



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Respuesta de las Plantas de Tomate a la
Combinación de Salinidad y Altas Temperaturas

D^a. Teresa Mestre Ortuño

2014



Respuesta de las Plantas de Tomate a la Combinación de Salinidad y Altas Temperaturas

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor por la
Universidad de Murcia

Teresa Mestre Ortuño

2014

Directores de la Tesis:

Vicente Martínez López

Profesor de Investigación CEBAS-CSIC

Rosa M. Rivero Vargas

Científico Titular CEBAS-CSIC

Tutor:

Juan Cuello Moreno

Catedrático Universidad de Murcia

Agradecimientos

Me gustaría aprovechar la ocasión para expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis, Dr Vicente Martínez López y Dra Rosa M Rivero Vargas, por su dirección y apoyo durante estos años, en los cuales hemos trabajado mucho para sacar adelante este trabajo, y que sin su esfuerzo no hubiese sido posible.

También hacer extensa mi gratitud a los doctores Paco Rubio, Paco García y M^a Ángeles Botella por haber estado siempre dispuestos a ofrecerme su ayuda y colaboración.

A Cristóbal Uauy por haberme acogido en su grupo de investigación en el JIC y por todo lo que aprendí de él. A Vanesa por su atención.

Al Catedrático Juan Cuello Moreno, por su tutoría en la Universidad de Murcia.

A mis compañeros y amigos: Fernando C., mi compañero en el 1.22, por su amistad, por el buen ambiente y por esas tardes eternas. A Diana por todos los buenos ratos. A José, siempre dispuesto a ayudarme y sacarme una sonrisa. A Wilbert, Vicente G., Fernando A., Manolo, Laura, ya doctores y de los que he aprendido mucho. A Julio y Sabina, por hacerme muy llevadero todos los experimentos en el invernadero, por su ayuda y amistad. A Reyes, Silvia y Lidia por mantener este buen ambiente de trabajo que siempre hubo. A Javier, Clara, Mario, Bea, César, Maika, Manolo, M^a José, Ana, Gregorio, Jorge, etc. Y como no, a mis compañeros y amigos del máster, por los buenos momentos de desconexión.

A todos mis amigos, fuera del CEBAS, porque siempre están ahí.

A mi familia, padres y hermanos, por su apoyo incondicional, por haber creído siempre en que sería capaz y siempre orgullosos pase lo que pase. También a mi familia política porque siempre me han hecho sentir como una más.

A Víctor, por haber estado siempre a mi lado, por haber creído en mi más que yo, y por TODO, GRACIAS.

A mis padres y a Víctor

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADP: adenosín difosfato

ADPG: ADP-glucosa

AI: invertasa ácida

APX: ascorbato peroxidasa

AsA: ascorbato

ATP: adenosín trifosfato

BADH: betaína aldehído deshidrogenasa

BER: blossom-end rot o podredumbre apical

CAT: catalasa

cDNA: ADN complementario, sintetizado a partir de ARN mensajero

Cl⁻: cloruro

CMO: colina monooxigenasa

CRA: contenido relativo de agua

DHA: dehidroascorbato

DHAR: dehidroascorbato reductasa

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

dNTPs: desoxinucleósidos trifosfato

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FAO: Organización para la Alimentación y la Agricultura

FBPasa: fructosa 1, 6-bifosfatasa

FK: fructoquinasa

***Fm*:** valor máximo de fluorescencia en hojas adaptadas a la oscuridad

***Fm*':** máxima fluorescencia en hojas adaptadas a la luz después de aplicar un pulso saturante de luz actínica

FruP6: fructosa-6-fosfato

***Fo*:** fluorescencia mínima de hojas adaptadas a la oscuridad)

***Fo*':** fluorescencia mínima en hojas adaptadas a luz después de un pulso de luz roja

***Fs*:** fluorescencia estable a cualquier nivel de luz

Ca²⁺: calcio

***Fv/Fm*:** máxima eficiencia cuántica de los centros de reacción del PSII.

***Fv*:** componente variable de la fluorescencia (*Fm-Fo*)

G6P: glucosa-6-fosfato

G6PDH: glucosa-6- fosfato deshidrogenasa

GB: Glicina betaína

GR: glutatión reductasa

GSA: glutamil semialdehido

GSH: glutatión

GSSG: glutatión oxidado

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés, high pressure liquid chromatography)

HRP: peroxidasa de rábano (del inglés, horseradish peroxidase)

ICP: espectrofotómetro de iones acoplado a plasma

K⁺: potasio

MDA: Malondialdehido

MDHAR: monodehidroascorbato reductasa

mRNA: ARN mensajero

Na⁺: sodio

NAD(P)H: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)

NI: invertasa neutra

NTB: nitroazul de tetrazolio (del inglés, nitroblue tetrazolium)

O^{•-}: ion superóxido

OAT: ornitina aminotransferasa

P5C: Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato

P5CDH: Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa

P5CR: Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato reductasa

P5CS: Δ^1 -pirrolin-5-carboxilato sintetasa

PBS: buffer fosfato

PDH: prolina deshidrogenasa

PDX: peroxidasa

PF: peso fresco

PMSF: fluoruro de fenolmetilsulfonil

PO: prolina oxidasa

PS: peso seco

PSII: Fotosistema II

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

ROS: especies reactivas de oxígeno (del inglés reactive reactive oxygen species)

SO₄²⁻: sulfato

SOD: superóxido dismutasa

SPP: sacarosa-6-fosfato fosfatasa

SPS: sacarosa-6-fosfato sintasa

SS: almidón sintasa (en inglés starch synthase)

SS: sacarosa sintetasa

SST: sólidos solubles totales

T6P: trehalosa-6 fosfato

T6PS: Trehalosa-6-fosfato sintasa

TPP: trehalosa-6-fosfato fosfatasa

TPS: trehalosa fosfato sintasa

TRE1: trehalasa 1

UDP: uridín difosfato

UDPG: UDP-glucosa

Ψ_P: potencial de turgor

Ψ_π: potencial hídrico

Ψ_π: potencial osmótico

Índice

| | | |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. | INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. | El cultivo del tomate..... | 3 |
| 1.1.1. | El cultivo de tomate en el mundo..... | 3 |
| 1.1.2. | El cultivo de tomate en la Región de Murcia..... | 6 |
| 1.1.3. | Valor comercial, nutricional y calidad del tomate..... | 6 |
| 1.1.4. | Origen, taxonomía y descripción botánica..... | 10 |
| 1.1.5. | Tomate cv. Micro-Tom..... | 14 |
| 1.2. | Estrés abiótico..... | 15 |
| 1.2.1. | Efectos de la salinidad..... | 15 |
| 1.2.2. | Efectos de las altas temperaturas..... | 17 |
| 1.2.3. | Combinación de estreses..... | 18 |
| 1.3. | Cambios metabólicos y fisiológicos inducidos por los distintos estreses abióticos..... | 19 |
| 1.3.1. | Acumulación de osmoprotectores..... | 21 |
| 1.3.2. | Estrés oxidativo..... | 32 |
| 1.3.3. | Calidad de los frutos..... | 35 |
| 1.3.4. | Podredumbre apical o Blossom-end rot (BER) en tomate..... | 36 |
| 2. | OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO..... | 43 |
| 2.1. | Objetivos..... | 45 |
| 2.1.1. | Objetivo 1. Establecer la respuesta de tomate a la combinación de dos estreses, salinidad y altas temperaturas..... | 46 |
| 2.1.2. | Objetivo 2. Profundizar en los mecanismos relacionados con el desarrollo de la podredumbre apical o blossom-end rot (BER), fisiopatía relacionada con los estreses abióticos estudiados..... | 46 |
| 2.2. | Plan de trabajo..... | 46 |
| 2.2.1. | Objetivo 1..... | 46 |
| 2.2.2. | Objetivo 2..... | 47 |

| | | |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3. | MATERIAL Y MÉTODOS | 49 |
| 3.1. | Material vegetal | 51 |
| 3.2. | Experimento en invernadero | 51 |
| 3.2.1. | Respuesta agronómica y fisiológica de tomate a la combinación de salinidad y altas temperaturas | 51 |
| 3.3. | Experimentos en cámara de cultivo | 61 |
| 3.3.1. | Experimento 1 b. Respuesta primaria de la planta de tomate a la combinación de salinidad y altas temperaturas. Aspectos fisiológicos, bioquímicos y moleculares | 63 |
| 3.3.2. | Experimento 2. Mecanismos responsables de la aparición de la podredumbre apical o blossom-end rot (BER) en frutos de tomate en plantas sometidas a deficiencia de calcio | 65 |
| 3.4. | Técnicas analíticas utilizadas | 68 |
| 3.4.1. | Rendimiento de los frutos | 68 |
| 3.4.2. | Determinación del peso fresco y peso seco de las plantas | 68 |
| 3.4.3. | Análisis del contenido mineral en material vegetal | 69 |
| 3.4.4. | Absorción y transporte de nutrientes en la planta | 69 |
| 3.4.5. | Relaciones hídricas en las plantas..... | 70 |
| 3.4.6. | Intercambio gaseoso y parámetros de fluorescencia de clorofilas | 72 |
| 3.4.7. | Determinación de los parámetros de calidad en frutos de tomate | 73 |
| 3.4.8. | Determinación de la concentración de osmoprotectores | 76 |
| 3.4.9. | Determinación de actividades enzimáticas | 79 |
| 3.4.10. | Determinación de la concentración de H ₂ O ₂ | 87 |
| 3.4.11. | Oxidación proteica y actividad proteolítica..... | 88 |
| 3.4.12. | Técnicas moleculares | 89 |
| 3.5. | Análisis estadístico | 90 |

| | | |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 93 |
| 4.1. | Respuesta agronómica y fisiológica de tomate a la combinación de salinidad y altas temperaturas | 95 |
| 4.1.1. | Rendimiento y calidad de frutos..... | 95 |
| 4.1.2. | Desarrollo de las plantas | 111 |
| 4.1.3. | Estado nutricional del cultivo | 117 |
| 4.1.4. | Discusión | 123 |
| 4.2. | Respuesta primaria de la planta de tomate a la combinación de salinidad y altas temperaturas. Aspectos fisiológicos, bioquímicos y moleculares..... | 133 |
| 4.2.1. | Crecimiento vegetativo | 133 |
| 4.2.2. | Concentración de Na ⁺ y K ⁺ | 134 |
| 4.2.3. | Absorción y transporte de Na ⁺ y K ⁺ | 136 |
| 4.2.4. | Relaciones hídricas en la planta | 138 |
| 4.2.5. | Parámetros fotosintéticos | 139 |
| 4.2.6. | Síntesis y acumulación de osmoprotectores | 141 |
| 4.2.7. | Determinación de las actividades enzimáticas | 145 |
| 4.2.8. | Determinación la expresión de los principales genes implicados..... | 148 |
| 4.2.9. | Estrés oxidativo y oxidación proteica..... | 150 |
| 4.2.10. | Discusión | 152 |
| 4.3. | Mecanismos responsables de la aparición de la podredumbre apical o blossom-end rot (BER) en frutos de tomate en plantas sometidas a deficiencia de calcio | 161 |
| 4.3.1. | Biomasa y producción, incidencia de BER y concentración de Ca ²⁺ en hojas y frutos..... | 161 |
| 4.3.2. | Concentración de peróxido de hidrógeno y peroxidación lipídica..... | 164 |
| 4.3.3. | CAT, SOD y enzimas antioxidantes de la ruta ascorbato-glutatión. | 166 |
| 4.3.4. | Formas de ascorbato y glutatión..... | 168 |
| 4.3.5. | Discusión | 171 |

| | | |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5. | CONCLUSIONES | 179 |
| 5.1. | Respuesta agronómica y fisiológica de tomate a la combinación de salinidad y altas temperaturas | 181 |
| 5.2. | Respuesta primaria de la planta de tomate a la combinación de salinidad y altas temperaturas. Aspectos fisiológicos, bioquímicos y moleculares..... | 182 |
| 5.3. | Mecanismos responsables de la aparición de la podredumbre apical o blossom-end rot (BER) en frutos de tomate en plantas sometidas a deficiencia de calcio | 183 |
| 6. | BIBLIOGRAFÍA | 185 |

1. Introducción

1.1. El cultivo del tomate

1.1.1. El cultivo de tomate en el mundo

El cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.), es uno de los más extendidos en la actualidad y de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. El incremento anual de la producción en los últimos años se debe principalmente al aumento en el rendimiento y, en menor proporción, al aumento de la superficie cultivada.

Según los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2011) en el año 2011 se produjeron en el mundo 157.35 MMt (millones de toneladas) de tomates frescos, y es en las regiones tropicales y subtropicales donde se encuentran los mayores productores a nivel mundial. China es el mayor productor, con 48.45 MMt, le sigue India y EE.UU con una producción de 16.83 y 12.53 MMt, respectivamente. España se encuentra en la posición número 9 con algo más de 3.8 MMt. En la figura 1.1 se puede ver la producción de los 20 principales países productores en porcentaje de producción, y en la tabla 1.1. en millones de toneladas (MMt) y miles de hectáreas (MHa).

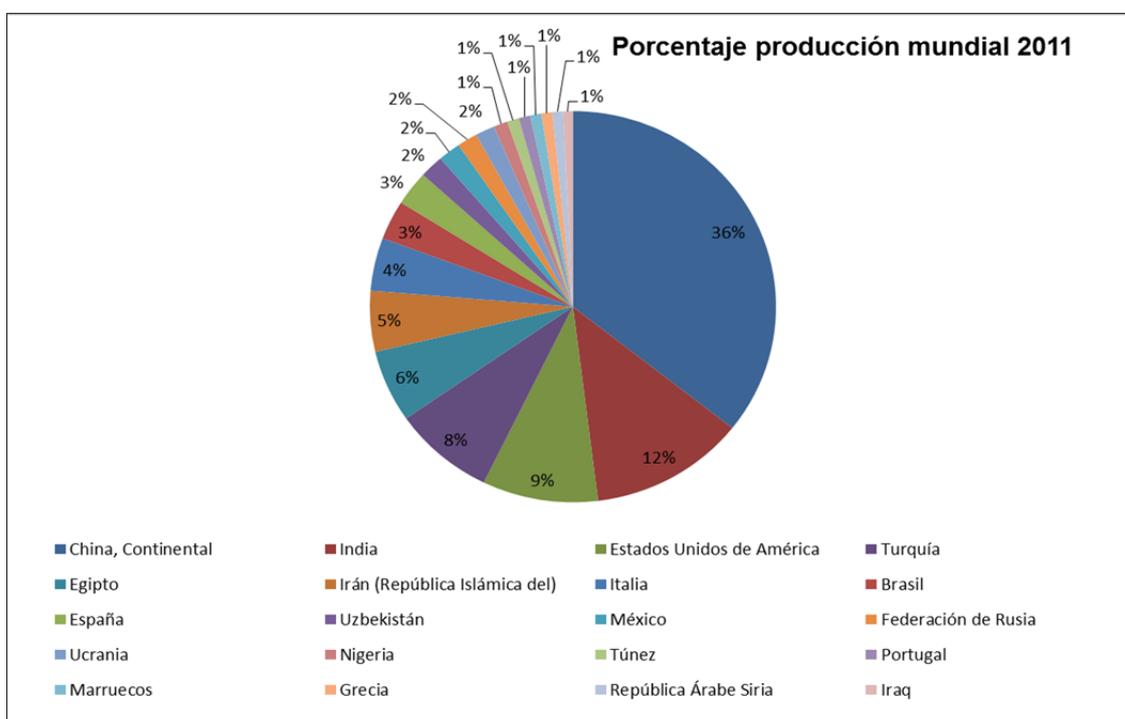


Figura 1.1. Producción mundial de tomate. Fuente: FAO: 2011

Tabla 1.1. Producción mundial de tomate

| Posición | País | Producción (MMt) | Área cosechada (MHa) |
|----------|-------------------------------|------------------|----------------------|
| 1 | China, Continental | 48,45 | 981 |
| 2 | India | 16,83 | 57,302 |
| 3 | Estados Unidos de América | 12,53 | 0,167 |
| 4 | Turquía | 11,00 | 85,9 |
| 5 | Egipto | 8,11 | 0,767 |
| 6 | Irán (República Islámica del) | 6,82 | 0,004 |
| 7 | Italia | 5,95 | 1,595 |
| 8 | Brasil | 4,42 | 71,473 |
| 9 | España | 3,86 | 146,51 |
| 10 | Uzbekistán | 2,59 | 16,584 |
| 11 | México | 2,44 | 1,264 |
| 12 | Federación de Rusia | 2,20 | 0,304 |
| 13 | Ucrania | 2,11 | 0,389 |
| 14 | Nigeria | 1,50 | 0,034 |
| 15 | Túnez | 1,28 | 5,674 |
| 16 | Portugal | 1,25 | 0,381 |
| 17 | Marruecos | 1,22 | 0,263 |
| 18 | Grecia | 1,17 | 0,303 |
| 19 | República Árabe Siria | 1,15 | 0,254 |
| 20 | Iraq | 1,06 | 0,032 |

