., & Halliday, K. J. (2011). A stress-free walk from Arabidopsis to crops. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 281-286.

Chinnusamy, V., Schumaker, K., & Zhu, J. K. (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 55(395), 225-236.

Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant Journal*, 90(5), 856-867.

Clark, G. A. (1990). Measurement of soil water potential. 25(12), 1548-1551.

Colome-Tatche, M., & Johannes, F. (2016). Signatures of Dobzhansky-Muller Incompatibilities in the Genomes of Recombinant Inbred Lines. *Genetics*, 202(2), 825-+.

Conde, A., Chaves, M. M., & Gerós, H. (2011). Membrane transport, sensing and signaling in plant adaptation to environmental stress. 52(9), 1583-1602.

Cramer, G. R. (2002). Sodium-Calcium Interactions Under Salinity Stress. In A. Läuchli & U. Lüttge (Eds.), *Salinity: Environment - Plants - Molecules* (pp. 205-227). Dordrecht: Springer Netherlands.

Cuartero, J., & Fernandez-Munoz, R. (1999). Tomato and salinity. *Scientia Horticulturae*, 78(1-4), 83-125.



D'Autreaux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 813-824.

Davies, J. N., & Hobson, G. E. (1981). The constituents of tomato fruit - the influence of environment, nutrition, and genotype. *Crc Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15(3), 205-280.

Davis, D. G., & Swanson, H. R. (2001). Activity of stress-related enzymes in the perennial weed leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 46(2), 95-108.

de Freitas, S. T., McElrone, A. J., Shackel, K. A., & Mitcham, E. J. (2014). Calcium partitioning and allocation and blossom-end rot development in tomato plants in response to whole-plant and fruit-specific abscisic acid treatments. *Journal of Experimental Botany*, 65(1), 235-247.

de Oliveira Silva, F. M., Lichtenstein, G., Alseekh, S., Rosado-Souza, L., Conte, M., Suguiyama, V. F., Bhering, L. L. (2018). The genetic architecture of photosynthesis and plant growth-related traits in tomato. *41(2)*, 327-341.

De Pascale, S., Maggio, A., Fogliano, V., Ambrosino, P., & Ritieni, A. (2001). Irrigation with saline water improves carotenoids content and antioxidant activity of tomato. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 76(4), 447-453.

Delauney, A. J., & Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant Journal*, 4(2), 215-223.

Demirbas, A. (2010). Oil, micronutrient and heavy metal contents of tomatoes. *118(3)*, 504-507.

Domis, M., Papadopoulos, A., & Gosselin, A. (2002). Greenhouse tomato fruit quality. *26*, 239-349.

Dugasa, M. T., Cao, F. B., Ibrahim, W., & Wu, F. B. (2019). Differences in physiological and biochemical characteristics in response to single and combined drought and salinity stresses between wheat genotypes differing in salt tolerance. *Physiologia Plantarum*, 165(2), 134-143.

Dumas, Y., Dadomo, M., Di Lucca, G., Grolier, P., & Agriculture. (2003). Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *83*(5), 369-382.

Ehret, D., & Ho, L. (1986). The effects of salinity on dry matter partitioning and fruit growth in tomatoes grown in nutrient film culture. *61*(3), 361-367.

EUFI. (2001). The European Food Information Council Retrieved from <http://www.eufic.org/index/es/>

Fahad, S., Bajwa, A. A., Nazir, U., Anjum, S. A., Farooq, A., Zohaib, A., . . . Saud, S. (2017). Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. *8*, 1147.

Fam, S. S., & Morrow, J. D. (2003). The isoprostanes: Unique products of arachidonic acid oxidation - A review. *Current Medicinal Chemistry*, *10*(17), 1723-1740.

Fernandez-Garcia, N., Martinez, V., & Carvajal, M. (2004). Effect of salinity on growth, mineral composition, and water relations of grafted tomato plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *167*(5), 616-622.

Fernandez-Panchon, M., Villano, D., Troncoso, A., Garcia-Parrilla, M., & nutrition. (2008). Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. *48*(7), 649-671.

Flood, P. J., Harbinson, J., & Aarts, M. G. J. T. i. p. s. (2011). Natural genetic variation in plant photosynthesis. *16*(6), 327-335.

Flores, F. B., Sanchez-Bel, P., Estan, M. T., Martinez-Rodriguez, M. M., Moyano, E., Morales, B., Fernández-Garcia, N. (2010). The effectiveness of grafting to improve tomato fruit quality. *125*(3), 211-217.

Flores, P., Hernandez, V., Hellin, P., Fenoll, J., Cava, J., Mestre, T., & Martinez, V. (2016). Metabolite profile of the tomato dwarf cultivar Micro-Tom and comparative response to saline and nutritional stresses with regard to a commercial cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*(5), 1562-1570.

Flores, P., Navarro, J., Carvajal, M., Cerdá, A., & Martínez, V. (2003). Tomato yield and quality as affected by nitrogen source and salinity.