Fuente: FAO Static. 2011

El cultivo del tomate está bastante extendido en España, encontrándose las mayores producciones en Extremadura, Andalucía, Región de Murcia, Navarra y Galicia. (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Superficie y producción del cultivo del tomate en España

| Provincias y Comunidades Autónomas | Superficie (hectáreas) | | | Total | Rendimiento (kg/ha) | | | Producción (toneladas) |
|------------------------------------|------------------------|------------|--------------|--------------|---------------------|--------------|----------------|------------------------|
| | Secano | Regadío | | | Secano | Regadío | | |
| | | Aire libre | Protegido | | | Aire libre | Protegido | |
| GALICIA | – | 237 | 954 | 1.191 | – | 74.76 | 115.642 | 128.040 |
| P. DE ASTURIAS | 40 | 25 | 25 | 90 | 15.000 | 30.00 | 60.000 | 2.850 |
| CANTABRIA | 16 | – | – | 16 | 15.000 | – | – | 240 |
| PAÍS VASCO | 81 | 142 | 70 | 293 | 9.340 | 19.07 | 48.536 | 6.862 |
| NAVARRA | – | 2.231 | 68 | 2.299 | – | 76.86 | 70.930 | 176.331 |
| LA RIOJA | – | 250 | 14 | 264 | – | 63.00 | 85.000 | 16.940 |
| ARAGÓN | – | 867 | 3 | 870 | – | 79.80 | 150.000 | 69.640 |
| CATALUÑA | 49 | 1.278 | 49 | 1.376 | 7.004 | 34.74 | 116.887 | 50.463 |
| BALEARES | 27 | 154 | 97 | 278 | 8.000 | 46.45 | 59.830 | 13.173 |
| CASTILLA Y LEÓN | – | 200 | 38 | 238 | – | 49.28 | 92.903 | 13.385 |
| MADRID | – | 47 | 34 | 81 | – | 45.00 | 83.225 | 4.945 |
| CASTILLA-LA MANCHA | – | 1.500 | – | 1.500 | – | 73.79 | – | 110.683 |
| C. VALENCIANA | 73 | 491 | 639 | 1.203 | 12.493 | 22.65 | 100.828 | 76.460 |
| R. DE MURCIA | – | 496 | 2.764 | 3.260 | – | 62.90 | 114.811 | 348.536 |
| EXTREMADURA | – | 24.93 | 2 | 24.93 | – | 66.18 | 220.000 | 1.650.333 |
| ANDALUCÍA | 53 | 8.120 | 11.511 | 19.684 | 21.028 | 66.18 | 85.558 | 1.523.369 |
| CANARIAS | 46 | 102 | 1.544 | 1.692 | 40.000 | 64.84 | 72.543 | 120.459 |

Fuente: Anuario de Estadística Agraria. Datos 2010-2011

1.1.2. El cultivo de tomate en la Región de Murcia

La Región de Murcia es una de las principales productoras de tomate en el ámbito nacional, gracias a sus inmejorables condiciones climáticas y de suelo. Existen diferentes variedades de producción y comercialización. Las principales variedades de tomate que actualmente se comercializan en la Región de Murcia son las siguientes: tipos Beef, Marmande, Vemone, Moneymaker, Cocktail, Cereza (Cherry), Larga Vida, Liso y Ramillete.

La Región de Murcia, con alrededor de 325.000 toneladas producidas en 2007, es la tercera comunidad autónoma productora de tomate de España. Su producción se destina al mercado en fresco exportándose una gran parte de ella. En esta comunidad, a diferencia de la provincia de Almería, donde predominan los pequeños y medianos productores, la mayor parte de la producción de tomate para fresco es llevada a cabo por grandes empresas con gran capacidad de explotación, sin olvidar la importancia de las cooperativas en este sector. Es de destacar que el destino mayoritario de nuestras exportaciones son los Países Bajos, donde se redistribuye a otros países como complemento de sus exportaciones en los meses improductivos (MAGRAMA, 2011).

1.1.3. Valor comercial, nutricional y calidad del tomate.

Actualmente el tomate es uno de los cultivos hortícolas más importantes en el mundo, y es el segundo fruto más consumido mundialmente (Dorais y col., 2001; Foolad, 2004) después de la patata. En los últimos años, el mercado y los consumidores se han vuelto más exigentes cualitativamente hablando, demandando más tipos de variedades comerciales con mayor calidad, más saludables y nutritivos, por lo que los estudios centrados en aumentar la calidad de los frutos son de gran interés (Dorais y col., 2001; Gruda, 2005). Los cultivares de tomate para consumo en fresco que se cultivan actualmente presentan grandes diferencias en tamaño (desde unos pocos hasta cientos de gramos), de forma (achatado, redondeado, alargado, en forma de pera) o de color (desde el amarillo hasta el rojo oscuro). De esta manera, el mercado europeo de productos frescos incrementa constantemente sus demandas de productos fácilmente distinguibles por criterios visuales que reflejen la calidad de dicho producto (Figura 1.2).



Figura 1.2. *Diferentes variedades y formas de tomate*

La calidad organoléptica de los frutos es definida como una combinación de características visuales (como tamaño, forma y color, y propiedades sensoriales), como sabor, acidez y aroma (Bai y Lindhout, 2007). La calidad organoléptica es la que determina que un alimento sea o no consumido mayoritariamente con respecto a otro. La evaluación de la calidad de los frutos basada en parámetros organolépticos es bastante compleja, ya que envuelve parámetros de textura, sabor y aroma. El flavor, algo muy subjetivo que integra múltiples sistemas sensoriales (Klee y Tieman, 2013), y que en última instancia, se manifiesta a nivel cerebral, percibido como una combinación entre el olor, sabor, y sensación en la boca, se encuentra íntimamente relacionado con el equilibrio entre azúcares, ácidos orgánicos, compuestos volátiles, y aminoácidos libres. Este término “flavor” aún no existe como tal en nuestro diccionario, pero cada vez es más usado por los nutricionistas para explicar esta combinación sensorial que percibimos al meternos un alimento en la boca.

La calidad nutritiva y funcional de un producto de mercado se define como el grado de utilidad que poseen los alimentos para satisfacer los requerimientos de sustancias necesarias para garantizar el buen funcionamiento del organismo humano o animal. La calidad nutritiva, aunque es imperceptible para los consumidores, es de

gran importancia. Algunas sustancias de estos alimentos proporcionan adicionalmente beneficios médicos o saludables, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades, denominándose entonces compuestos nutraceuticos (Marangoni y col., 1995). “Nutraceutico” es un término derivado de “nutrición” y “farmaceutico”, con lo que se puede entender la etimología de dicha palabra en cuanto al fruto del tomate se refiere. El consumo de tomates o productos derivados del tomate se ha asociado con un menor riesgo de desarrollar cáncer de tracto digestivo y de próstata. Además, el tomate es rico en compuestos bioactivos, principalmente licopeno, β -caroteno, vitamina C y compuestos fenólicos (Dumas y col., 2003). El licopeno es un carotenoide específico del tomate, con gran capacidad antioxidante. Junto con otros carotenoides como β -caroteno, los licopenos poseen un reconocido efecto beneficioso para la salud, por su capacidad para prevenir diversos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Bramley, 2000; Shi y Le Maguer, 2000). Por otra parte, la vitamina C interviene en diversas funciones biológicas, como la síntesis de colágeno y la biosíntesis de ciertas hormonas. Además, su consumo se ha relacionado con la reducción del daño oxidativo y la mejora en procesos inflamatorios (Aguirre y May, 2008). Por último, los compuestos fenólicos son otro grupo de compuestos presentes en el tomate, que también tienen un papel importante en la salud humana y en la prevención de enfermedades (Fernandez-Panchon y col., 2008).

Los principales componentes nutricionales del tomate son azúcares y ácidos orgánicos, proteínas, lípidos y aminoácidos, minerales, compuestos fenólicos, pigmentos y vitaminas (Tabla 1.3). Estos tres últimos se han identificado como componentes nutraceuticos, por lo que el tomate es definido como un alimento funcional y nutraceutico (Jack, 1995; Canene-Adams y col., 2005).

Tabla 1.3. Valores nutricionales para tomate.

| Componentes | Unidades | Cantidad | Componentes | Unidades | Cantidad |
|---------------------------------|----------|----------|---------------------------------------|----------|----------|
| Agua | g | 94,52 | Colina total | mg | 6,7 |
| Energía | kcal | 18 | Betaína | mg | 0,1 |
| Energía | kJ | 74 | Vitamina B-12 | µg* | 0 |
| Proteínas | g | 0,88 | Vitamina A, IU | IU** | 833 |
| Lípidos totales | g | 0,2 | Vitamina A, RAE | RAE*** | 42 |
| Cenizas | g | 0,5 | Retinol | µg | 0 |
| Fibra total | g | 1,2 | Vitamina E (alpha-tocopherol) | mg | 0,54 |
| Azúcares totales | g | 2,63 | Tocoferol, beta | mg | 0,01 |
| Sacarosa g | g | 0,00 | Tocoferol, gamma | mg | 0,12 |
| Glucosa (dextrosa) | g | 1,25 | Tocoferol, delta | mg | 0 |
| Fructosa | g | 1,37 | Vitamina K (filoquinona) | µg | 7,9 |
| Lactosa | g | 0,00 | Ácidos grasos totales saturados | g | 0,028 |
| Maltosa | g | 0,00 | Ácidos grasos totales monoinsaturados | g | 0,031 |
| Galactosa | g | 0,00 | Ácidos grasos poliinsaturados | g | 0,083 |
| Almidón | g | 0,00 | Triptófano | g | 0,006 |
| Ac cítrico | g | 351 | Treonina | g | 0,027 |
| Ac. málico | g | 92,5 | Isoleucina | g | 0,018 |
| Ac oxálico | g | 26,95 | Leucina | g | 0,025 |
| Ac ascórbico | g | 14,5 | Lisina | g | 0,027 |
| Ac fumárico | g | 3,33 | Metionina | g | 0,006 |
| Calcio, Ca | mg | 10 | Cisterna | g | 0,009 |
| Hierro, Fe | mg | 0,27 | Fenilalanina | g | 0,027 |
| Magnesio, Mg | mg | 11 | Tirosina | g | 0,014 |
| Fósforo, P | mg | 24 | Valina | g | 0,018 |
| Potasio, K | mg | 237 | Arginina | g | 0,021 |
| Sodio, Na | mg | 5 | Histidina | g | 0,014 |
| Zinc, Zn | mg | 0,17 | Alanita | g | 0,027 |
| Cobre, Cu | mg | 0,059 | Ácido aspártico | g | 0,135 |
| Manganeso, Mg | mg | 0,114 | Ácido glutámico | g | 0,431 |
| Selenio, Se | µg | 0,13 | Glicina | g | 0,019 |
| Vitamina C, Ác. Ascórbico total | mg | 7 | Prolina | g | 0,015 |
| Tiamina | mg | 0,037 | Serina | g | 0,026 |
| Riboflavina | mg | 0,019 | Betacaroteno | µg | 1624 |
| Niacina | mg | 0,594 | Alfacaroteno | µg | 20 |
| Ácido pantoténico | mg | 0,089 | Cryptoxanthin, beta | µg | 490 |
| Vitamina B-6 | mg | 0,08 | Licopeno | µg | 308 |
| Folato total (Ahuja y col.) | µg | 15 | Lutein + zeaxanthin | µg | 51 |

Fuente: USDA, Base de Datos Nacional de Nutrientes de Referencia Estándar, edición 19, 2006. Unidades de Nutriente en 100 g de tomate.* Microgramos, ** Unidades internacionales por sus siglas en inglés, *** Equivalentes de la actividad del retinol.

Los azúcares reductores representan aproximadamente el 50% de la materia seca de un fruto como el tomate, siendo la glucosa y la fructosa los mayoritarios. Los ácidos orgánicos, principalmente cítrico y málico, representan más del 10% de la materia seca (Chamarro Lapuerta, 1995). Tanto los azúcares como los ácidos aportan un escaso valor nutritivo al tomate, aunque sí tienen un papel fundamental en su sabor. El contenido medio de proteínas, aminoácidos y lípidos del tomate es muy pobre, alrededor de 0,6% del peso fresco (Davies y Hobson, 1981). Los minerales también representan una fracción pequeña del peso fresco, aproximadamente un 0,4% (Davies y Hobson, 1981), pero desempeñan un importante papel en la composición nutritiva del fruto. El incremento del contenido en materia seca, proteínas, aminoácidos, lípidos y minerales del tomate está condicionado en gran parte por la práctica de la fertilización y por la influencia de los factores abióticos a los que la planta sea o se vea sometida.

1.1.4. Origen, taxonomía y descripción botánica

El origen del género *Lycopersicum* se localiza en la región Andina, que se extiende desde el Sur de Colombia al Norte de Chile, y desde la costa del Pacífico (incluidas las islas Galápagos) a las estribaciones orientales de los Andes, comprendiendo los países de Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile (Esquinas-Alcázar y Nuez Viñals, 1995). Sin embargo, parece que fue en México donde se originó el cultivo del tomate, muy probablemente a partir de *L. esculentum* var. cerasiforme, único *Lycopersicum* silvestre que crece como mala hierba y que se encuentra fuera del área de distribución del género. A la llegada de los españoles a América, el tomate estaba integrado en la cultura azteca y en la de otros pueblos del área mesoamericana, existiendo diversidad de tamaños, formas y colores del fruto por lo que se considera que se había formado un centro de diversificación secundario de la especie.

La palabra “tomate” no se introdujo en la lengua castellana hasta 1532, procedente de la lengua azteca Náhuatl, se denominaba *tomatl*, aplicado genéricamente para plantas con frutos globosos o bayas, con muchas semillas y pulpa acuosa. Para precisar la especie se empleaba un prefijo calificativo, así para *L. esculentum* se usaba *xitomatl* (jiltomate) mientras que la especie más apreciada y empleada por los aztecas, *Physalis philadelphica* Lam., se denominaba *miltomatl*,

tomate de milpa o simplemente tomate. El tomate cultivado tuvo su origen en el Nuevo Mundo, no era conocido en Europa ni en el resto del Viejo Mundo antes del descubrimiento de América. Los primeros tomates llegaron a Europa a través de los conquistadores españoles en el siglo XVI. Cuando el tomate fue introducido en el viejo continente tuvo una aceptación muy desigual. Así, a finales del siglo XVII, en España, Portugal e Italia el tomate se convierte en la base de la actual dieta mediterránea, adaptando rápidamente este ingrediente a sus platos. En el resto de Europa fue usado sólo como planta ornamental, por sus flores amarillas y sus bayas rojas o amarillas. Esta reticencia a su consumo se debió fundamentalmente a que la mayoría de las *Solanaceae* europeas eran ricas en alcaloides tóxicos, lo que era ampliamente conocido en estos países.

La primera descripción botánica del tomate la realizó Pier Andrea Mattioli, del jardín botánico de Padua (Italia), quien publicó su herbario en 1554. Desde entonces aparece descrito en numerosos herbarios como el de Matthias de L'Obel en 1581, el de Gerard en Inglaterra en 1597 o el de Salmon en Estados Unidos, ya en 1710.

El tomate pertenece al género *Solanum*, el cual, en cuanto a número de especies, es relativamente poco importante dentro de la familia en la que se encuadra, las *Solanaceae*. Esta familia se divide, atendiendo a características morfológicas del embrión, en dos subfamilias: la *Cestroidae* y la *Solanoideae*. El carácter más importante de la subfamilia *Solanoideae*, en la que se incluyen los géneros *Lycopersicum* y *Solanum* L., es que todos sus miembros poseen una gran uniformidad en el número cromosómico ($2n=24$). Estos dos géneros se diferencian entre sí por la presencia de expansiones apicales estériles en las anteras en *Lycopersicum*, que están ausentes en *Solanum* (Taylor, 1986). Otra característica diferenciadora es el mecanismo de dehiscencia anteridial, presentando *Lycopersicum* dehiscencia tipo longitudinal mientras que en *Solanum* la apertura de las anteras es mediante poros apicales (Rick, 1982). No obstante, estudios posteriores han determinado que la dehiscencia en *Lycopersicum* comienza por poros apicales que derivan rápidamente en surcos longitudinales (Bonner y Dickinson, 1989).

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las Solanáceas. La taxonomía generalmente aceptada es:

- i. Clase: *Dicotyledoneas*.
- ii. Orden: *Solanales (Personatae)*.
- iii. Familia: *Solanaceae*.
- iv. Subfamilia: *Solanoideae*.
- v. Género: *Solanum*.
- vi. Especie: *Lycopersicum*.

La situación taxonómica del tomate entre las Solanáceas ha resultado siempre clara, no así su ubicación genérica. Así, Caspar Bauhin (1623) en su Pinax reconoce la existencia de un grupo de plantas que incluyen los actuales géneros *Solanum*, *Atropa* L., *Physalis* L. y otros. En 1700, Tournefort establece siete géneros colocando los de fruto blando en un grupo diferenciado. Este autor reconoció *Lycopersicum* como distinto de *Solanum*. Linneo, en contra de la práctica común en su época y apoyándose en el Pinax, incluyó *Lycopersicum* dentro del género *Solanum*, denominado al tomate *Solanum lycopersicum* (Esquinas-Alcázar y Nuez Viñals, 1995).

Se trata de una planta perenne de porte arbustivo que se cultiva como anual. Hay dos tipos diferenciados por el tipo de crecimiento que tienen. Están las de crecimiento determinado y las de crecimiento indeterminado. La planta indeterminada es la normal, en ella, los tallos presentan segmentos uniformes con tres hojas (con yemas) y una inflorescencia, terminando siempre con un ápice vegetativo. A diferencia de esta, la planta determinada tiene tallos con segmentos que presentan progresivamente menos hojas por inflorescencia y terminan en una inflorescencia, lo que resulta en un crecimiento limitado. El tallo típico tiene de 2 a 4 cm de diámetro en la base y está cubierto por pelos glandulares y no glandulares que salen de la epidermis. El sistema radical del tomate está constituido por la raíz principal, las raíces secundarias y las raíces adventicias. Las hojas son compuestas, imparipinnadas con 7 u 9 folíolos. Una hoja típica de las plantas cultivadas tiene unos 0,5 m de largo, algo menos de anchura con un gran folíolo terminal y hasta 8 laterales que, a su vez, pueden ser compuestos (Chamarro Lapuerta, 1995).

La inflorescencia está compuesta de 4 a 12 flores. Sus flores son radiales y con cinco estambres. Las flores, en número variable, se agrupan en inflorescencias de tipo racemoso. El ovario, súpero bicarpelar, contiene numerosos primordios seminales,

produciendo bayas polispermas. Los carpelos se presentan en posición oblicua con respecto al plano mediano de la flor (Fotografía 1.1). El fruto es una baya de forma globular, ovoide o aplastada cuyo peso oscila, según variedades entre 5 y 500 gramos y puede ser bi- o plurilocular. Está unido a la planta por un pedicelo con un engrosamiento articulado que contiene la capa de abscisión. Posee una semilla discoidal-lenticular comprimida y embrión enrollado, de diámetro más o menos uniforme (Fotografía 1.2) (Chamarro Lapuerta, 1995).



Fotografía 1.1. *Detalle de racimo de flores*



Fotografía 1.2. *Detalle de frutos de tomate.*

1.1.5. Tomate cv. Micro-Tom

El cultivar de tomate enano Micro-Tom (*Solanum lycopersicum*, L), fue producido para propósitos ornamentales cruzando 3 cultivos, Florida, Basket y Ohio 4013, exhibiendo un fenotipo muy enano con frutos maduros pequeños y rojos (Harbaugh y Scott, 1999). Su pequeño tamaño, rápido crecimiento, y fácil transformación le ha llevado a su propuesta como modelo para la investigación sobre la regulación del desarrollo de los frutos (Meissner y col., 1997).

El fenotipo de las plantas Micro-Tom es debido por lo menos a tres mutaciones que alteran dramáticamente la arquitectura de la planta (Marti y col., 2006). La caracterización de dos de ellas, una mutación en el gen (SP) de SELF-PRUNING (Pnueli y col., 1998) (que produce un fenotipo determinado) y enano (d) (que reduce la longitud del entrenudo y produce hojas más pequeñas, rugosas, y verde oscuro). Además, Micro-Tom tiene otra mutación, miniatura (MNT) (Meissner y col., 1997). Sin embargo, los ovarios polinizados se desarrollan normalmente y responden a los tratamientos con auxinas y giberelinas, por lo que se considerada un modelo extrapolable en estudios sobre el cuajado y desarrollo del fruto (Marti y col., 2006). Esta variedad constituye un sistema modelo muy útil en nuestro estudio, debido a su pequeño tamaño y rápido crecimiento, que nos permite su cultivo en cámara de cultivo bajo condiciones controladas, evitando las interferencias de otros factores ajenos a los tratamientos aplicados.



Fotografía 1.3. Detalle de planta Micro-Tom con frutos maduros

1.2. Estrés abiótico

1.2.1. Efectos de la salinidad

La salinidad es uno de los principales factores que afectan al crecimiento y producción de cualquier planta cultivada. Las principales sales que se encuentran en suelos y que afectan negativamente a la producción vegetal corresponden a cloruros (Cl^-) y sulfatos de sodio (Na_2SO_4), calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg^{2+}) y potasio (K^+) (Munns y Tester, 2008), siendo para las plantas los principales iones tóxicos sodio (Na^+), Cl^- y sulfato (SO_4^{2-}). Se estima que sobre 800 millones de hectáreas en el planeta están afectadas por sales con efecto tóxico para los cultivos, de las cuales 397 millones lo son por problemas de salinidad y 434 millones por condiciones asociadas a sodicidad de los suelos (FAO, 2000). La zona Mediterránea es de las más importantes, mundialmente hablando, en el cultivo del tomate. Por lo tanto aquí los problemas derivados de un exceso de salinidad, ya sea en el suelo o en el agua de riego, van a ser determinantes en la calidad y producción de este cultivo (Cuartero y Fernandez-Munoz, 1999). Las causas vinculadas a estos procesos de salinización suelen ser un uso excesivo de fertilizantes, uso de aguas de mala calidad por exceso de sales, mal drenaje del suelo y la tala de vegetación arbórea, que permite la lixiviación de sales a aguas subterráneas. De acuerdo con Cuartero y Fernandez-Munoz (1999), el tomate puede ser utilizado en zonas donde la calidad del agua y del suelo no es apta para otro tipo de cultivo, ya que estas plantas son moderadamente sensibles a la salinidad, con valores óptimos de conductividad de la disolución de riego que oscilan entre 3 y 5 dSm^{-1} .

El efecto negativo de la salinidad para el desarrollo y rendimiento de las plantas puede ser debido a un “efecto osmótico”, relacionado con la disminución del potencial osmótico del agua en el medio radicular. La consecuencia directa del mismo es la disminución de la disponibilidad de agua para las raíces por una disminución de la energía libre del agua en el suelo, debido a la presencia de sales solubles (Eaton, 1941; Hayward y Spurr, 1944; Bernstein y Hayward, 1958). Para poder superar estos problemas de absorción de agua, las plantas acumulan iones y los denominados “solutos compatibles” a nivel del citosol y de orgánulos. Estos compuestos se denominan “compatibles” ya que pueden ser acumulados en gran cantidad en los distintos compartimentos celulares sin que la actividad de ciertas enzimas importantes,

desde el punto de vista metabólico, membranas, ADN... se vean afectados. Algunos de los iones acumulados bajo estas condiciones de estrés osmótico son esenciales para el correcto crecimiento y desarrollo de un cultivo, como el K^+ , aunque la mayoría de los compuestos compatibles acumulados son solutos orgánicos, como azúcares simples (principalmente glucosa y fructosa), alcoholes derivados de azúcares y azúcares complejos (manitol), además de diferentes aminoácidos, como la prolina, y compuestos amonio cuaternarios, como la glicina betaína (Yokoi y col., 2002). La acumulación de dichos compuestos permite a las células disminuir su potencial osmótico, hecho que facilita el movimiento del agua hacia el interior de las células de las raíces, proceso fisiológico fundamental aunque fuertemente inhibido bajo condiciones de salinidad.

Otro de los efectos negativos de la salinidad se debe a su “efecto específico” asociado a los desequilibrios iónicos producidos en las células normalmente por la absorción y acumulación masiva de iones, como Cl^- y Na^+ , en concentraciones tóxicas para las plantas. Esta acumulación origina una cadena de efectos secundarios, como son problemas de toxicidad específica y de desequilibrio nutricional, vinculados a la menor absorción de iones esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Yokoi y col., 2002). Así, elevadas concentraciones de Na^+ en la solución externa, causan una disminución en las concentraciones de K^+ y Ca^{2+} en los tejidos de las plantas (Hu y Schmidhalter, 1997). Estas reducciones se pueden deber al antagonismo descrito entre el Na^+ y el K^+ por los sitios de absorción en las raíces, al efecto del Na^+ en el transporte de K^+ en el xilema (Lynch y Lauchli, 1984), o a la inhibición de los procesos de absorción (Suhayda y col., 1990). La disponibilidad de Ca^{2+} se vería seriamente reducida por el desplazamiento del Na^+ al Ca^{2+} en los sitios de unión extracelulares, especialmente con una relación $Ca^{2+}:Na^+$ baja (Cramer y col., 1988). Además, la reducción de la absorción de Ca^{2+} bajo condiciones salinas, podría ser debida a su precipitación y al incremento de la fuerza iónica que reduce su actividad (Hu y Schmidhalter, 2005). Es sabido que el estrés por salinidad induce la deficiencia de iones o produce un desequilibrio nutricional debido a la competición entre nutrientes como K^+ , Ca^{2+} y NO_3^- con los iones tóxicos Na^+ y Cl^- . Como la salinidad causa déficit hídrico en las plantas, el K^+ es muy importante en el mantenimiento de la presión de turgor de la planta, de manera que una relación alta de $K^+:Na^+$ aumentaría también la resistencia de la planta a la salinidad. Comparado con

N, P, K⁺ y Ca²⁺, los micronutrientes podrían ser menos importantes en la inducción a la tolerancia de las plantas a la salinidad. Sin embargo, la adición de macronutrientes en el medio de crecimiento bajo condiciones salinas pueden aliviar los efectos adversos de este estrés en el crecimiento de las plantas (Hu y Schmidhalter, 2005).

Otros investigadores consideran que una alta concentración de Na⁺ no sólo inhibe la absorción de nutrientes directamente por interferencia con los transportadores de membrana plasmática de la raíz, tales como los canales selectivos de K⁺, sino también por la inhibición del crecimiento de la raíz a causa del efecto osmótico del Na⁺ y a los efectos adversos del Na⁺ en la estructura del suelo (Tester y Davenport, 2003).

1.2.2. Efectos de las altas temperaturas

La temperatura óptima de crecimiento para las plantas de tomate está entre 23-26°C. Sin embargo, y como hemos puntualizado anteriormente, el tomate es un cultivo de zonas áridas y semiáridas, donde la temperatura es un factor de difícil control. El estrés causado por altas temperaturas provoca gran cantidad de cambios, tanto a nivel fisiológico, como bioquímico y molecular (Tiroli-Cepeda y Ramos, 2010), que son, en su mayoría, negativos para el crecimiento y la producción de los cultivos (Penfield, 2008).

El estrés térmico suele ir asociado a un déficit hídrico y a un cierre estomático (Wahid y col., 2007), lo que va a reducir la cantidad de CO₂ disponible y puede hacer decrecer la relación CO₂/O₂ en los cloroplastos (Foyer y Noctor, 2005). Estos cambios pueden afectar en gran medida a la eficiencia de la fotosíntesis, siendo ésta un proceso muy sensible al calor (Wise y col., 2004). La germinación de semillas y emergencia de las plántulas también se ven afectadas negativamente por un estrés térmico, observándose una considerable reducción en los porcentajes de germinación (Wahid y col., 2007). Las altas temperaturas también influyen en la aparición del BER (blossom-end rot), fisiopatía consistente en la podredumbre apical de los frutos y que los invalida comercialmente. Esto es debido al aumento en la velocidad de crecimiento que, junto con las condiciones de baja humedad, y el bajo índice de transpiración característico de los frutos, hace que el Ca⁺² quede inmovilizado a nivel de hoja y el fruto sufra de deficiencia de dicho nutriente (Adams y Ho, 1992).

Temperaturas por encima de las óptimas van a tener efectos diferentes dependiendo de la duración e intensidad de las mismas. Por un lado, si se trata de breves periodos de tiempo, se produce un descenso de la fotosíntesis. En el caso de que se prolongue el tiempo de exposición a las mismas, también van a verse afectados la fisiología y morfología de los frutos (cuajado de frutos, menores periodos de maduración y frutos pequeños) (Peet y col., 1997; Sato y col., 2000; Adams y col., 2001; Camejo y col., 2005). De acuerdo con el trabajo de Zhang y col. (2008) y Hu y Schmidhalter (2005) en tomate, temperaturas diurnas de 35°C daban lugar a una reducción de la producción de un 46,1%, comparada con temperaturas diurnas de 25°C. Adams y col. (2001) observaron que una temperatura media de 22°C daba lugar a una reducción de la producción del 18% respecto a temperaturas de crecimiento de 26°C, y Peet y col. (1997) igualmente indicaron que a 29°C la producción se reducía en un 17% respecto a 25°C.

1.2.3. Combinación de estreses

Es bien sabido que los estreses ambientales más devastadores para las cosechas son aquellos que llevan asociado un déficit hídrico, como pueden ser las temperaturas extremas o la salinidad. Éstos originan un agotamiento del contenido hídrico de las células y un aumento del potencial osmótico, causando así un estrés osmótico generalizado y, en definitiva, importantes pérdidas en la producción (Ahuja y col., 2010; Zhang y col., 2011). En las últimas décadas, un gran número de estudios se han centrado en la respuesta de las plantas a diferentes estreses ambientales, aumentando enormemente nuestro conocimiento en este tema. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han centrado en el estudio de los mecanismos de respuesta (tanto a nivel fisiológico, como bioquímico o molecular) de las plantas a tratamientos de un solo estrés (Hirayama y Shinozaki, 2010; Chew y Halliday, 2011). Estos estudios han sido y son muy relevantes para el entendimiento de los mecanismos de tolerancia de las plantas a ese estrés abiótico en concreto, pero los ensayos no son demasiado cercanos a lo que sucede normalmente en el campo, donde la confluencia de varios estreses abióticos es la norma. La mayoría de las zonas agrícolas afectadas por la salinidad están localizadas en regiones áridas o semi-áridas y es aquí donde la influencia del estrés por salinidad se agrava por la acción simultánea de factores xerotérmicos, como son altas temperaturas en particular (Kuznestov y Shevyakova, 1997). Los estudios realizados en laboratorio mediante la

aplicación de un estrés abiótico individual han sido en los últimos años muy intensos y productivos, generándose una gran fuente de conocimiento de los mecanismos implicados en la tolerancia a un tipo de estrés concreto. Muchos de estos estudios han derivado en la producción de ciertas plantas genéticamente modificadas y tolerantes a ciertos niveles de dicho estrés en condiciones de laboratorio. Sin embargo, solo un pequeño número de estas plantas han conseguido ser exitosas y tolerantes en condiciones de campo, lo que hace pensar que cuando ese estrés se combina con otro u otros los mecanismos responsables de esta tolerancia en laboratorio quedan parcialmente anulados. Estas observaciones ponen de manifiesto el que sea cada vez más necesario el estudio de la respuesta de las plantas a estreses abióticos aplicados simultáneamente.

Previamente se ha demostrado que el patrón de expresión génica en plantas de tabaco y *Arabidopsis* cultivadas bajo la combinación de altas temperaturas y sequía era diferente del patrón de expresión observado cuando estos estreses eran aplicados individualmente (Rizhsky y col., 2002; Rizhsky y col., 2004; Mittler, 2006). Más recientemente, un experimento a gran escala de microarrays realizado por Rasmussen y col. (2013), en el cual se estudiaron varios estreses abióticos y bióticos en combinación o actuando de forma independientemente, concluyó que un 60% del total de la expresión génica resultante de la combinación de dos estreses, no podía predecirse de los resultados obtenidos de los experimentos correspondientes a esos mismos estreses aplicados de forma individual. Estos resultados resaltan la importancia del estudio de estreses abióticos en combinación, con el objetivo común de generar plantas mediante ingeniería genética tolerantes a las condiciones de campo reinantes (Yamaguchi y Blumwald, 2005; Mittler, 2006).

1.3. Cambios metabólicos y fisiológicos inducidos por los distintos estreses abióticos

La respuesta de las plantas a la salinidad o a las altas temperaturas implica tanto mecanismos de respuesta fisiológicos, metabólicos como moleculares. Estos mecanismos deben estar interconectados y finamente regulados entre sí, para crear respuestas específicas que conlleven a la aclimatación de las plantas a esos ambientes cambiantes. El mantenimiento del potencial de membrana biológico, de las actividades de numerosas enzimas, y de una apropiada concentración de osmolitos

para hacer frente a la regulación del volumen celular, dependen todos de la homeostasis iónica, y más específicamente, de la homeostasis del Na^+ y del K^+ (Conde y col., 2011).