- Föhse, D., Claassen, N., & Jungk, A. (1988). Phosphorus efficiency of plants. *110*(1), 101-109.
- Foolad, M. R. (2004). Recent advances in genetics of salt tolerance in tomato. *76*(2), 101-119.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, *17*(7), 1866-1875.
- Fraser, P. D., Truesdale, M. R., Bird, C. R., Schuch, W., & Bramley, P. M. (1994). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit-development. *Plant Physiology*, *105*(1), 405-413.
- Gallusci, P., Dai, Z., Genard, M., Gauffretau, A., Leblanc-Fournier, N., Richard-Molard, C., Brunel-Muguet, S. (2017). Epigenetics for Plant Improvement: Current Knowledge and Modeling Avenues. *Trends in Plant Science*, *22*(7), 610-623.
- Gao, L., Gonda, I., Sun, H. H., Ma, Q. Y., Bao, K., Tieman, D. M., . . . Fei, Z. J. (2019). The tomato pan-genome uncovers new genes and a rare allele regulating fruit flavor. *Nature Genetics*, *51*(6), 1044-+.
- Gapinska, M., Sklodowska, M., & Gabara, B. (2008). Effect of short- and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. *Acta Physiologiae Plantarum*, *30*(1), 11-18.
- Garg, A., Owens, T., Setter, T., Miller, W., Kim, J.-K., Kochian, L., & Wu, R. (2010). Trehalose Accumulation in Rice, Maize, and Wheat Plants Confers High Tolerance Levels to Different Abiotic Stresses. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, *46*, S204-S204.
- Garg, N., & Manchanda, G. (2009). ROS generation in plants: Boon or bane? *Plant Biosystems*, *143*(1), 81-96.
- Gebre, G. M., Kuhns, M. R., & Brandle, J. R. (1994). Organic solute accumulation and dehydration tolerance in three water-stressed *Populus deltoides* clones. *Tree Physiology*, *14*(6), 575-587.
- George, B., Kaur, C., Khurdiya, D., & Kapoor, H. (2004). Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype. *84*(1), 45-51.

Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.

Giovanelli, G., Lavelli, V., Peri, C., & Nobili, S. (1999). Variation in antioxidant components of tomato during vine and post-harvest ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(12), 1583-1588.

Giovannoni, J. (2018). Tomato Multiomics Reveals Consequences of Crop Domestication and Improvement. *Cell*, 172(1-2), 6-8.

Gomes-Junior, R. A., Moldes, C. A., Delite, F. S., Gratao, P. L., Mazzafera, P., Lea, P. J., & Azevedo, R. A. (2006). Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(5-6), 420-429.

Gong, M., Li, Y.-J., Dai, X., Tian, M., & Li, Z.-G. (1997). Involvement of calcium and calmodulin in the acquisition of heat-shock induced thermotolerance in maize seedlings. *150*(5), 615-621.

Gong, X. L., Chao, L., Zhou, M., Hong, M. M., Luo, L. Y., Wang, L., . . . Hong, F. S. (2011). Oxidative damages of maize seedlings caused by exposure to a combination of potassium deficiency and salt stress. *Plant and Soil*, 340(1-2), 443-452.

Goswami, S., Kumar, R. R., Sharma, S. K., Kala, Y. K., Singh, K., Gupta, R., Rai, R. D. (2015). Calcium triggers protein kinases-induced signal transduction for augmenting the thermotolerance of developing wheat (*Triticum aestivum*) grain under the heat stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 24(4), 441-452.

Gruda, N. (2005). Impact of environmental factors on product quality of greenhouse vegetables for fresh consumption. *24*(3), 227-247.

Hadi, M. R., & Karimi, N. (2012). The role of calcium plants salt tolerance. *Journal of Plant Nutrition*, 35(13), 2037-2054.

Hameed, A., Goher, M., & Iqbal, N. (2013). Drought induced programmed cell death and associated changes in antioxidants, proteases, and lipid peroxidation in wheat leaves. *Biologia Plantarum*, 57(2), 370-374.

Hanin, M., Ebel, C., Ngom, M., Laplaze, L., & Masmoudi, K. (2016). New Insights on Plant Salt Tolerance Mechanisms and Their Potential Use for Breeding. *Frontiers in Plant Science*, 7.

Hao, X., & Papadopoulos, A. P. (2004). Effects of calcium and magnesium on plant growth, biomass partitioning, and fruit yield of winter greenhouse tomato. *39(3)*, 512-515.

Hare, P. D., Cress, W. A., & Van Staden, J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell and Environment*, 21(6), 535-553.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M. M., Roychowdhury, R., & Fujita, M. (2013). Physiological, Biochemical, and Molecular Mechanisms of Heat Stress Tolerance in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 9643-9684.

Hassan, Z., Ali, S., Rizwan, M., Hussain, A., Akbar, Z., Rasool, N., & Abbas, F. (2017). Role of Zinc in Alleviating Heavy Metal Stress. In.

Hatfield, J. L., Boote, K. J., Kimball, B. A., Ziska, L. H., Izaurralde, R. C., Ort, D., Wolfe, D. (2011). Climate Impacts on Agriculture: Implications for Crop Production. *Agronomy Journal*, 103(2), 351-370.

Hatfield, J. L., & Prueger, J. H. (2015). Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather and Climate Extremes*, 10, 4-10.

Havaux, M. (1993). Rapid photosynthetic adaptation to heat-stress triggered in potato leaves by moderately elevated-temperatures. *Plant Cell and Environment*, 16(4), 461-467.

Hernandez, J. A. (2019). Salinity Tolerance in Plants: Trends and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10).

Hernandez, J. A., Jimenez, A., Mullineaux, P., & Sevilla, F. (2000). Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell and Environment*, 23(8), 853-862.

Hernandez, M., Fernandez-Garcia, N., Garcia-Garma, J., Rubio-Asensio, J. S., Rubio, F., & Olmos, E. (2012). Potassium starvation induces oxidative stress in *Solanum lycopersicum* L. roots. *Journal of Plant Physiology*, 169(14), 1366-1374.

Hirayama, T., & Shinozaki, K. (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant Journal*, 61(6), 1041-1052.

Horie, T., Karahara, I., & Katsuhara, M. (2012). Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus on rice plants. *Rice*, 5.

Hsu, S. Y., Hsu, Y. T., & Kao, C. H. (2003). The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. *Biologia Plantarum*, 46(1), 73-78.

Hu, Y., & Schmidhalter, U. (1997). Interactive effects of salinity and macronutrient level on wheat .2. Composition. *Journal of Plant Nutrition*, 20(9), 1169-1182.

Huang, Y., Bie, Z. L., Liu, Z. X., Zhen, A., & Wang, W. J. (2009). Protective role of proline against salt stress is partially related to the improvement of water status and peroxidase enzyme activity in cucumber. *Soil Science and Plant Nutrition*, 55(5), 698-704.

Hussain, S., Khalid, M. F., Hussain, M., Ali, M. A., Nawaz, A., Zakir, I., . . . Ahmad, S. (2018). Role of Micronutrients in Salt Stress Tolerance to Plants. In M. Hasanuzzaman, M. Fujita, H. Oku, K. Nahar, & B. Hawrylak-Nowak (Eds.), *Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance* (pp. 363-376). Singapore: Springer Singapore.

Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287-293.

Ilan, N., Moran, N., & Schwartz, A. (1995). The role of potassium channels in the temperature control of stomatal aperture. *Plant Physiology*, 108(3), 1161-1170.

IPCC. (2012). Intenational Panel for Climate Change.

Jaramillo, J., Rodriguez, V., Guzman, M., Zapata, M., & Rengifo, T. (2007). Technical manual: Good Agricultural Practices in the Production of tomato under protected conditions.

Jimenez, A., Hernandez, J. A., delRio, L. A., & Sevilla, F. (1997). Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology*, 114(1), 275-284.

Kaur, H., Sirhindi, G., Bhardwaj, R., Alyemini, M. N., Siddique, K. H. M., & Ahmad, P. (2018). 28-homobrassinolide regulates antioxidant enzyme activities and gene expression in response to salt- and temperature-induced oxidative stress in *Brassica juncea*. *Scientific Reports*, 8.

Kaya, C., Kirmak, H., Higgs, D., & Saltali, K. (2002). Supplementary calcium enhances plant growth and fruit yield in strawberry cultivars grown at high (NaCl) salinity. *Scientia Horticulturae*, 93(1), 65-74.

Kevei, Z., King, R. C., Mohareb, F., Sergeant, M. J., Awan, S. Z., & Thompson, A. J. (2015). Resequencing at  $\geq 40$ -Fold Depth of the Parental Genomes of a *Solanum lycopersicum* x *S. pimpinellifolium* Recombinant Inbred Line Population and Characterization of Frame-Shift InDels That Are Highly Likely to Perturb Protein Function. *G3-Genes Genomes Genetics*, 5(5), 971-981.

Khan, M. H., & Panda, S. K. (2008). Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(1), 81-89.

Khanbabalo, N., seyed Hajizadeh, H., Behtash, F., & Research, P. (2018). Effects of salinity on taste quality and biochemical traits of four tomato varieties (*Solanum lycopersicum*) grown under hydroponic conditions. 1(1), 15-26.

Kinet, J., & Peet, M. (1997). *Tomato*. Retrieved from

Klee, H. J., & Tieman, D. M. (2018). The genetics of fruit flavour preferences. *Nat Rev Genet*, 19(6), 347-356.

Kocal, N., Sonnewald, U., & Sonnewald, S. (2008). Cell Wall-Bound Invertase Limits Sucrose Export and Is Involved in Symptom Development and Inhibition of Photosynthesis during Compatible Interaction between Tomato and *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Plant Physiology*, 148(3), 1523-1536.

Kudla, J., Batistic, O., & Hashimoto, K. (2010). Calcium Signals: The Lead Currency of Plant Information Processing. *Plant Cell*, 22(3), 541-563.

Kurusu, T., Kuchitsu, K., & Tada, Y. (2015). Plant signaling networks involving Ca<sup>2+</sup> and Rboh/Nox-mediated ROS production under salinity stress. *Frontiers in Plant Science*, 6.

Laluk, K., AbuQamar, S., & Mengiste, T. (2011). The Arabidopsis mitochondria-localized pentatricopeptide repeat protein PGN functions in defense against necrotrophic fungi and abiotic stress tolerance. *Plant Physiology*, 156(4), 2053-2068.

Langford, A. N. (1937). The parasitism of *Cladosporium fulvum* Cooke and the genetics of resistance to it. *15*(3), 108-128.

Lara, M. V., Borsani, J., Budde, C. O., Lauxmann, M. A., Lombardo, V. A., Murray, R., Drincovich, M. F. (2009). Biochemical and proteomic analysis of 'Dixiland' peach fruit (*Prunus persica*) upon heat treatment. *Journal of Experimental Botany*, 60(15), 4315-4333.

Larkindale, J., & Knight, M. R. (2002). Protection against heat stress-induced oxidative damage in Arabidopsis involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *128*(2), 682-695.