Se sabe que tanto el estrés por calor como la salinidad inducen alteraciones en el transporte de iones y en la compartimentación de los mismos (Munns, 2002). La salinidad causa toxicidad en las células vegetales por una acumulación masiva de Na^+ , que conlleva finalmente a interrumpir la absorción de K^+ en las raíces, y a ejercer múltiples efectos tóxicos en genes y enzimas causando disfunciones en el metabolismo (Hasegawa y col., 2000; Conde y col., 2011). Por otra parte, los cambios en la fluidez de la membrana juegan un papel muy importante en la percepción de la señal y el cambio de la expresión génica producido por altas temperaturas (Plieth, 1999). Así, las altas temperaturas pueden afectar a algunas bombas y transportadores de iones localizados en la membrana plasmática o tonoplasto (por ejemplo, H^+ -ATPasa o H^+ -PPasa) desequilibrando la homeostasis iónica (Zhang y col., 2006; Janicka-Russak y col., 2012; Yoon y col., 2013).

De forma similar, tanto un estrés por salinidad como por altas temperaturas reducen el crecimiento de la planta, así como la actividad fotosintética, inducen a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Mittler y col., 2004; Suzuki y col., 2011), inhiben enzimas importantes y alteran la eficiencia de las reacciones enzimáticas en la célula (Laluk y col., 2011), cambian la composición de metabolitos sintetizados y acumulados (Shulaev y col., 2008), y afectan a la estabilidad de varias proteínas, de membranas, de especies de ARN y de estructuras del citoesqueleto (Lugan y col., 2010; Peleg y col., 2011), causando un estado de desequilibrio metabólico general.

Para contrarrestar los efectos negativos del estrés por salinidad o por las altas temperaturas sobre el metabolismo celular, las plantas deben de ser capaces de alterar la expresión de ciertos genes, la síntesis de ciertas proteínas, de metabolitos y de lípidos mediante el proceso conocido como respuesta al estrés. Entre alguna de las respuestas más comunes e importantes de las plantas tanto a estrés por salinidad como por altas temperaturas se encuentran la acumulación de osmoprotectores, respuestas antioxidantes mediante la activación del metabolismo oxidativo para la detoxificación de los radicales oxidativos (ROS), acumulación de ácidos fenólicos con

capacidad asimismo antioxidante, activación de proteínas de choque térmico y de MAP kinasas, síntesis de segundos mensajeros, activación de genes de transcripción, reprogramación transcripcional, etc. Todos estos mecanismos han de producirse en cascada y deben estar finamente regulados para que las plantas sean capaces de traducir la señal de estrés y generar una respuesta de tolerancia al mismo. En este trabajo nos hemos centrado, por su importancia en la respuesta al estrés salino y por altas temperaturas, en los mecanismos de acumulación de osmoprotectores y en los de detoxificación de ROS, por los que los comentaremos en más detalle en esta Introducción.

1.3.1. Acumulación de osmoprotectores

Un denominador común al estrés por salinidad y las altas temperaturas es la generación de un estrés osmótico. La síntesis y acumulación de osmoprotectores (o solutos compatibles) es una de las vías que utilizan las plantas para hacer frente a dicho estrés osmótico generado. Éstas son moléculas pequeñas y eléctricamente neutras, no son tóxicas a concentraciones molares, y son capaces de estabilizar proteínas y membranas, en contra del efecto desnaturizante que poseen otros osmóticos y otros solutos perjudiciales, como son altas concentraciones de sal dentro de la célula (Yancey, 2005). La acumulación de osmoprotectores en respuesta a diferentes estreses abióticos ha sido muy estudiada y demostrada en plantas, y la manipulación de genes implicados en la biosíntesis de estos compuestos ha resultado siempre en una mejora de la tolerancia de las plantas a la salinidad, o a las altas temperaturas en muchos cultivos (Delauney y Verma, 1993; Kuznestov y Shevyakova, 1997; Nuccio y col., 1999).

La composición y contenido de los diferentes solutos en plantas estresadas puede variar considerablemente, dependiendo de la especie así como de la intensidad y duración del estrés (Evers y col., 2010; Lugan y col., 2010). Aunque muchos trabajos muestran qué tipo de osmoprotectores se acumulan preferentemente en cada planta y con qué tipo de estrés específico, existe una falta de consenso en este tema. Por tanto, parece que dependiendo de la planta estudiada, del estrés aplicado y de las condiciones ambientales específicas, las plantas acumulan preferentemente ciertos osmoprotectores frente a otros. En este sentido, las plantas que tienen que evolucionar en ambientes salinos, de altas temperaturas o secos, normalmente

acumulan tres tipos de osmoprotectores: betaínas o compuestos afines, azúcares no estructurales y polioles, y aminoácidos como prolina (Delauney y Verma, 1993; Stoop y col., 1996).

Hay muchos experimentos donde se aplica un solo tipo de estrés abiótico y que describen las múltiples funciones que se le atribuyen a estos compuestos, como la regulación de potencial osmótico, termo y osmoprotección, funciones como chaperonas moleculares, ajustes en el equilibrio carbono/nitrógeno, detoxificación de ROS, amortiguadores del estado redox celular, regulación del pH, deposiciones de reservas de carbono y nitrógeno y regulación de la señal de transducción (Bartels y Sunkar, 2005). Sin embargo, por ahora no hay ninguna evidencia que muestre que la combinación de dos estreses abióticos, como salinidad y altas temperaturas, lleve a un perfil específico de acumulación de osmoprotectores que puedan ser deducidos o sean similares a los obtenidos cuando cada uno de los estreses se aplica individualmente.

Prolina

La acumulación de prolina representa una de las respuestas metabólicas comunes a la mayoría de las plantas superiores bajo condiciones de déficit hídrico, principalmente sequía y salinidad (Delauney y Verma, 1993). Sin embargo, la prolina parece estar ampliamente distribuida como osmoprotector y es acumulada en condiciones de estrés, no solo en plantas sino también en eubacterias, invertebrados marinos, protozoos y algas, cuando éstos son expuestos a sequía, salinidad, altas temperaturas, congelación, radiación ultravioleta y metales pesados (Yancey y col., 1982; Delauney y Verma, 1993; Saradhi y col., 1995; Kuznetsov y Shevyakova, 1997).

En plantas superiores, la prolina puede ser sintetizada a partir del glutamato o de la ornitina (Delauney y Verma, 1993). En condiciones normales, la síntesis de prolina en plantas se realiza a partir de la ornitina, mientras que en situación de estrés se utiliza principalmente glutamato como precursor (Delauney y Verma, 1993). El glutamato es fosforilado por la actividad kinasa de la enzima bifuncional Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS), que posee dos actividades enzimáticas: γ -glutamil kinasa (γ -GK) y glutamil semialdehido deshidrogenasa (GSA-DH), para producir L-glutamil fosfato. Después el L-glutamil fosfato es transformado en glutamil semialdehido (GSA) por la actividad reductasa de la P5CS (GSA-DH). Posteriormente, GSA se transforma

en Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C) mediante una reacción espontánea. Finalmente, el P5C es reducido por la enzima Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR) a prolina (Delauney y Verma, 1993; Zhang y col., 1995). El ciclo de la síntesis de prolina a partir de ornitina se inicia mediante la transformación del aminoácido ornitina en GSA, gracias a la enzima ornitina aminotransferasa (OAT) (Delauney y Verma, 1993; Hare y col., 1998) y, posteriormente el GSA se incorpora al ciclo de la síntesis de prolina a partir de glutamato como se ha descrito anteriormente. El catabolismo de la prolina ocurre en la mitocondria gracias a la actividad de las enzimas prolina deshidrogenasa (PDH) o prolina oxidasa (PO) para producir P5C desde prolina, y a través de la actividad Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (P5CDH) para transformar P5C en glutamato. En la figura 1.4 se muestra un esquema que resume el metabolismo de prolina en plantas superiores (Szabados y Savoure, 2010). La ruta de biosíntesis a partir de glutamato está marcada con líneas verdes, la ruta de biosíntesis a partir de la ornitina con líneas azules, y la ruta de degradación con líneas rojas. En las células meristemáticas y embrionarias, la síntesis de prolina se produce en el citosol y es mediada por las enzimas P5CS y P5CR. En condiciones de estrés, P5CS1 se acumula en los cloroplastos. El P5C mitocondrial asimismo puede ser reciclado a prolina en el citosol por la actividad de P5CR. Las enzimas están resaltadas en la figura con elipses y los transportadores de proteínas con octógonos azules.

La acumulación de prolina puede influir en la tolerancia al estrés de múltiples formas (Figura 1.5). La prolina es un compuesto rico en nitrógeno, pudiendo ser utilizado para la síntesis de proteínas; además, actúa como chaperona molecular protegiendo la integridad de las proteínas y mejorando las actividades de diferentes enzimas. Algunos estudios le han atribuido a la prolina características antioxidantes, sugiriéndose una actividad detoxificadora de ROS y su actuación como desactivador del oxígeno singlete (Smirnoff y Cumbes, 1989; Matysik y col., 2002). También ha sido propuesto que la prolina pueda estabilizar enzimas detoxificadoras de ROS y activar rutas alternativas de detoxificación (Hoque y col., 2008; Islam y col., 2009), contribuyendo así al mantenimiento del equilibrio redox celular. A parte de las características protectoras o detoxificadoras, la prolina contribuye a la regulación del desarrollo celular y es un componente esencial en la señalización metabólica de las rutas mitocondriales.

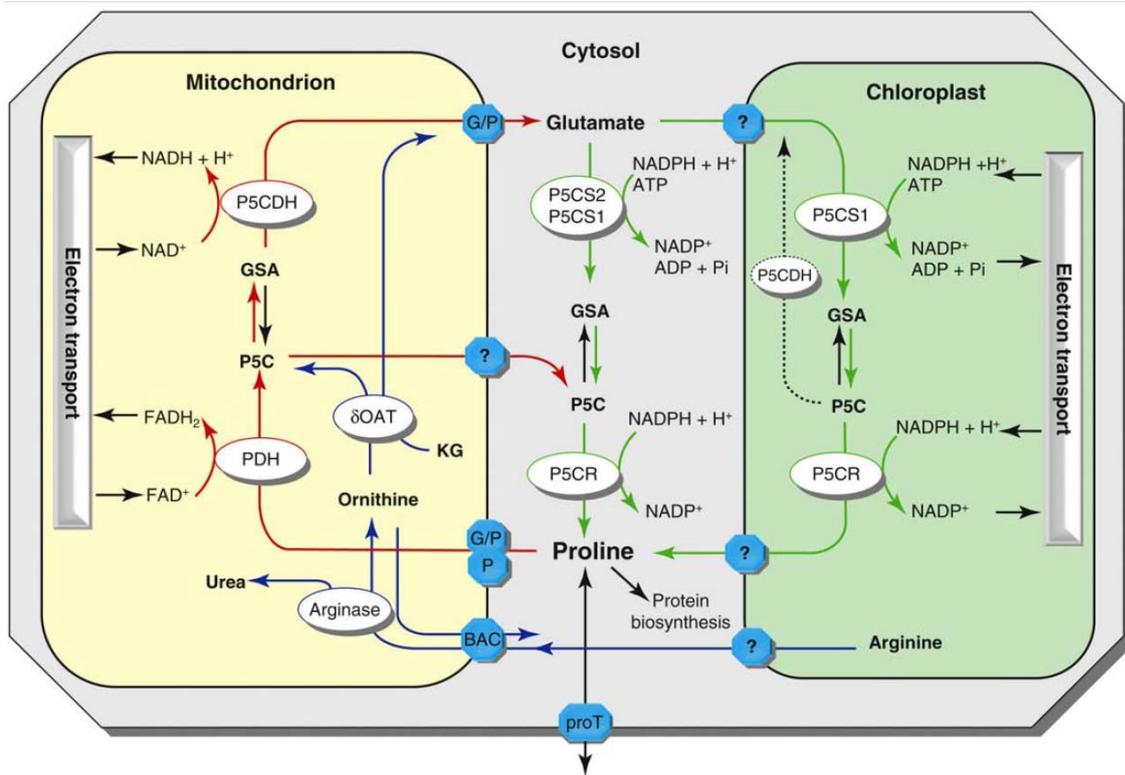


Figura 1.4. Modelo del metabolismo de la prolina en plantas superiores. Fuente: Szabados y Savoure (2010)

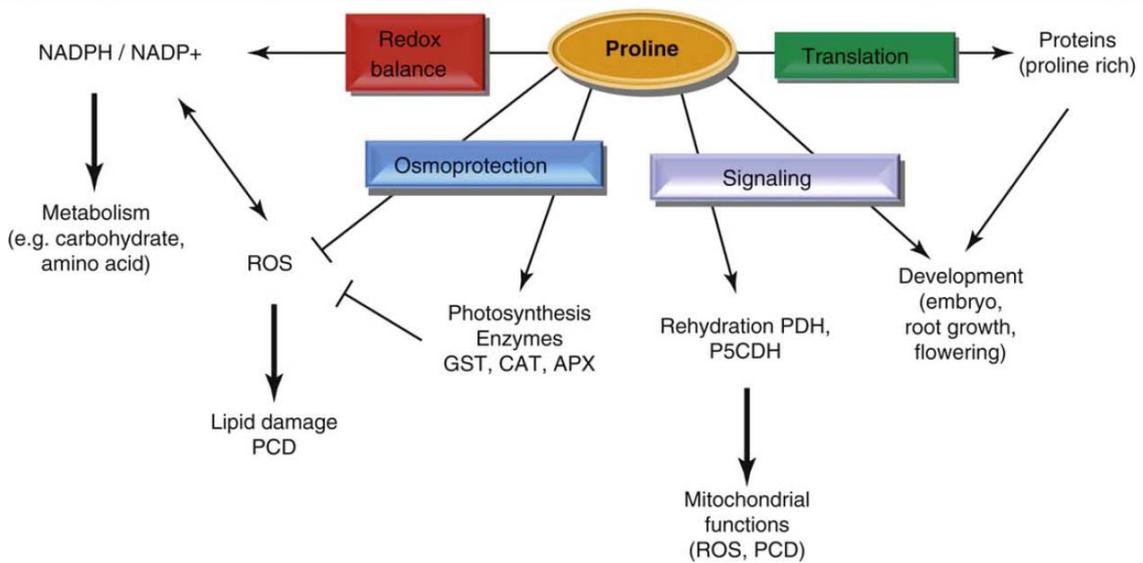


Figura 1.5. Múltiples funciones de la prolina en las plantas. Fuente: Szabados y Savoure (2010)

Glicina betaína

La Glicina betaína, GB, es uno de los compuestos amonio cuaternario más importantes y de los más estudiados en la protección de las plantas frente al estrés debido a sus versátiles funciones (Ahmad y col., 2013). GB no sólo protege a las plantas frente ciertos estreses, sino que también protege a ciertas enzimas implicadas en la protección frente al estrés, incluyendo la protección de la estructura cuaternaria de proteínas y otras macromoléculas en condiciones de estrés (Papageorgiou y Murata, 1995). La GB se sintetiza a partir de colina mediante dos pasos de oxidación, iniciada por la colina monooxigenasa (CMO) seguida por la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH), con betaína aldehído como molécula intermedia (Nuccio y col., 1998) (Figura 1.6).

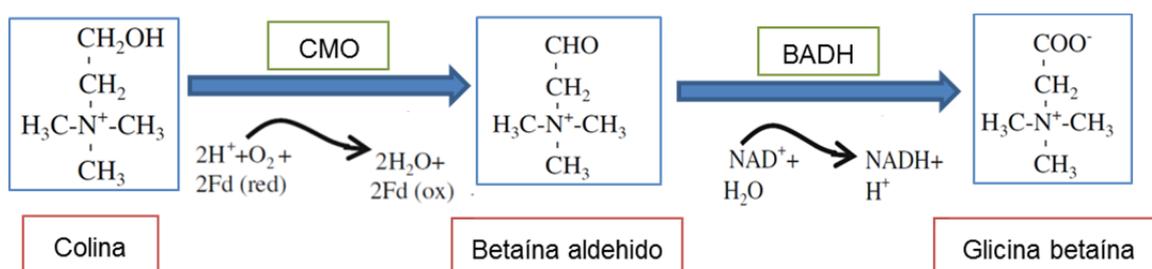


Figura 1.6. Ruta de biosíntesis de GB en plantas

Las plantas sintetizan GB por tres rutas diferentes: (1) desde glioxilato, que es un producto de la ruta fotorrespiratoria; (2) desde serina via serina hidroximetiltransferasa; y (3) a partir de treonina por la treonina aldolasa (Ahmad y col., 2013).