Lesk, C., Rowhani, P., & Ramankutty, N. (2016). Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature*, 529(7584), 84-+.

Liang, W., Ma, X., Wan, P., & Liu, L. (2018). Plant salt-tolerance mechanism: A review. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1), 286-291.

Lin, T., Zhu, G. T., Zhang, J. H., Xu, X. Y., Yu, Q. H., Zheng, Z., Huang, S. W. (2014). Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nature Genetics*, 46(11), 1220-1226.

Lin, Y. P., Liu, C. Y., & Chen, K. Y. (2019). Assessment of Genetic Differentiation and Linkage Disequilibrium in *Solanum pimpinellifolium* Using Genome-Wide High-Density SNP Markers. *G3-Genes Genomes Genetics*, 9(5), 1497-1505.

Liu, H.-T., Gao, F., Li, G.-L., Han, J.-L., De-Long, L., Sun, D.-Y., & Zhou, R.-G. (2008). The calmodulin-binding protein kinase 3 is part of heat-shock signal transduction in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 55(5), 760-773.



López Camelo, A. F., & Gómez, P. A. (2004). Comparison of color indexes for tomato ripening. *22*(3), 534-537.

Lu, S., Li, T., & Jiang, J. (2010). Effects of salinity on sucrose metabolism during tomato fruit development. *9*(6), 842-849.

Luckwill, L. C. (1943). *The genus Lycopersicon: an historical, biological, and taxonomic survey of the wild and cultivated tomatoes*. Retrieved from

Lugan, R., Niogret, M. F., Leport, L., Guegan, J. P., Larher, F. R., Savoure, A., Bouchereau, A. (2010). Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. *Plant J*, *64*(2), 215-229.

Lyu, J. (2016). Tomato domestication. Slowing down the clock. *Nature Plants*, *2*(1).

Magán, J., Gallardo, M., Thompson, R., & Lorenzo, P. (2008). Effects of salinity on fruit yield and quality of tomato grown in soil-less culture in greenhouses in Mediterranean climatic conditions. *95*(9), 1041-1055.

MAGRAMA. (2011). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Retrieved from <http://www.magrama.gob.es/>

Malinska, D., Mirandola, S. R., & Kunz, W. S. (2010). Mitochondrial potassium channels and reactive oxygen species. *Febs Letters*, *584*(10), 2043-2048.

Marin-Rodriguez, M. C., Orchard, J., & Seymour, G. B. (2002). Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *Journal of Experimental Botany*, *53*(377), 2115-2119.

Maroto, J. (1995). Hortalizas aprovechables por sus frutos: Tomate In: *\_*. 355-399.

Mart, K. B., Veneklaas, E. J., & Bramley, H. (2016). Osmotic potential at full turgor: an easily measurable trait to help breeders select for drought tolerance in wheat. *Plant Breeding*, *135*(3), 279-285.

Martí, R., Roselló, S., & Cebolla-Cornejo, J. (2016). Tomato as a Source of Carotenoids and Polyphenols Targeted to Cancer Prevention. *Cancers*, *8*(6), 58.

Martinez, V., & Lauchli, A. (1993). Effects of  $Ca^{2+}$  on the salt-stress response of barley roots as observed by in-vivo p-31-nuclear magnetic-resonance and in-vitro analysis. *Planta*, 190(4), 519-524.

Martinez, V., Mestre, T. C., Rubio, F., Girones-Vilaplana, A., Moreno, D. A., Mittler, R., & Rivero, R. M. (2016). Accumulation of Flavonols over Hydroxycinnamic Acids Favors Oxidative Damage Protection under Abiotic Stress. *Frontiers in Plant Science*, 7.

Martinez, V., Nieves-Cordones, M., Lopez-Delacalle, M., Rodenas, R., Mestre, T. C., Garcia-Sanchez, F., Rivero, R. M. (2018). Tolerance to Stress Combination in Tomato Plants: New Insights in the Protective Role of Melatonin. *Molecules*, 23(3).

Mestre, T. C., Garcia-Sanchez, F., Rubio, F., Martinez, V., & Rivero, R. M. (2012). Glutathione homeostasis as an important and novel factor controlling blossom-end rot development in calcium-deficient tomato fruits. 169(17), 1719-1727.

Metwali, E. M. R., Soliman, H. I. A., Fuller, M. P., & Almaghrabi, O. A. (2015). Improving fruit quality in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) under heat stress by silencing the vis 1 gene using small interfering RNA technology. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 121(1), 153-166.

Mieslerova, B., Lebeda, A., & Chetelat, R. T. (2000). Variation in response of wild *Lycopersicon* and *Solanum* spp. against tomato powdery mildew (*Oidium lycopersici*). *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift*, 148(5), 303-311.

Miller, G., Shulaev, V., & Mittler, R. (2008). Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum*, 133(3), 481-489.

Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environment*, 33(4), 453-467.

Miller, P., & J. Rivington, L. (1754). *The gardener's dictionary*, Abridged.

Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, 11(1), 15-19.

Mittler, R., & Blumwald, E. (2010). Genetic Engineering for Modern Agriculture: Challenges and Perspectives. In S. Merchant, W. R. Briggs, & D. Ort (Eds.), *Annual Review of Plant Biology*, Vol 61 (Vol. 61, pp. 443-462).

Mittler, R., Finka, A., & Goloubinoff, P. (2012). How do plants feel the heat? *Trends in Biochemical Sciences*, 37(3), 118-125.