Existen varias formas en las que la GB contrarresta los efectos nocivos de distintos estreses (Ahmad y col., 2013). Se ha demostrado que la GB mejora la actividad del complejo de evolución del oxígeno del PSII, protegiéndolo de la disociación llevada a cabo por ciertas proteínas reguladoras que forman parte del núcleo de dicho complejo (Papageorgiou y Murata, 1995) y estabilizando la eficiencia fotoquímica del PSII (Zhang y col., 2008); la GB actúa también como chaperona química protegiendo las actividades enzimáticas de la RuBisCo y la malato

deshidrogenasa frente al estrés salino (Pollard y Wyn Jones, 1979; Incharoensakdi y col., 1986). Además, puede funcionar como chaperona molecular para ayudar en el plegamiento de las proteínas y en la protección de estructuras celulares, tales como membranas plasmáticas y tilacoidales, frente a su desestabilización por las altas temperaturas (Jolivet y col., 1982; Zhao y Harris, 1992). Se ha demostrado en varios estudios que la GB mejora la capacidad de las plantas para detoxificar ROS bajo condiciones de estrés (Park y col., 2004; Ahmad y col., 2008; Ahmad y col., 2010; Chen y Murata, 2011). Además, parece bastante claro que la GB tiene un papel crucial en mantener los niveles de ROS bajo control estabilizando las actividades de las enzimas implicadas el sistema de detoxificación de ROS, como son las enzimas pertenecientes al ciclo ascorbato-glutación (Ahmad y col., 2013). Existen varias publicaciones que demuestran que la aplicación exógena de GB da lugar a un aumento de la expresión de los genes relacionados con factores de transcripción, tráfico vesicular, y detoxificación de ROS (Einset y col., 2007; Einset y col., 2008), lo que confirma nuevamente el papel de la GB en la protección frente a condiciones de estrés.

La figura 1.7 muestra cómo la GB puede intervenir en la mejora de la productividad de plantas desarrolladas bajo estreses abióticos. A) la GB protege la maquinaria de transcripción e induce la expresión de genes bajo condiciones de estrés abiótico; sería interesante evaluar sus efectos sinérgicos en plantas transgénicas mediante la sobre-expresión de potentes factores de transcripción (Pnueli y col., 1998), para elevar la protección de la planta frente al estrés. De forma similar, la GB protege a la estructura cuaternaria de las proteínas de los efectos negativos de la salinidad o la sequía, lo que conllevaría a una mejora en la protección de las plantas frente al estrés. B) la GB también aumenta la asimilación de CO₂ en condiciones de estrés. C) es bien conocido que la GB estabiliza la estructura de la membrana y que actúa como osmolito frente a condiciones de estrés osmótico inducido por otros tipos de estrés abiótico.

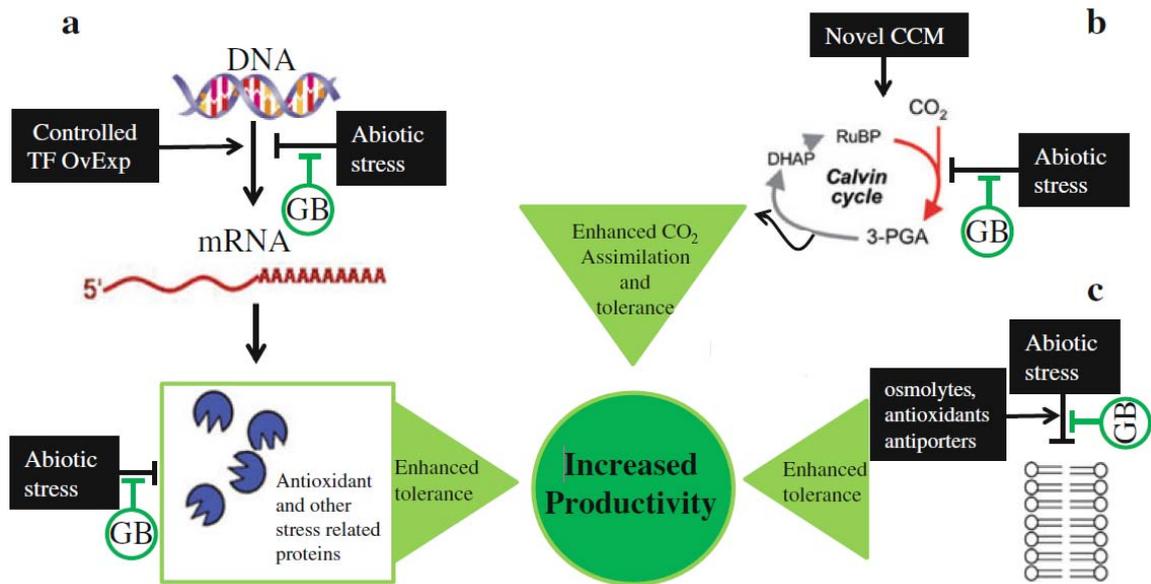


Figura 1.7. Modelo propuesto por (Ahmad y col., 2013) de la mejora que se le atribuye a la GB en el crecimiento de las plantas frente a estrés abiótico.

Trehalosa

Las plantas transforman el carbono asimilado en azúcares monosacáridos, muchos de los cuales sirven como precursores para la síntesis de diversos compuestos oligo y polisacáridos. Además de las funciones metabólicas y estructurales, los carbohidratos también influyen en el crecimiento y desarrollo de la planta actuando como elicitores o reguladores del crecimiento (Creelman y Mullet, 1997).

La función de la trehalosa en las respuestas al estrés está aún por determinar y en muchas ocasiones es controvertida. Se ha mostrado que la trehalosa tiene la habilidad de estabilizar membranas y proteger proteínas en aquellos tejidos con un alto índice de desecación, sugiriéndose así como una molécula con función de chaperona molecular (Crowe, 2007). En los últimos años se ha identificado la ruta que integra la síntesis, percepción y respuesta de la trehalosa y su precursor trehalosa-6-fosfato (T6P). Los niveles de trehalosa en la naturaleza, o incluso en aquellas plantas que han sido genéticamente modificadas para la sobre producción de este compuesto, permanecen por debajo de 1 mg/g de peso fresco, lo que sugiere que la trehalosa no funciona como osmoprotector en las plantas, sino que más bien debe tener otra

función más específica. Garg y col. (2002) y Ponnu y col. (2011) revisaron la relevancia molecular y las funciones que, hasta el momento, habían sido propuestas y parcialmente demostradas para la trehalosa en las plantas. De forma más específica, se ha demostrado que la trehalosa-6 fosfato (T6P), el precursor de la trehalosa, regula la utilización de la sacarosa en plantas y es importante para la regulación del metabolismo del carbono, por participar en la inducción de la síntesis del almidón en los plastos (Wingler, 2002; Kolbe y col., 2005; Lunn y col., 2006; Lunn, 2007; Singh y Shah, 2012). Schluepmann y col. (2004) propusieron que la habilidad de las plantas para utilizar sacarosa aumentaba cuando las concentraciones de trehalosa eran elevadas. La trehalosa también ha sido asociada con la capacidad de inducción de la fotosíntesis, con el desarrollo de las plantas y con el crecimiento celular mediante una ruta reguladora, donde T6P, SnRK1 y bZIP11 están interconectadas y funcionan de manera coordinada (Ponnu y col., 2011). De este modo, se ha propuesto que cuando el contenido en sacarosa y la concentración de T6P disminuyen, SnRK1 es activado, lo que conlleva a la inducción de genes involucrados en los procesos relacionados con la fotosíntesis; Así, una mayor cantidad de carbono estaría disponible para el crecimiento de las células (Delatte y col., 2011).

En la figura 1.8 se muestra la síntesis de trehalosa y su implicación en el metabolismo de los carbohidratos. La trehalosa-6-fosfato (T6P) se sintetiza a partir de UDP-glucosa (UDPG) y glucosa-6-fosfato (G6P) por la actividad de la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) y su consiguiente conversión a trehalosa por la actividad de la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP). La trehalasa 1 (TRE1) hidroliza a la trehalosa en dos moléculas de glucosa.

Los mecanismos de acción así como las posibles funciones que la trehalosa pueda tener en plantas están aún por demostrar, por lo que los estudios que conlleven una acumulación de trehalosa y el cómo y por qué se acumulan en plantas son de enorme interés científico.

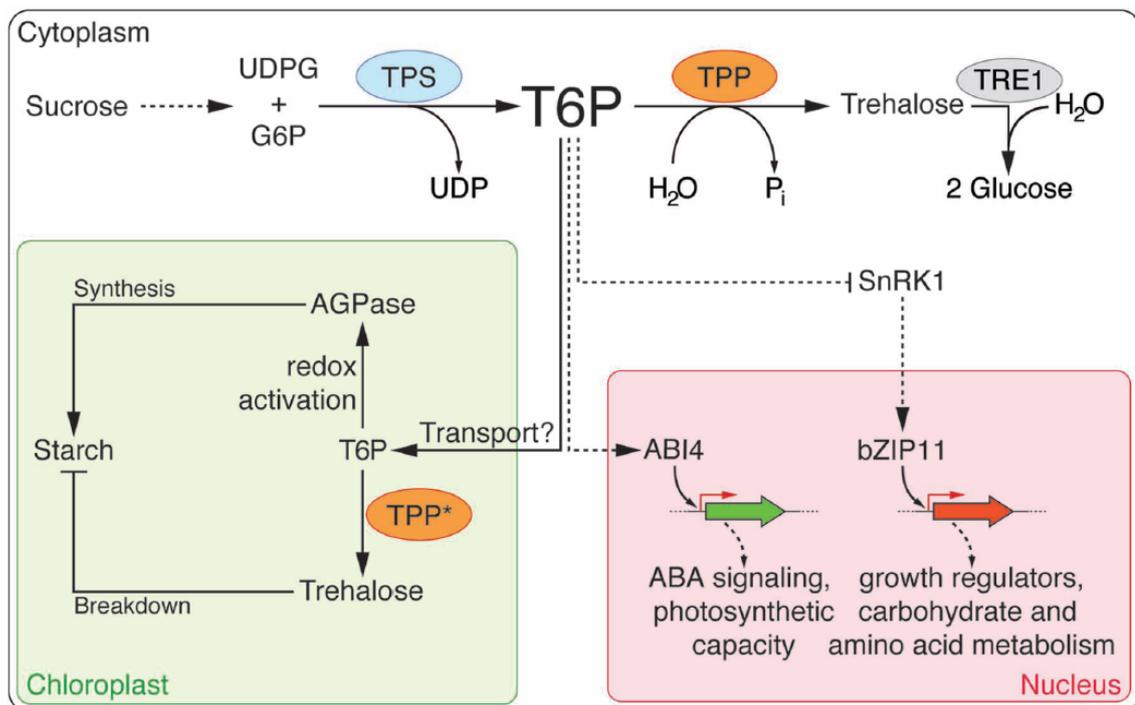


Figura 1.8. Síntesis de la trehalosa y su función en el metabolismo de los carbohidratos. Fuente: Ponnu y col. (2011)

Almidón, sacarosa, glucosa y fructosa

El almidón es un polisacárido de reserva predominante en plantas vasculares, constituido por la unión de numerosos monómeros de glucosa. Su síntesis y acumulación también influye en el rendimiento de los cultivos ya que se trata del componente principal de las partes de plantas cosechables de numerosos cultivos agronómicos, es decir, los frutos, semillas o tubérculos. Se sintetiza en los plastos, tanto de células fotosintéticas como no fotosintéticas. El almidón es sintetizado gracias a la actividad almidón sintasa (SS; starch synthase) a partir de ADP-glucosa (ADPG). El gránulo de almidón es formado a partir de dos compuestos: amilosa y amilopectina, ambas formadas de polímeros de uniones de α -D-glucosa. La amilosa es un polímero lineal con miles de moléculas de glucosa en una cadena sin ramificar y suele constituir del 25 al 30% del almidón; mientras que la amilopectina es una cadena altamente ramificada de forma regular con numerosos enlaces α -1, 6 y su peso molecular es muy elevado. Estas dos moléculas están unidas formando un gránulo de almidón semicristalino. Las proporciones exactas de estas moléculas y el tamaño y forma del

gránulo varían según la especie y según el órgano dentro de la misma planta (Slattery y col., 2000; Burrell, 2003; Mooney, 2009).

Los cloroplastos maduros de células fotosintéticamente activas poseen la capacidad de proporcionar energía (ATP) y fijar carbono para la síntesis de almidón durante la iluminación. Sin embargo, la producción del almidón de almacenamiento a largo plazo tiene lugar en los amiloplastos o plastos de órganos de reserva, como tubérculos, raíces y semillas (órganos no fotosintéticos) y depende del suministro de entrada de energía y de los precursores de carbono disponibles en el citosol. Las diferencias entre la capacidad metabólica de cloroplastos y amiloplastos ha llevado a la aceptación generalizada que la ruta(s) implicadas en la síntesis del almidón son diferentes en células fotosintéticas y no fotosintéticas (Bahaji y col., 2013).

Las plantas son llamados organismos “autótrofos” ya que pueden fabricar sus necesidades mediante la fotosíntesis, convirtiendo el dióxido de carbono y el agua en azúcares combustibles con la adición de energía solar. En periodos de crecimiento vegetativo, el principal producto de la fotosíntesis es la glucosa, aunque usualmente ésta es transformada en otro gran carbohidrato como es la sacarosa. La sacarosa, la cual proviene de la fusión de una molécula de glucosa y otra de fructosa, se sintetiza en el citoplasma y ésta, dependiendo de las necesidades energéticas de la planta, puede ser igualmente degradada a sus componentes principales gracias a la acción de las invertasas (Figura 1.9). En la síntesis de sacarosa, la glucosa-1-fosfato es transformada a UDP-glucosa por la acción de UDP-glucosa fosforilasa específica. En esta etapa suceden dos reacciones simultáneas para completar la síntesis: primero, la sacarosa-6-fosfato sintasa (SPS) cataliza la reacción de UDP-glucosa con fructosa-6-fosfato para dar sacarosa-6-fosfato y UDP y segundo, la sacarosa-6-fosfato fosfatasa (SPP) cataliza la reacción de la sacarosa-6-fosfato dando como resultado sacarosa (Huber y Huber, 1996).

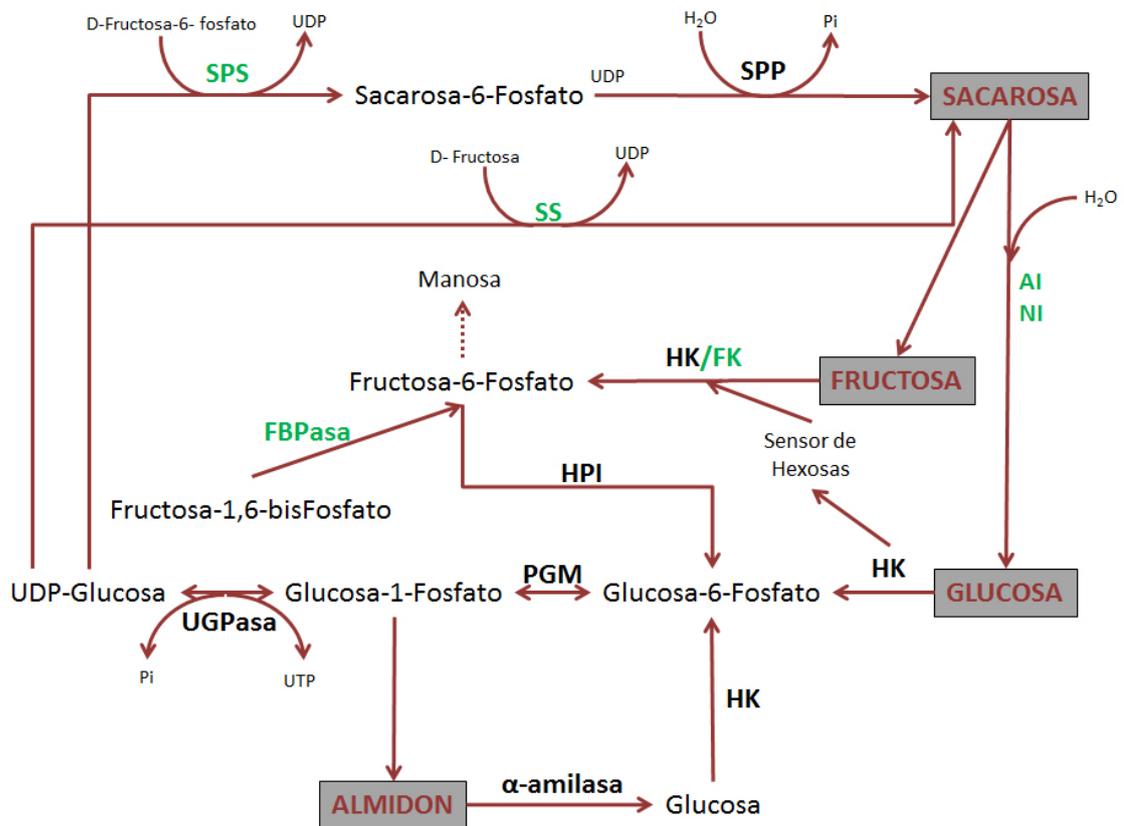


Figura 1.9. Ruta metabólica principal de la biosíntesis del almidón que incluye la síntesis y degradación de sacarosa.

Los carbohidratos son uno de los mayores constituyentes de las plantas y representan el grupo más grandes dentro de los compuestos orgánicos. Los azúcares solubles (glucosa, fructosa, sacarosa) se acumulan con estrés salino para facilitar el equilibrio iónico en las vacuolas (Ashraf y Harris, 2004; Parida y Das, 2005). Sus principales funciones son osmoprotección, ajuste osmótico, almacenamiento, detoxificación de radicales y estabilización de la estructura de las proteínas como la RuBisCo. Nedjimi (2011) vio una acumulación de azúcares para ajuste osmótico significativa, de manera de la concentración de azúcares se incrementaba a medida que aumentaba la salinidad en el medio. Resultados similares fueron obtenidos por Morant-Manceau y col. (2004) que publicaron como cambiaba la concentración de azúcares en respuesta al estrés por salinidad en *Triticum dicoccum*. La homeostasis en general, incluyendo la biosíntesis y compartimentación de carbohidratos es afectada por las altas temperaturas retando a los tejidos de las plantas (Maestri y col.,

2002). Las altas temperaturas modifican las actividades de las enzimas implicadas en la acumulación de almidón y la síntesis de sacarosa, por la disminución de la expresión de genes específicos en el metabolismo de los carbohidratos (Ruan y col., 2010). Durante el estrés por altas temperaturas, hay estudios que sugieren que la alta disponibilidad de carbohidratos (por ejemplo sacarosa y glucosa) representa una característica fisiológica muy importante asociada con la tolerancia al estrés por altas temperaturas (Liu y Huang, 2000).

En plantas, los carbohidratos tienen una gran cantidad de funciones fisiológicas, como son la síntesis de celulosa que forma parte de los componentes estructurales de la célula, síntesis de gomas y mucílagos para prevenir a las plantas de la desecación, y como parte fundamental de otros componentes celulares (Ohto y col., 2001). Hace ya algunos años se describió a los carbohidratos como compuestos fundamentales en la señalización celular, regulando la expresión de multitud de genes (Koch, 1996) y además, regulando varios aspectos importantes del desarrollo de las plantas. Así por ejemplo, en plántulas de *Arabidopsis*, elevados niveles de carbohidratos en el medio de crecimiento inhibían la elongación del hipocotilo en oscuridad (Jang y col., 1997), y la apertura de los cotiledones inducida por la luz (Dijkwel y col., 1997; Jang y col., 1997). Adicionalmente, la floración de las plantas parece ser también un aspecto que está regulado por los carbohidratos. Hay una gran cantidad de evidencias que sugieren que la sacarosa promueve la floración en la mayoría de las especies que se han examinado (Bernier y col., 1993). Además, los carbohidratos están implicados en los mecanismos de resistencia a un ataque por patógenos y en los procesos de división celular. Por último, se les ha atribuido propiedades específicas como la de capacidad de retención de agua en periodos de desecación y la de conferir plasticidad a las membranas.

1.3.2. Estrés oxidativo

Cualquier factor o circunstancia que rompa o desequilibre la homeostasis redox celular puede dar lugar a un estrés oxidativo o, lo que es lo mismo, a una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Asada, 1994). Esta sobreproducción de ROS debida a la actuación de uno o varios estreses ambientales es uno de los principales factores causantes de la reducción de la producción en la mayoría de los cultivos, del daño celular y, a la larga, de la muerte de las plantas. Estos ROS

son producidos normalmente bajo condiciones óptimas, aunque su producción y patrón de acumulación está finamente regulado por antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. En situaciones de estrés, la producción de ROS es generalmente masiva y los sistemas antioxidantes se ven desbordados. Esta producción descontrolada de ROS puede causar daño celular ya que éstos van a producir una desactivación generalizada de importantes enzimas, roturas de complejos ADN/ARN, oxidación proteica y peroxidación lipídica, entre otros procesos afectados. De entre los ROS producidos en plantas, el ion superóxido ($O^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son los más importantes debido a su alta toxicidad, a su permeabilidad a través de la membrana y a sus niveles de acumulación en la célula. H_2O_2 es moderadamente reactivo y su exceso en las células vegetales produce un importante estrés oxidativo (Gill y Tuteja, 2010).

Es bien conocido que la acumulación celular de H_2O_2 provoca la peroxidación de lípidos, lo que es considerado como el proceso más perjudicial que se conoce en un organismo vivo. Los hidroperóxidos lipídicos generados son fácilmente descompuestos en varias especies reactivas como radicales alcoxil lipídicos, malondialdehído, alcanos, epóxidos y alcoholes lipídicos (Davis y Swanson, 2001; Fam y Morrow, 2003). Los efectos globales de la peroxidación lipídica son una reducción en la fluidez de la membrana (lo que hace más fácil que los fosfolípidos se intercambien entre las dos partes de la bicapa lipídica), un incremento en el paso de sustancias a través de la membrana (que en condiciones normales no la atravesarían) y daños a las proteínas de la membrana, lo que conllevaría a la inactivación de receptores, enzimas y canales iónicos (Gill y Tuteja, 2010).

Las plantas han desarrollado una poderosa maquinaria de defensa antioxidante que las protege contra los daños del estrés oxidativo. Esta maquinaria consiste en un potente sistema antioxidante de defensa enzimático y no enzimático, que trabaja en coordinación con las cascadas de oxidación descontrolada, protegiendo de este modo a las células vegetales de los daños oxidativos mediante la detoxificación directa de ROS. De entre las enzimas antioxidantes podemos destacar las superóxido dismutasas (SODs), catalasa (CAT), peroxidasas (PDXs) y las enzimas pertenecientes al ciclo ascorbato-glutatión, como son ascorbato peroxidasa (APX), dehidro y monodehidro ascorbato reductasa (DHAR, MDHAR), y glutatión reductasa (GR) (Figura 1.10). Entre los compuestos antioxidantes no enzimáticos más importantes

destacamos ascorbato (AsA), glutatión (GSH), compuestos fenólicos, aminoácidos no proteicos y α -tocoferol. Cambios en el proceso de regeneración de compuestos antioxidantes llevados a cabo durante el ciclo ascorbato-glutatión pueden dar lugar a una alteración redox, descompensando la proporción óptima de AsA/dehidroascorbato (DHA) o GSH/glutatión oxidado (GSSG) de las células (Rivero y col., 2007; Tausz y col., 2009). Varios estudios llevados a cabo en diferentes especies de plantas bajo condiciones de estrés abiótico han dilucidado que un alto índice de GSH/GSSG y/o AsA/DHA debido a un incremento de GSH y AsA o por la disminución de las actividades de las enzimas encargadas de su regeneración, GSSG y DHA, pueden ser el factor clave de la protección eficiente contra la acumulación de ROS inducida por estrés (Szalai y col., 2009) (Figura 1.10).

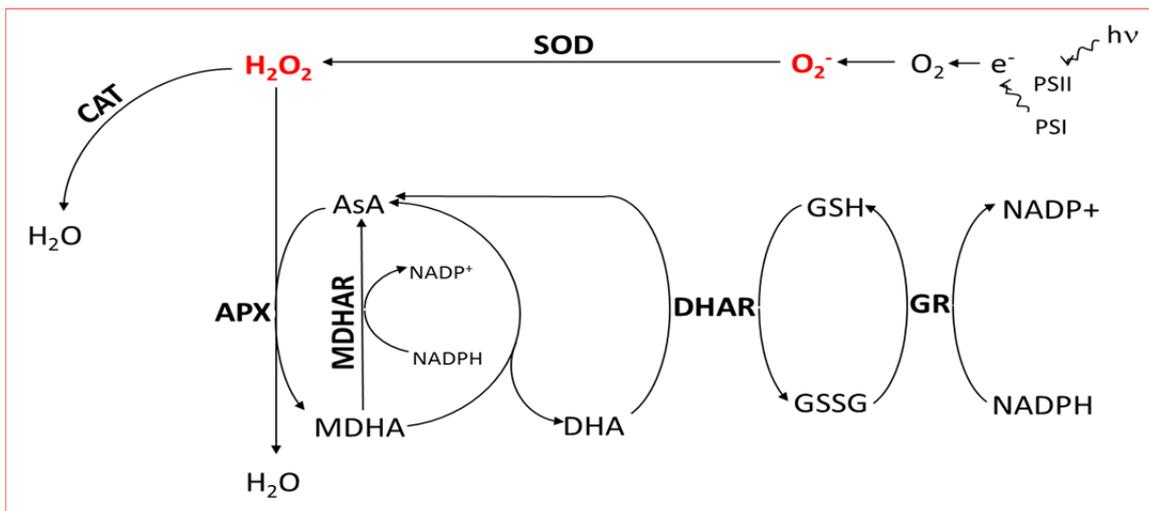


Figura 1.10. Esquema general del metabolismo oxidativo

En los últimos años, numerosos estudios se han centrado en la posible relación entre la producción de BER y el estrés oxidativo, con la intención de encontrar una primera causa aparte de la deficiencia de Ca^{2+} en la aparición de BER en frutos de tomate. Casado-Vela y col. (2004) demostraron el posible papel de algunas enzimas antioxidantes y de la ruta de las pentosas-fosfato a través de una aproximación proteómica en frutos de tomate con BER. Di Matteo y col. (2010) también demostraron que la concentración de ácido ascórbico en frutos de tomate estaba asociada con la

expresión de genes involucrados en la degradación de pectinas y en la aparición de BER. Turhan y col. (2006) demostraron que el incremento de los niveles de ácido ascórbico y PDX en BER inducido por la salinidad era parte de un mecanismo antioxidante de protección que determinaba la sensibilidad de este cultivo al BER. Sin embargo, hasta la fecha, no hay evidencia científica de que el estrés oxidativo sea la primera causa de la incidencia de BER, aunque algunos resultados apuntan a que éste pueda ser la principal causa del desarrollo de esta fisiopatía debido a la ruptura en la homeostasis de glutatión.

1.3.3. Calidad de los frutos

El tomate es una planta que es ampliamente cultivada en regiones donde su irrigación con aguas salinas y las altas temperaturas afectan considerablemente a la fase de cuajado de fruto, produciendo pérdidas considerables en producción (Hazra y Ansary, 2008). Las altas temperaturas afectan al crecimiento vegetativo y a la producción (Max y col., 2009), induciendo cierre estomático con la consecuente reducción de la transpiración y de la fotosíntesis (Morales y col., 2003). Consecuentemente, se reduce la biomasa y la tasa de transporte por el xilema (Adams y Ho, 1992), lo que afecta negativamente a la producción y/o a la calidad de los frutos. La salinidad también provoca en tomate diversos efectos adversos (Cuartero y Fernandez-Munoz, 1999), como son una disminución en el porcentaje de germinación y una prolongación en el tiempo de germinación. Las altas temperaturas también afectan a la floración (Dane y col., 1991), polinización (Adams y col., 2001) y al cuajado (Peet y col., 1997), resultando en la disminución en el número de frutos y en la calidad comercial de éstos (Kleinhenz y col., 2006). Con salinidad, el número y peso de los frutos también se afectan negativamente, de manera que su rendimiento comercial disminuye (Cuartero y Fernandez-Munoz, 1999).

Por el contrario, la salinidad puede mejorar la calidad de los frutos en términos organolépticos, pero en muchos casos a costa de disminuir la producción o el tamaño general de los frutos. Algunos investigadores han descrito que un incremento en la conductividad eléctrica (CE) de la solución nutritiva con NaCl podría aumentar ciertos parámetros de referencia de calidad de los frutos de tomate, como son la acidez valorable y la cantidad de sólidos solubles (azúcares y ácidos orgánicos), lo que indicaría un potenciamiento del sabor de los mismos (Lin y Block, 1998; Flores y col.,

2003; Wu y Kubota, 2008; Zushi y Matsuzoe, 2011). En experimentos llevados a cabo por Thybo y col. (2005), una CE alta dio lugar a frutos más rojos, con mayor firmeza, y más dulces. En general, los frutos de tomate procedentes de plantas cultivadas en medios más o menos salinos, tiene una mayor calidad organoléptica (Cuartero y Fernandez-Munoz, 1999), sin embargo son en general frutos más pequeños. El término calidad no es objetivo y es difícil establecer unos parámetros para poder clasificar a los tomates bajo este criterio. Los sólidos solubles totales (medidos en °Brix) es el criterio más importante y utilizado a la hora de valorar la calidad de un tomate para su procesado y sirve de base para fijar el precio que se le atribuye a dicho producto en el mercado. El sabor no depende siempre del contenido total de azúcares del fruto, pero los tomates que crecen bajo condiciones salinas suelen tener mejor sabor que los que crecen con agua de baja CE, y éstos siempre tienen un contenido en azúcares superior.

La salinidad y las altas temperaturas también causan desórdenes fisiológicos en los frutos, como son la podredumbre apical o Blossom-end rot (BER) y el rajado del fruto (Cuartero y Fernandez-Munoz, 1999; Taylor y col., 2004), lo que puede reducir la producción comercial entre un 50 y un 95% (Dorais y col., 2004; Taylor y col., 2004). Debido a la elevada incidencia de BER en frutos de plantas desarrolladas tanto con salinidad como con altas temperaturas, en esta Tesis hemos decidido dedicarle mención especial y un estudio más detallado.

1.3.4. Podredumbre apical o Blossom-end rot (BER) en tomate

El blossom-end rot (BER) o podredumbre apical fue identificado en tomate hace más de 100 años y fue inicialmente definido como un desorden fisiológico (Selby, 1986). BER ha sido también identificado en otros frutos de Solanaceas como son el pimiento, la berenjena y la sandía (Casado-Vela y col., 2005). BER puede darse en todas las áreas de producción de tomate de todo el mundo y es la causa de hasta el 50% de las pérdidas ocurridas en producción de este cultivo (Casado-Vela y col., 2005). Este desorden fisiológico ha sido objeto de numerosos estudios, pero el principal o los principales mecanismos que lo desencadenan todavía no están claros. La incidencia de BER ha sido relacionada en la mayoría de los estudios realizados al respecto con una alteración en la translocación del Ca^{2+} a la parte distal del fruto (Ho y col., 1993; Olle y Bender, 2009), lo que a su vez puede ser la consecuencia de la

actuación de varios factores, como la salinidad, altas temperaturas, alta y baja transpiración de plantas y/o frutos, que el Ca^{2+} contenido en la solución del suelo sea poco soluble, una elevada concentración de Mg^{+} , amonio (NH_4^{+}) y/o K^{+} en la solución del suelo, inadecuado desarrollo del xilema, acelerada tasa de crecimiento (Taylor y Locascio, 2004), etc. Algunos autores proponen que durante la expansión celular, la demanda de Ca^{2+} puede exceder la cantidad de Ca^{2+} disponible, lo cual produce un debilitamiento de la pared celular y pérdida de la integridad celular (Figura 1.11).

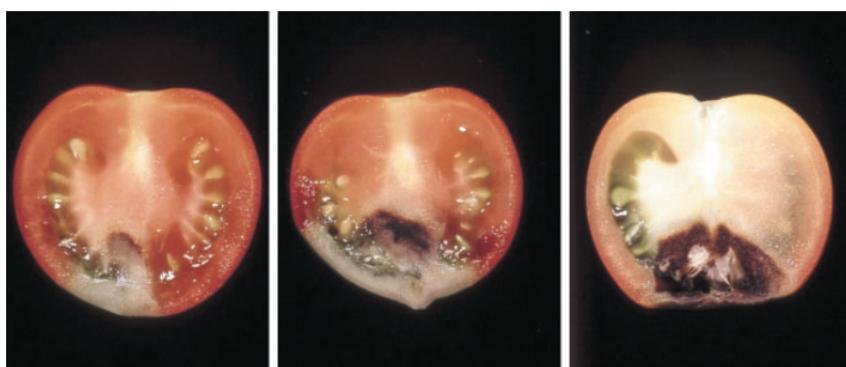


Figura 1.11. Síntomas de BER interno y externo en tomate maduro.
Fuente Ho y White, 2005.