Mittova, V., Guy, M., Tal, M., & Volokita, M. (2002). 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. *Free Radical Research*, 36(2), 195-202.

Monk, L. S., Fagerstedt, K. V., & Crawford, R. M. M. (1989). Oxygen-toxicity and superoxide-dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiologia Plantarum*, 76(3), 456-459.

Morrissey, J., & Guerinot, M. L. (2009). Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *109*(10), 4553-4567.

Muller, J., Boller, T., & Wiemken, A. (1995). Trehalose and trehalase in plants: Recent developments. *Plant Science*, 112(1), 1-9.

Munns, R. (1993). Physiological processes limiting plant-growth in saline soils - some dogmas and hypotheses. *Plant Cell and Environment*, 16(1), 15-24.

Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist*, 167(3), 645-663.

Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.

Navarro, J. M., Garrido, C., Martinez, V., & Carvajal, M. (2003). Water relations and xylem transport of nutrients in pepper plants grown under two different salts stress regimes. *Plant Growth Regulation*, 41(3), 237-245.

Nedjimi, B. (2011). Is salinity tolerance related to osmolytes accumulation in *Lygeum spartum* L. seedlings? , *10*(2), 81-87.

Nieves-Cordones, M., Rodenas, R., Lara, A., Martinez, V., & Rubio, F. (2019). The combination of K<sup>+</sup> deficiency with other environmental stresses: What is the outcome? *Physiologia Plantarum*, 165(2), 264-276.

Nieves-Cordones, M., Lara, A., Ródenas, R., Amo, J., Rivero, R. M., Martínez, V. environment. (2019). Modulation of K<sup>+</sup> translocation by AKT1 and AtHAK5 in Arabidopsis plants.

Nösberger, J., Long, S. P., Norby, R. J., Stitt, M., Hendrey, G. R., & Blum, H. (2006). *Managed ecosystems and CO<sub>2</sub>: case studies, processes, and perspectives* (Vol. 187): Springer Science & Business Media.

Nxele, X., Klein, A., & Ndimba, B. K. (2017). Drought and salinity stress alters ROS accumulation, water retention, and osmolyte content in sorghum plants. *South African Journal of Botany*, 108, 261-266.

Ohama, N., Sato, H., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). Transcriptional Regulatory Network of Plant Heat Stress Response. *Trends in Plant Science*, 22(1), 53-65.

Oztekin, G. B., & Tuzel, Y. (2011). Comparative salinity responses among tomato genotypes and rootstocks. *Pakistan Journal of Botany*, 43(6), 2665-2672.

Paran, I., Goldman, I., Tanksley, S. D., & Zamir, D. (1995). Recombinant inbred lines for genetic-mapping in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 90(3-4), 542-548.

Parida, A. K., & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3), 324-349.

Patil, A. V., & Chavan, P. (2011). Influence of salt stress on phosphorus metabolism in the roots and leaves of one month old *Prosopis juliflora* (Sw.) DC seedlings. 3(25), 48-51.

Paulson, K., & Stevens, M. (1974). Relationships among titratable acidity, pH and buffer composition of tomato fruits. 39(2), 354-357.

Peleg, Z., Apse, M., & Blumwald, E. (2011). Engineering Salinity and Water-Stress Tolerance in Crop Plants: Getting Closer to the Field. *Plant Responses to Drought and Salinity Stress - Developments in a Post-Genomic Era*, 57, 405-443.

Penella, C., Landi, M., Guidi, L., Nebauer, S. G., Pellegrini, E., Bautista, A. S., Calatayud, A. (2016). Salt-tolerant rootstock increases yield of pepper under

salinity through maintenance of photosynthetic performance and sinks strength. *Journal of Plant Physiology*, 193, 1-11.

Peralta, I., & Spooner, D. (2000). Classification of wild tomatoes: a review. *28(1)*, 45-54.

Pinero, M. C., Houdusse, F., Garcia-Mina, J. M., Garnica, M., & del Amor, F. M. (2014). Regulation of hormonal responses of sweet pepper as affected by salinity and elevated CO<sub>2</sub> concentration. *Physiologia Plantarum*, 151(4), 375-389.

Pitzschke, A., Forzani, C., & Hirt, H. (2006). Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9-10), 1757-1764.

Pollard, D. A. (2012). Design and construction of recombinant inbred lines. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 871, 31-39.

Poudyal, D., Rosenqvist, E., & Ottosen, C. O. (2019). Phenotyping from lab to field - tomato lines screened for heat stress using F-v/F-m maintain high fruit yield during thermal stress in the field. *Functional Plant Biology*, 46(1), 44-55.

Prasch, C. M., & Sonnewald, U. (2015). Signaling events in plants: Stress factors in combination change the picture. *Environmental and Experimental Botany*, 114, 4-14.

Pullagurala, V. L. R., Adisa, I. O., Rawat, S., Kalagara, S., Hernandez-Viezcas, J. A., Peralta-Video, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2018). ZnO nanoparticles increase photosynthetic pigments and decrease lipid peroxidation in soil grown cilantro (*Coriandrum sativum*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 132, 120-127.

Putra, A. P., & Yuliando, H. (2015). Soilless Culture System to Support Water Use Efficiency and Product Quality: a Review. In A. D. Guritno, E. Schlich, & E. Pawelzik (Eds.), *International Conference on Agro-Industry* (Vol. 3, pp. 283-288).

Qu, C. X., Liu, C., Gong, X. L., Li, C. X., Hong, M. M., Wang, L., & Hong, F. S. (2012). Impairment of maize seedling photosynthesis caused by a combination of potassium deficiency and salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 75, 134-141.

Ranc, N., Munos, S., Santoni, S., & Causse, M. (2008). A clarified position for *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* in the evolutionary history of tomatoes (solanaceae). *Bmc Plant Biology*, 8, 16.

Rao, A., & Agarwal, S. (1999). Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. 19(2), 305-323.

Rao, E. S., Kadirvel, P., Symonds, R. C., & Ebert, A. W. (2013). Relationship between survival and yield related traits in *Solanum pimpinellifolium* under salt stress. *Euphytica*, 190(2), 215-228.

Rashid, M. A., Andersen, M. N., Wollenweber, B., Zhang, X. Y., & Olesen, J. E. (2018). Acclimation to higher VPD and temperature minimized negative effects on assimilation and grain yield of wheat. *Agricultural and Forest Meteorology*, 248, 119-129.

Razali, R., Bougouffa, S., Morton, M. J. L., Lightfoot, D. J., Alam, I., Essack, M., Negrao, S. (2018). The Genome Sequence of the Wild Tomato *Solanum pimpinellifolium* Provides Insights Into Salinity Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 9.

Rick, C. M., & Fobes, J. F. (1975). Symposium on biochemical systematics, genetics and origin of cultivated plants .10. allozyme variation in cultivated tomato and closely related species. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 102(6), 376-384.

Rivero, R. M., Kojima, M., Gepstein, A., Sakakibara, H., Mittler, R., Gepstein, S., & Blumwald, E. (2007). Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), 19631-19636.

Rivero, R. M., Mestre, T. C., Mittler, R., Rubio, F., Garcia-Sanchez, F., & Martinez, V. (2014). The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants. *Plant Cell and Environment*, 37(5), 1059-1073.

Rivero, R. M., Mestre, T. C., Mittler, R. O. N., Rubio, F., Garcia-Sanchez, F., & Martinez, V. (2013). The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants. *Plant, Cell & Environment*, n/a-n/a.

Rivero, R. M., Oliver, M. J., & Mittler, R. (2019). Editorial. *Physiologia Plantarum*, 165(2), 125-127.

Rivero, R. M., Ruiz, J. M., Garcia, P. C., Lopez-Lefebvre, L. R., Sanchez, E., & Romero, L. (2001). Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science*, 160(2), 315-321.

Rodríguez-Burruezo, S., Prohens, J., Roselló, J., Nuez, F., & Biotechnology. (2005). "Heirloom" varieties as sources of variation for the improvement of fruit quality in greenhouse-grown tomatoes. 80(4), 453-460.

Rodríguez-Ortega, W. M., Martínez, V., Nieves, M., Simón, I., Lidón, V., Fernandez-Zapata, J. C., García-Sánchez, F. (2019). Agricultural and Physiological Responses of Tomato Plants Grown in Different Soilless Culture Systems with Saline Water under Greenhouse Conditions. *Scientific Reports*, 9(1), 6733-6733.

Rodriguez, D., Reza, J., Martinez, J., Lao, M. T., & Urrestarazu, M. (2014). Effect of controlling the leaching fraction on the fertigation and production of a tomato crop under soilless culture. *Scientia Horticulturae*, 179, 153-157.

Romero-Aranda, R., Soria, T., & Cuartero, J. (2001). Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Science*, 160(2), 265-272.

Rosadi, B., Senge, M., Suhandy, D., & Tusi, A. (2014). The Effect of EC Levels of Nutrient Solution on the Growth, Yield, and Quality of Tomatoes (*Solanum Lycopersicum*) under the Hydroponic System. *Agricultural Engineering and Biotechnology* (2331-3463), 2, 7-12.

Rossi, M., Bermudez, L., & Carrari, F. (2015). Crop yield: challenges from a metabolic perspective. 25, 79-89.

Saini, H., Rahmani Eliato, K., Silva, C., Allam, M., Mouneimne, G., Ros, R., Bioengineering, M. (2018). The Role of Desmoplasia and Stromal Fibroblasts on Anti-cancer Drug Resistance in a Microengineered Tumor Model. 11(5), 419-433.

Sainju, U. M., Dris, R., & Singh, B. (2003). Mineral nutrition of tomato. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 1(2), 176-183.

Salt, D. E., Baxter, I., & Lahner, B. (2008). Ionomics and the study of the plant ionome. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 709-733.

Saltveit, M. E., & Technology. (2005). Influence of heat shocks on the kinetics of chilling-induced ion leakage from tomato pericarp discs. 36(1), 87-92.

Sanchez-Rodriguez, E., Leyva, R., Constan-Aguilar, C., Romero, L., & Ruiz, J. M. (2014). How does grafting affect the ionome of cherry tomato plants under water stress? *Soil Science and Plant Nutrition*, 60(2), 145-155.

Sato, S., Peet, M. M., & Thomas, J. F. (2000). Physiological factors limit fruit set of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) under chronic, mild heat stress. *Plant Cell and Environment*, 23(7), 719-726.

Sato, S., Sakaguchi, S., Furukawa, H., & Ikeda, H. (2006). Effects of NaCl application to hydroponic nutrient solution on fruit characteristics of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). 109(3), 248-253.

Shabala, S., & Cuin, T. A. (2008). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum*, 133(4), 651-669.