El Ca^{2+} desempeña un papel crucial como macroelemento necesario para el crecimiento de las plantas. Es un nutriente necesario para varios procesos celulares importantes, como son el mantenimiento de la estructura de la pared celular, está implicado en la tolerancia a estreses ambientales (salinidad, sequía, frío, calor, etc.), y más importante, puede actuar como segundo mensajero en la transducción de señales en las plantas (Buchanan y Engman, 2002; Chaney y col., 2008; Chao y col., 2009). El Ca^{2+} es transportado a las plantas gracias a la corriente de transpiración. Como el Ca^{2+} no es un elemento muy móvil en la planta, cortos periodos de deficiencia afectan rápidamente a los órganos y tejidos en crecimiento (Kleemann, 2000; Olle y Bender, 2009). Los desórdenes producidos por una deficiencia de Ca^{2+} en los frutos han cobrado más importancia y protagonismo en los últimos años, debido posiblemente a la intensificación de las prácticas de producción. Sin embargo, una deficiencia fisiológica de Ca^{2+} no puede ser generalmente prevenida con una fertilización adicional con este nutriente. Hay algunos trabajos que mostraban que, estando las concentraciones de Ca^{2+} en la solución de riego de las plantas en condiciones

óptimas, las plantas mostraban deficiencia en este nutriente (Olle y Bender, 2009). Por lo tanto, es muy difícil proteger a las plantas frente a los desórdenes fisiológicos causados por una alteración en la translocación de dicho nutriente (Olle y Bender, 2009). En los últimos años, numerosos autores han compartido la opinión común de que la nutrición de Ca^{2+} puede que no sea ni el principal ni el único factor en el desarrollo de BER (Saure, 2001; Ho y White, 2005). Estas deducciones vienen de las siguientes observaciones: (a) existen numerosas y amplias discrepancias en los valores publicados de las concentraciones de Ca^{2+} en frutos con BER y sin BER (Nonami y col., 1994); (b) BER también puede ser inducido manteniendo niveles óptimos de Ca^{2+} en el medio pero cambiando la concentración de otros nutrientes (Nukaya y col., 1995); y (c) no existen pruebas evidentes que demuestren el papel principal del Ca^{2+} cuando BER es inducido por uno o varios estreses ambientales (Saure, 2001; Aktas y col., 2005; Chao y col., 2009).

La Figura 1.12 muestra alguno de los mecanismos implicados en la absorción, translocación y distribución de Ca^{2+} en las plantas.

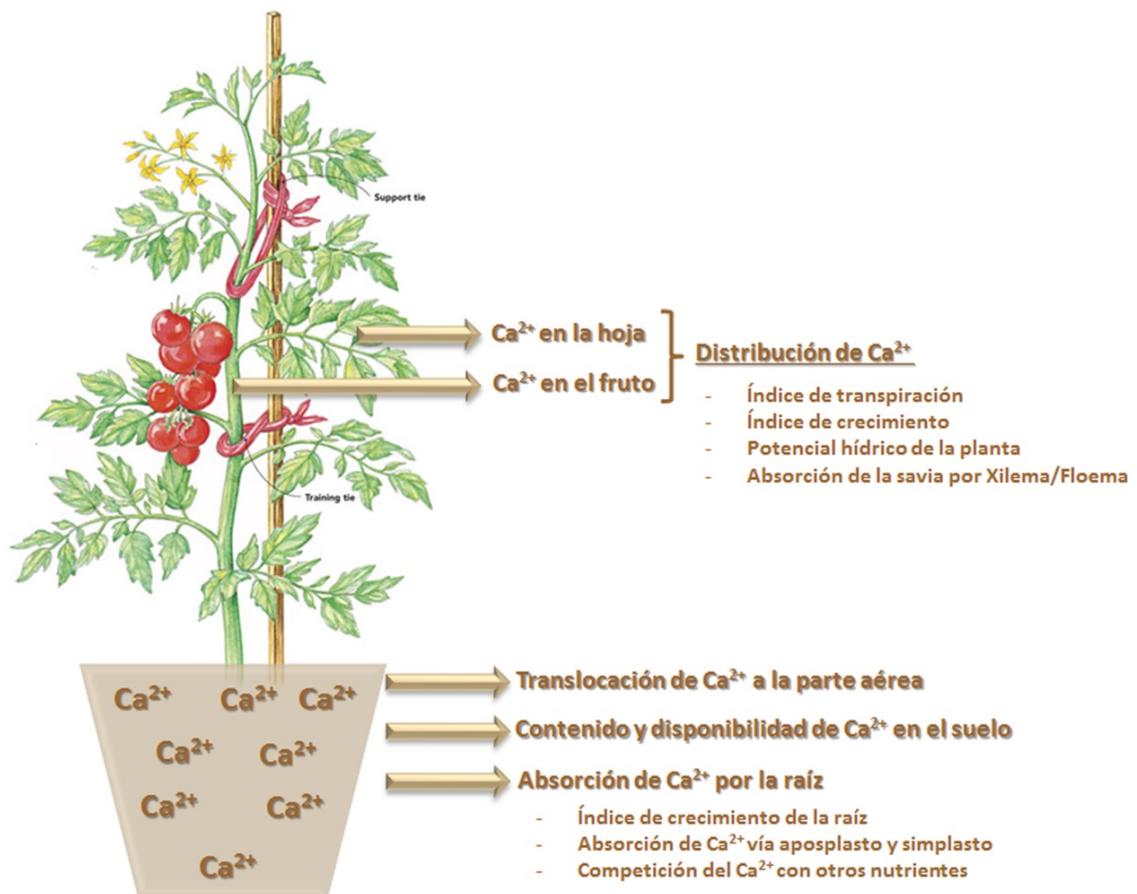


Figura 1.12. Mecanismos implicados en la absorción, translocación y distribución de Ca^{2+} en plantas. Fuente: (De Freitas y Mitcham, 2012)

Así, la absorción de Ca^{2+} por la raíz va a venir condicionada, no sólo por la disponibilidad de este nutriente en el suelo, sino también por el índice de crecimiento de la raíz, por los sistemas de transporte de este nutriente vía apoplasto y simplasto, y por la competición que pueda existir entre el Ca^{2+} y otros nutrientes. La distribución del Ca^{2+} de las hojas a los frutos va a venir condicionada por las corrientes de transpiración, por el índice de crecimiento del fruto, por el potencial hídrico de las hojas (que va a condicionar el transporte de agua hacia el fruto) y, además, por el transporte de savia xilemática o floemática.

El contenido total de Ca^{2+} puede limitar la concentración de este nutriente dentro de la célula y consecuentemente, la susceptibilidad de los frutos a desordenes provocados por deficiencias de Ca^{2+} . Sin embargo, la concentración exacta de Ca^{2+} de reserva celular está altamente regulada por mecanismos que controlan la distribución

de Ca^{2+} celular. Estos mecanismos han sido recientemente mostrados hasta su nivel más pequeño (Park y col., 2005; De Freitas y col., 2011). En estos estudios, los desórdenes provocados por una deficiencia de Ca^{2+} fueron inducidos en frutos mediante una modificación genética de la distribución a nivel celular de este nutriente (Park y col., 2005; De Freitas y col., 2011).

El primer nivel de regulación se encuentra a nivel de pared celular (Figura 1.13). La mayor parte del Ca^{2+} contenido en un fruto se encuentra en la pared celular (Demarty y col., 1984; De Freitas y col., 2011), lo que le hace ser el regulador más importante de la distribución de este nutriente a nivel celular y subcelular. Los movimientos de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática de las células se lleva a cabo mediante la actividad de ciertos canales específicos para el Ca^{2+} , así como por antiportadores y ATPasas de membrana (White y Broadley, 2003). Muchos de los orgánulos celulares son compartimentos de almacenaje de Ca^{2+} . La vacuola representa el orgánulo con mayor reserva de Ca^{2+} de la célula (1–10mM Ca^{2+}). El contenido de Ca^{2+} dentro de los diferentes orgánulos está determinado, al igual que en la membrana plasmática, por la actividad de canales específicos para ese ión, antiportadores y ATPasas (Figura 1.13), los cuales están finamente regulados (White y Broadley, 2003; Clapham, 2007).

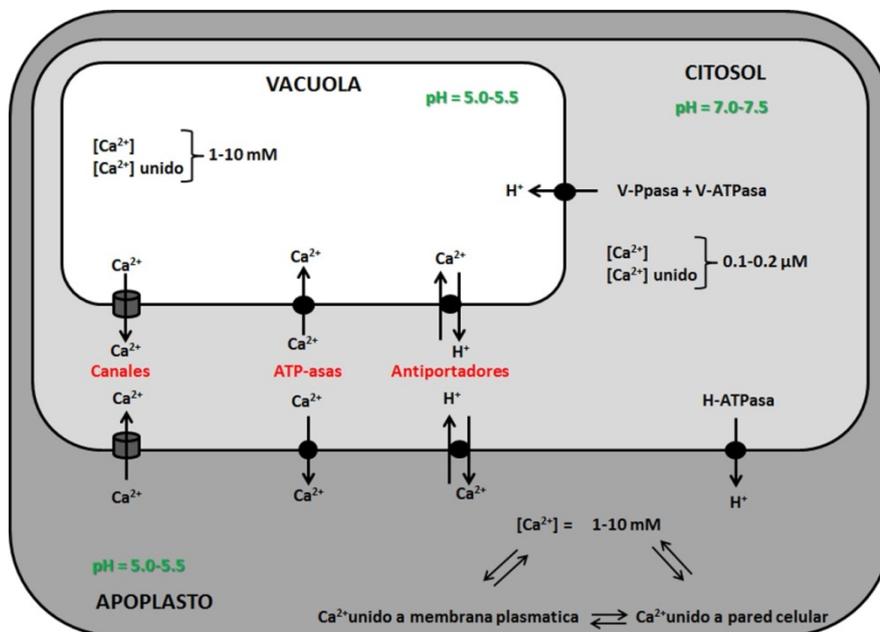


Figura 1.13. Mecanismos implicados en la regulación de la distribución celular de Ca^{2+} . Fuente: De Freitas y Mitcham (2012)

Tanto la temperatura como la salinidad son estreses abióticos que reducen considerablemente la disponibilidad de Ca^{2+} para las plantas, dando lugar a desórdenes fisiológicos que se manifiestan en órganos vegetativos y en frutos (Ill-Hwan y col., 1997; Dorji y col., 2005). Varios trabajos atribuyen esta deficiencia de Ca^{2+} al estrés hídrico asociado con la salinidad, provocando un movimiento limitado de Ca^{2+} vía xilema hacia el fruto (Adams y Ho, 1992; White, 2001; Ho y White, 2005) (Figura 1.14).

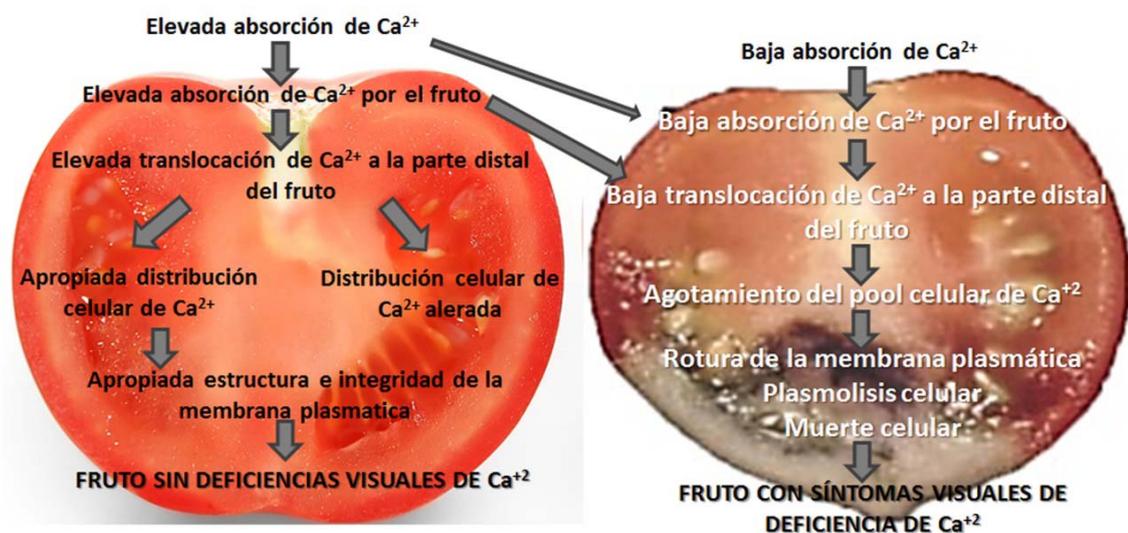


Figura 1.14. Mecanismo de aparición de BER

Adicionalmente, hay trabajos que muestran que la salinidad reduce considerablemente el número de vasos en los frutos, lo que provoca una reducción de la absorción de Ca^{2+} por este órgano (Belda y Ho, 1993; Belda y col., 1996; Davies y col., 2000). Por otro lado, los frutos que se desarrollan bajo condiciones salinas tienen altos niveles de ROS en el apoplasto, y el incremento en dichos niveles coincidía con el desarrollo de BER en los frutos (Aktas y col., 2005). De acuerdo con esto, otros estudios han mostrado como un incremento en la salinidad daba lugar a elevadas concentraciones de H_2O_2 en los frutos, y que esto coincidía con un aumento en la incidencia de desórdenes fisiológicos en los mismos (Turhan y col., 2006).

Por otro lado, se ha demostrado que elevadas temperaturas aceleran la expansión de los frutos, debido quizás a un incremento del índice fotosintético y del

abastecimiento de foto-asimilados al fruto (Ho y White, 2005). Una rápida expansión del fruto puede diluir el contenido de Ca^{2+} del mismo e incrementar la susceptibilidad a los desórdenes provocados por la deficiencia de este catión (Dekock y col., 1982; Bertin y col., 2000). Estudios previos han sugerido que dichos desórdenes pueden ser inducidos rápidamente en la parte distal de los frutos cuando la demanda de Ca^{2+} excede al abastecimiento de este catión vía xilema (Ho y col., 1993; Ho y White, 2005).

Los niveles de otros nutrientes puede a su vez afectar a la absorción y contenido de Ca^{2+} (Taylor y col., 2004; Ho y White, 2005). Así por ejemplo, elevados niveles de nitrógeno (N) incrementan el crecimiento de la parte aérea, lo que da lugar a un aumento del movimiento de Ca^{2+} hacia las hojas y no hacia los frutos, debido a que las hojas son órganos de mayor transpiración (Pill y Lambeth, 1980; Ikeda y Osawa, 1988; Ho, 1999; Ho y White, 2005). Además, elevados niveles de N provocan una rápida expansión de los frutos, lo que puede derivar en una dilución del contenido total de Ca^{2+} en el fruto (Bar-Tal y col., 2001; Saure, 2001). También se han encontrado, por ejemplo, elevados niveles de K^+ y Mg^{2+} en frutos con síntomas de deficiencia de Ca^{2+} (De Freitas y col., 2010). El K^+ es conocido por estar implicado en los procesos de expansión celular (Elumalai y col., 2002), sugiriéndose así que elevados niveles de este nutriente pueden favorecer un rápido crecimiento de la planta y de sus frutos dando lugar a una reducción de Ca^{2+} , como hemos indicado anteriormente. Además, el K^+ y Mg^{2+} compiten con el Ca^{2+} por los sitios de unión en la membrana plasmática (Schonher.J y Bukovac, 1973; Yermiyahu y col., 1994). De esta manera, elevadas cantidades de K^+ y Mg^{2+} podrían desplazar al Ca^{2+} a nivel de membrana plasmática, aunque no podrían ejercer su función estructural en la misma (Schonher.J y Bukovac, 1973; Yermiyahu y col., 1994), con lo que la membrana plasmática sufriría debilitamientos y poros, lo que incrementaría la susceptibilidad de estos frutos a desórdenes asociados a una deficiencia de Ca^{2+} . Ya que el N, el K^+ y Mg^{2+} pueden afectar al transporte de Ca^{2+} al fruto y ya que el papel del Ca^{2+} a nivel celular es muy importante, se ha sugerido el estudio de ciertas relaciones de estos nutrientes (es decir N/Ca^{2+} , $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$, $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ y $[\text{K}^+ + \text{Mg}^{2+}]/\text{Ca}^{2+}$) como el método más preciso para predecir la susceptibilidad de los frutos a ciertos desórdenes asociados a la deficiencia de Ca^{2+} , más que el estudio de la concentración total de este catión (Dris y col., 1998; De Freitas y col., 2010).

2. Objetivos y plan de trabajo

2.1. Objetivos

Uno de los problemas más importantes que limita el desarrollo sostenido del sector agrario en la Región de Murcia es la escasez de los recursos hídricos, resultado de su escasa pluviometría definida por su clima semi-árido. Esta escasez obliga a los agricultores a utilizar aguas de baja calidad para el riego, lo que lleva consigo una disminución de la productividad de los cultivos.

El cultivo de tomate es uno de los más importantes productos hortofrutícolas de la cuenca mediterránea. Gran parte de la producción de tomate se lleva a cabo en invernaderos, donde ha ido desarrollándose en los últimos tiempos nuevos sistemas de cultivo como son los cultivos sin suelo, que junto al desarrollo de las nuevas tecnologías en la gestión del clima y la fertirrigación, han mejorado la productividad de los cultivos.