Sharma, D. K., Andersen, S. B., Ottosen, C.-O., & Rosenqvist, E. (2015). Wheat cultivars selected for high F-v/F-m under heat stress maintain high photosynthesis, total chlorophyll, stomatal conductance, transpiration and dry matter. *Physiologia Plantarum*, 153(2), 284-298.

Sheldon, A. R., Dalal, R. C., Kirchhof, G., Kopittke, P. M., Menzies, N. W., & Soil. (2017). The effect of salinity on plant-available water. 418(1-2), 477-491.

Shenker, M., Plessner, O. E., & Tel-Or, E. (2004). Manganese nutrition effects on tomato growth, chlorophyll concentration, and superoxide dismutase activity. 161(2), 197-202.

Shrivastava, P., & Kumar, R. (2015). Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(2), 123-131.

Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G., & Mittler, R. (2008). Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum*, 132(2), 199-208.



Siddiqui, M. H., Alamri, S. A., Al-Khaishany, M. Y. Y., Al-Qutami, M. A., Ali, H. M., & Khan, M. N. (2017). Sodium nitroprusside and indole acetic acid improve the tolerance of tomato plants to heat stress by protecting against DNA damage. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 177-186.

Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *91*(3), S31-S38.

Silva, E. N., Vieira, S. A., Ribeiro, R. V., Ponte, L. F. A., Ferreira-Silva, S. L., & Silveira, J. A. G. (2013). Contrasting Physiological Responses of *Jatropha curcas* Plants to Single and Combined Stresses of Salinity and Heat. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(1), 159-169.

Sonneveld, C., & Voogt, W. (2009). Plant nutrition in future greenhouse production. In *Plant Nutrition of Greenhouse Crops* (pp. 393-403): Springer.

Stoop, J. M. H., Williamson, J. D., & Pharr, D. M. (1996). Mannitol metabolism in plants: A method for coping with stress. *Trends in Plant Science*, 1(5), 139-144.

Sun, C. X., Gao, X. X., Fu, J. Q., Zhou, J. H., & Wu, X. F. (2015). Metabolic response of maize (*Zea mays* L.) plants to combined drought and salt stress. *Plant and Soil*, 388(1-2), 99-117.

Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E., & Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*, 203(1), 32-43.

Taibi, K., Taibi, F., Abderrahim, L. A., Ennajah, A., Belkhodja, M., & Miguel Mulet, J. (2016). Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. *South African Journal of Botany*, 105, 306-312.

Tan, W., Meng, Q. W., Brestic, M., Olsovska, K., & Yang, X. (2011). Photosynthesis is improved by exogenous calcium in heat-stressed tobacco plants. *Journal of Plant Physiology*, 168(17), 2063-2071.

Tanksley, S. D., Medina-Filho, H., & Rick, C. M. (1982). Use of naturally-occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato. *49*(1), 11.

Taylor, I., Linforth, R., Al-Naieb, R., Bowman, W., Marples, B., & Environment. (1988). The wilted tomato mutants *flacca* and *sitiens* are impaired in the oxidation of ABA-aldehyde to ABA. *11*(8), 739-745.

Terzi, R., Guler, N. S., Guven, F. G., & Kadioglu, A. (2018). Alpha lipoic acid treatment induces the antioxidant system and ameliorates lipid peroxidation in maize seedlings under osmotic stress. *Archives of Biological Sciences*, *70*(3), 503-511.

Thompson, K. A., Marshall, M. R., Sims, C. A., Wei, C. I., Sargent, S. A., & Scott, J. W. (2000). Cultivar, maturity, and heat treatment on lycopene content in tomatoes. *Journal of Food Science*, *65*(5), 791-795.

Tieman, D., Zhu, G., Resende, M. F., Lin, T., Nguyen, C., Bies, D., . . . Zhang, B. (2017). A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor. *355*(6323), 391-394.

Ties, P., & Barringer, S. (2012). Influence of lipid content and lipoxygenase on flavor volatiles in the tomato peel and flesh. *77*(7), C830-C837.

Tirolí-Cepeda, A. O., & Ramos, C. H. (2010). Heat causes oligomeric disassembly and increases the chaperone activity of small heat shock proteins from sugarcane. *Plant Physiology and Biochemistry*, *48*(2-3), 108-116.

Torres, C. A., Andrews, P. K., & Davies, N. M. (2006). Physiological and biochemical responses of fruit exocarp of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants to natural photo-oxidative conditions. *Journal of Experimental Botany*, *57*(9), 1933-1947.

Torun, H. (2019). Time-course analysis of salicylic acid effects on ROS regulation and antioxidant defense in roots of hulled and hullless barley under combined stress of drought, heat and salinity. *Physiol Plant*, *165*(2), 169-182.

Tuna, A. (2014). Influence of foliarly applied different triazole compounds on growth, nutrition, and antioxidant enzyme activities in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Under salt stress. *Australian Journal of Crop Science*, *8*, 71-79.

Turner, N. C. (2018). Turgor maintenance by osmotic adjustment: 40 years of progress. *Journal of Experimental Botany*, *69*(13), 3223-3233.

Urrestarazu, M. (2013). State of the Art and New Trends of Soilless Culture in Spain and in Emerging Countries. In F. X. Martinez, W. R. Carlile, & S. Bures (Eds.), *International Symposium on Growing Media, Composting and Substrate Analysis* (Vol. 1013, pp. 305-312).

van de Wiel, C., Van der Linden, C. G., & Scholten, O. (2015). Improving phosphorus use efficiency in Agriculture: opportunities for breeding. *Euphytica*, 207.

Vogel, J. T., Tieman, D. M., Sims, C. A., Odabasi, A. Z., Clark, D. G., Klee, H. J., & Agriculture. (2010). Carotenoid content impacts flavor acceptability in tomato (*Solanum lycopersicum*). 90(13), 2233-2240.

Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61, 199-223.

Wang, L., Baldwin, E. A., & Bai, J. (2016). Recent Advance in Aromatic Volatile Research in Tomato Fruit: The Metabolisms and Regulations. *Food and Bioprocess Technology*, 9(2), 203-216.

Wang, L. J., & Li, S. H. (2006). Salicylic acid-induced heat or cold tolerance in relation to Ca<sup>2+</sup> homeostasis and antioxidant systems in young grape plants. *Plant Science*, 170(4), 685-694.

Wang, Y., Yu, Q., Tang, X., & Wang, L. (2009). Calcium pretreatment increases thermotolerance of *Laminaria japonica* sporophytes. *Progress in Natural Science-Materials International*, 19(4), 435-442.

Warner, J., Zhang, T. Q., & Hao, X. (2004). Effects of nitrogen fertilization on fruit yield and quality of processing tomatoes. *Canadian Journal of Plant Science*, 84(3), 865-871.

White, P. J., & Broadley, M. R. (2003). Calcium in plants. *Annals of Botany*, 92(4), 487-511.

Willcox, J. K., Catignani, G. L., & Lazarus, S. (2003). Tomatoes and cardiovascular health.

Wise, R. R., Olson, A. J., Schrader, S. M., & Sharkey, T. D. (2004). Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima cotton plants at high temperature. *Plant, cell and environment*, 27(6), 717-724.

Xu, S., Li, J., Zhang, X., Wei, H., & Cui, L. (2006). Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. *Environmental and Experimental Botany*, 56(3), 274-285.

Yang, S.-H., Wang, L.-J., Li, S.-H., Duan, W., Loescher, W., & Liang, Z.-C. (2007). The effects of UV-B radiation on photosynthesis in relation to Photosystem II photochemistry, thermal dissipation and antioxidant defenses in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings at different growth temperatures. *Functional Plant Biology*, 34(10), 907-917.

Yang, W. J., Rich, P. J., Axtell, J. D., Wood, K. V., Bonham, C. C., Ejeta, G., Rhodes, D. (2003). Genotypic variation for glycinebetaine in sorghum. *Crop Science*, 43(1), 162-169.

Yeo, A. R., & Flowers, T. J. (1986). Salinity resistance in rice (*Oryza sativa* L) and a pyramiding approach to breeding varieties for saline soils. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13(1), 161-173.

Yokoi, S., Quintero, F. J., Cubero, B., Ruiz, M. T., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., & Pardo, J. M. (2002). Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in the salt stress response. *Plant Journal*, 30(5), 529-539.

Yurtseven, E., Kesmez, G., & Ünlükara, A. (2005). The effects of water salinity and potassium levels on yield, fruit quality and water consumption of a native central anatolian tomato species (*Lycopersicon esculantum*). 78(1-2), 128-135.

Zandalinas, S. I., Balfagon, D., Arbona, V., & Gomez-Cadenas, A. (2017). Modulation of Antioxidant Defense System Is Associated with Combined Drought and Heat Stress Tolerance in Citrus. *Frontiers in Plant Science*, 8.

Zandalinas, S. I., Mittler, R., Balfagon, D., Arbona, V., & Gomez-Cadenas, A. (2018). Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum*, 162(1), 2-12.

Zhang, J., Jiang, X. D., Li, T. L., & Cao, X. J. (2014). Photosynthesis and ultrastructure of photosynthetic apparatus in tomato leaves under elevated temperature. *Photosynthetica*, 52(3), 430-436.

Zhang, J. X., Klueva, N. Y., Wang, Z., Wu, R., Ho, T. H. D., & Nguyen, H. T. (2000). Genetic engineering for abiotic stress resistance in crop plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36(2), 108-114.

Zhang, P., Senge, M., & Dai, Y. (2017). Effects of Salinity Stress at Different Growth Stages on Tomato Growth, Yield, and Water-Use Efficiency. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 48(6), 624-634.

Zheng, Y. L., Yin, X. H., & Ma, H. C. (2018). Effects of hydrogen peroxide on seed germination, seedling growth and physiological characteristics of bombax ceiba after heat shock. *Pakistan Journal of Botany*, 50(4), 1327-1333.

Zhu, G., Wang, S., Huang, Z., Zhang, S., Liao, Q., Zhang, C., Huang, S. (2018). Rewiring of the Fruit Metabolome in Tomato Breeding. *Cell*, 172(1-2), 249+.

Zizkova, E., Dobrev, P. I., Muhovski, Y., Hosek, P., Hoyerova, K., Haisel, D., Hichri, I. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) SIIPT3 and SIIPT4 isopentenyltransferases mediate salt stress response in tomato. *Bmc Plant Biology*, 15.

Zuriaga, E., Blanca, J. M., Cordero, L., Sifres, A., Blas-Cerdan, W. G., Morales, R., & Nuez, F. (2009). Genetic and bioclimatic variation in *Solanum pimpinellifolium*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(1), 39-51.