Entre los factores que más negativamente influyen sobre la productividad del tomate en el sureste español son los estreses abióticos, como la salinidad, las altas temperaturas, etc. En las últimas décadas, un gran número de estudios se han centrado en la respuesta de las plantas a diferentes estreses ambientales; sin embargo, la mayoría de los estudios solo se han centrado en los mecanismos de respuesta de las plantas a tratamientos con un solo tipo estrés. Dado que la mayoría de las zonas agrícolas afectadas por la salinidad están localizadas en regiones áridas o semi-áridas, la influencia del estrés por salinidad tiende a agravarse por la acción simultánea de factores xerotérmicos, como las altas temperaturas, que hace necesario el estudio de la respuesta de las plantas para ambos estreses aplicados simultáneamente.

Además, uno de los factores que más inciden en la disminución del rendimiento comercial es la aparición de la podredumbre apical o blossom-end rot (BER) en los frutos, como consecuencia del riego con aguas salinas o el cultivo bajo condiciones de altas temperaturas.

Por tanto, como consecuencia de lo anteriormente expuesto, se han planteado los siguientes objetivos.

2.1.1. Objetivo 1. Establecer la respuesta de tomate a la combinación de dos estreses, salinidad y altas temperaturas.

- a) Estudiar aspectos agronómicos y fisiológicos de la respuesta de tomate a la combinación de salinidad y altas temperaturas.
- b) Estudiar la respuesta primaria de la planta de tomate (primeras 72 horas de exposición al estrés) a la combinación de salinidad y altas temperaturas, a nivel fisiológico, bioquímico y molecular.

2.1.2. Objetivo 2. Profundizar en los mecanismos relacionados con el desarrollo de la podredumbre apical o blossom-end rot (BER), fisiopatía relacionada con los estreses abióticos estudiados.

2.2. Plan de trabajo

Para lograr la consecución de los objetivos indicados anteriormente, se llevaron a cabo una serie de experimentos:

2.2.1. Objetivo 1

- a) **Experimento 1 a. Respuesta agronómica y fisiológica de tomate a la combinación de salinidad y altas temperaturas.** Para estudiar aspectos fisiológicos con relación a la producción y calidad de los frutos de tomate con la combinación de salinidad y altas temperaturas, se cultivó tomate comercial *Solanum lycopersicum* L. variedad Anairis en hidropónico y en dos módulos independientes de invernadero con temperaturas máximas de 25°C y 35°C, en combinación con diferentes concentraciones salinas de NaCl, 10 mM, 30 mM, 60 mM y 90 mM. Las plantas se dejaron crecer hasta fructificación. Se determinaron parámetros de crecimiento, producción y de intercambio gaseoso. Se realizaron análisis de parámetros físicos y químicos de la calidad de los frutos, y se determinó el estado nutricional de las plantas y de los frutos.
- b) **Experimento 1b. Respuesta primaria de la planta de tomate a la combinación de salinidad y altas temperaturas. Aspectos fisiológicos, bioquímicos y moleculares.** Para analizar la respuesta primaria de la planta de tomate a la combinación de salinidad y altas temperaturas se realizaron experimentos con plantas de tomate *Solanum lycopersicum* L. variedad Óptima

en dos cámaras de cultivo, en condiciones controladas. Se realizó un diseño experimental con dos tratamientos de temperatura (25°C y 35°C) combinados con 2 tratamientos salinos (0 y 120 mM NaCl). Con el fin de estudiar y detectar la respuesta primaria a la combinación de estreses se realizaron 3 cosechas durante el experimento, a las 24, 48 y 72 horas después de iniciar los tratamientos. Se determinaron parámetros relacionados con el intercambio gaseoso y con el mantenimiento de las relaciones hídricas en la planta, así como contenido, concentración, e índices de absorción y transporte de Na⁺ y K⁺. Se realizaron análisis en hoja de la concentración de los osmoprotectores más importantes acumulados en plantas bajo las condiciones de estrés usadas, de las actividades enzimáticas encargadas de la síntesis y degradación de estos compuestos, se estudió la expresión de los genes que codifican directamente para las enzimas anteriormente mencionadas, y se determinó la concentración de peróxido de hidrógeno y peroxidación lipídica, oxidación proteica y actividad proteolítica por su relación con los estreses abióticos empleados.

2.2.2. Objetivo 2

Experimento 2. Mecanismos responsables de la aparición de la podredumbre apical o blossom-end rot (BER) en frutos de tomate en plantas sometidas a deficiencia de calcio. Para profundizar en los mecanismos de respuesta relacionados con la aparición de podredumbre apical o BER en tomate, se plantearon una serie de experimentos en cámara de cultivo, en condiciones controladas, y en sistema de cultivo hidropónico con plantas de tomate *Solanum lycopersicum* L. variedad Micro-Tom. Se cultivaron las plantas con tres tratamientos de Ca²⁺ diferentes, 1mM como concentración óptima, y dos tratamientos por debajo del óptimo (0.5 y 0.1 mM), con el objetivo de inducir BER y se llevaron a fructificación. Se realizó un estudio de la producción de frutos, se determinó la concentración de Ca²⁺ en hojas y frutos con BER y sin BER, y se llevó a cabo un exhaustivo estudio del metabolismo oxidativo, cuantificándose las concentraciones de H₂O₂, los antioxidantes ascorbato y glutatión, así como las actividades de las enzimas SOD, CAT, APX, DHAR, MDHAR, GR y NADPH oxidasa. Estos estudios se llevaron a cabo en frutos a los 10, 15 y 20 días después del cuaje.

3. Material y Métodos

3.1. Material vegetal

Todos los experimentos descritos en esta memoria se han realizado con plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) variedad Anairis, Óptima y Micro-Tom. Como tomate comercial se utilizaron las variedades Óptima y Anairis. El motivo de utilizar dos variedades de tomate comercial fue porque, al principio se optó por utilizar Óptima, por ser una variedad de tomate común en los campos de la zona; pero al cabo de un tiempo, se cambió a la variedad Anairis, ya que era más reciente y estaba teniendo un gran éxito a nivel comercial en la producción de tomate en fresco.

Como planta de tomate modelo se utilizó la variedad de tomate Micro-Tom, por sus características de ciclo corto de desarrollo y pequeño tamaño, que permitía realizar experimentos de fructificación en cámara de cultivo.

3.2. Experimento en invernadero

3.2.1. Respuesta agronómica y fisiológica de tomate a la combinación de salinidad y altas temperaturas

Este experimento se realizó en la finca experimental “Tres Caminos” del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), situada en La Matanza, término municipal de Santomera (Murcia). Se llevó a cabo entre febrero y julio en dos módulos de invernadero independientes. Cada uno de estos módulos tiene una superficie de 462,5 m² (25*18.5 m) y está formado por 2 naves tipo capilla. La altura es de 5 metros a la canal y de 7,5 a la cumbre. Está construido con policarbonato. A su vez los módulos están separados por pared interna del mismo material (Fotografía 3.1).



Fotografía 3.1. *Imagen de los tres módulos del invernadero*

Para el control de los diferentes parámetros de temperatura, humedad, ventilación y radiación, los distintos módulos cuentan con varios dispositivos.

- **Sistema de ventilación cenital:** Consiste en 4 ventanas cenitales de $\frac{1}{4}$ de arco mariposa motorizada en cada módulo.
- **Pantalla de sombreado:** La pantalla del techo es el modelo IC50, cuyas especificaciones técnicas son 48% de sombreado y 55% de ahorro energético. En los canalones hay pantalla transparente, cuyas especificaciones técnicas son 22% de sombreado y 43% de ahorro energético. La pantalla del techo posee un sistema de tracción mecánica y automático para la apertura y cierre de la pantalla.
- **Sistema de refrigeración:** Para la refrigeración del invernadero, se cuenta con el sistema "AirCooling". Está formado por un módulo de humectación, nueve extractores tipo axial (helicoidal), con persiana de apertura-cierre automático por sistema mecánico (centrifugo de empuje). Los extractores tienen un caudal de 38.000 m³/h. También cuenta con malla anti insectos.
- **Sistema de humidificación AIR-FOG:** Para el control de la humedad interior y aplicación de fitosanitarios se dispone de este sistema. Las conducciones de aire y agua son de PE-63 de uso alimentario con una densidad de boquillas 1 Ud/18 m² con caudal de aire 0.83 m³/h y caudal de agua 5.94 l/h. Tiene un grupo de presión JH 15 5M de 25 L (1CV) con acumulador de 250 litros. Un compresor de aire de 4 CV con calderín de 50 L AIRFOG 2.5-4.12 de 5,5 CV.

- **Sistema de calefacción:** Formado por caldera de 100.000 Kcal con quemador de gasoil de 1 etapa. Electrobomba aceleradora de 1 CV Inox y calderín de expansión de 25 L. Intercambiador de placas de acero inoxidable. Electrobombas aceleradoras de 1 CV para 3 unidades de distribución. Circuito de conducción invernadero de PVC-50mm P_n10 bar. Circuitos de emisión de calor con tubería de PE -16mm con 40 líneas de ida y 40 de retorno. Calderín de presión de 100 L para circuito secundario.

El invernadero incluye un sistema de sensores de radiación, de temperatura y de humedad relativa colocados a una altura de 1.5 m. Todos los valores se registran periódicamente y son almacenados en una base de datos.

Condiciones de cultivo

Las plantas de tomate de la variedad Anairis, procedentes del semillero comercial “Semilleros José y Belén” en Albufera (Alicante), con un mes de edad, se pasaron a un sistema de cultivo hidropónico después de limpiar bien las raíces de turba. Se dispusieron en 48 cubas de polivinilo de 120 L con solución nutritiva Hoagland modificada (Tabla 3.1). Cada cuba se tapó con una plancha de polietileno negro que evitaba, por una parte, la evaporación del agua y, por otra, la exposición a la luz de la solución nutritiva. La solución nutritiva estaba dotada de un sistema de aireación permanente (Fotografía 3.2).

Tabla 3.1. Concentración de las sales utilizadas para la preparación de la *disolución nutritiva Hoagland modificada*.

| Compuesto | Concentración (mM) | Compuesto | Concentración (µM) |
|-----------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| KNO ₃ | 6 | H ₃ BO ₃ | 25 |
| Ca(NO ₃) ₂ | 4 | MnSO ₄ ·H ₂ O | 2 |
| MgSO ₄ | 1 | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 2 |
| KH ₂ PO ₄ | 1 | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,5 |
| Fe-EDTA | 20 µM | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O | 0,5 |



Fotografía 3.2. *Detalle tapadera contenedor, sistema de aireación y plántula al principio del ensayo.*

Se colocó una planta por cuba, en un orificio central de la plancha. El volumen de las soluciones nutritivas se mantuvo constante mediante la adición de agua desionizada. Dichas soluciones se analizaban semanalmente para reponer los nutrientes absorbidos por la planta o detectar y corregir posibles desequilibrios nutricionales. El pH se controló cada tres días y se mantuvo en el rango de 5.5-6.5 mediante la adición de NaOH 1M ó HNO₃ 1M cuando fue necesario. Las soluciones nutritivas siempre se prepararon con agua desionizada, tanto en los experimentos en cámara de cultivo como en la finca experimental. El agua desionizada se obtenía mediante un sistema de ósmosis inversa modelo KP-HWL.

El sistema utilizado para la aireación de la disolución nutritiva consistió en un electrosoplante situado en el invernadero y una red de tuberías rígidas de PVC que conducían el aire hasta los distintos cubos. Los aireadores estaban colocados en el fondo de los recipientes para lograr una mayor homogeneidad y así evitar la deposición de nutrientes en el fondo. Las plantas se entutoraron mediante unas perchas con hilo de rafia y anillas. Los brotes axilares se fueron eliminando a medida que iban apareciendo, durante todo el ciclo del cultivo.

Para la detección de plagas se utilizaron trampas cromatrópicas de color amarillo para mosca blanca (*Trialeurodes vaporarum* y *Bemisia tabaci*), y pulgones (*Myzus*

persicae y *Aphis gossypii*) y de color azul para los trips (*Frankliniella occidentales*). Cuando se detectó alguna de ellas, se realizaron aplicaciones foliares de las siguientes materias activas: Metil-Clorpirifos (Reldan), Spinosad (Spintor), Imidacloprid (Clorprid) y trampas de agua con feromonas para *tuta absoluta*.

Diseño experimental

Las plantas de tomate se cultivaron en cubos de 120 litros con solución nutritiva Hoagland modificada (Tabla 3.1) en dos módulos distintos. En uno la consigna para la temperatura máxima permitida fue de 25°C y en el otro de 35°C. Las plantas se dejaron crecer en esta solución nutritiva hasta que comenzaron a cuajar los primeros frutos. Fue entonces cuando se aplicaron los distintos tratamientos salinos (Tablas 3.2 y 3.3).

Tabla 3.2. Concentración de macronutrientes y nivel salino para cada tratamiento

| Tratamientos | KNO ₃ mM | Ca(NO ₃) ₂ mM | MgSO ₄ mM | KH ₂ PO ₄ mM | NaCl mM | T ^a (°C) |
|----------------|------------------------|--------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|------------|------------------------|
| Control | 6 | 4 | 1 | 1 | 10 | 25 |
| T | 6 | 4 | 1 | 1 | 10 | 35 |
| S1 | 6 | 4 | 1 | 1 | 30 | 25 |
| S1 + T | 6 | 4 | 1 | 1 | 30 | 35 |
| S2 | 6 | 4 | 1 | 1 | 60 | 25 |
| S2 + T | 6 | 4 | 1 | 1 | 60 | 35 |
| S3 | 6 | 4 | 1 | 1 | 90 | 25 |
| S3 +T | 6 | 4 | 1 | 1 | 90 | 35 |

Tabla 3.3. Concentración de micronutrientes para todos los tratamientos.

| Compuesto | Concentración (µM) |
|--------------------------|--------------------|
| Fe-EDTA | 20 |
| H3BO3 | 25 |
| MnSO4·H2O | 2 |
| ZnSO4·7H2O | 2 |
| CuSO4·5H2O | 0.5 |
| (NH4)6Mo7O24·4H2O | 0.5 |

Se realizó un diseño factorial combinando 2 temperaturas (a 25 y a 35°C) con cuatro tratamientos salinos (10, 30, 60 y 90 mM NaCl). Los tratamientos salinos se distribuyeron en dos bloques en cada módulo, con tres repeticiones por bloque. Los cuatro niveles salinos (10, 30, 60 y 90 mM NaCl) se distribuyeron al azar en cada bloque. En total había seis plantas por tratamiento salino en cada invernadero (a 25 y a 35°C) (Figuras 3.1 y 3.2).

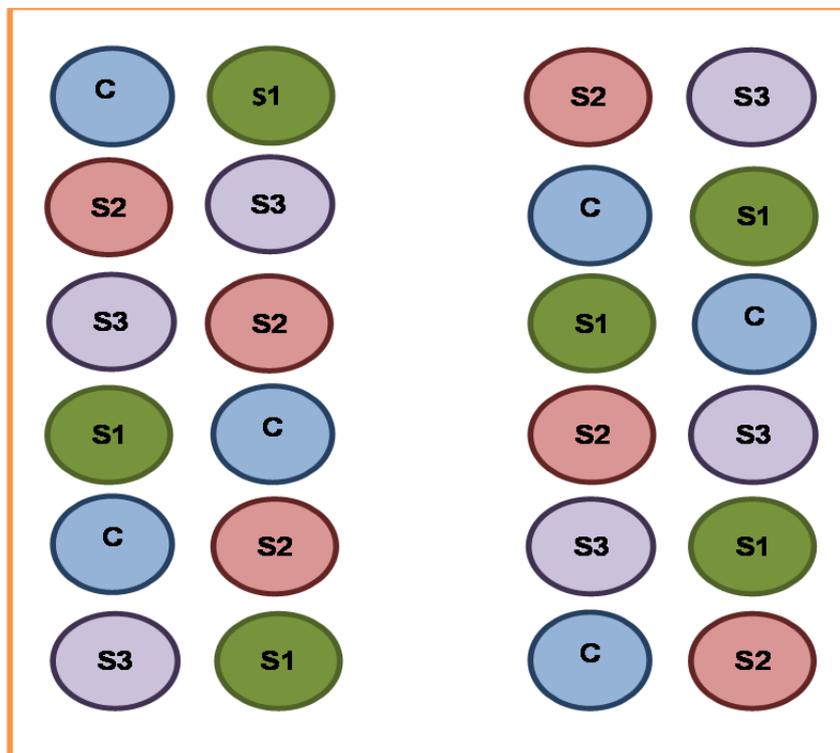


Figura 3.1. Distribución de los tratamientos en el invernadero. Cada número representa un tratamiento. C: [NaCl]=10 mM, S1: [NaCl]=30 mM, S2: [NaCl]=60 mM, S3: [NaCl]=90 mM a 25°C.

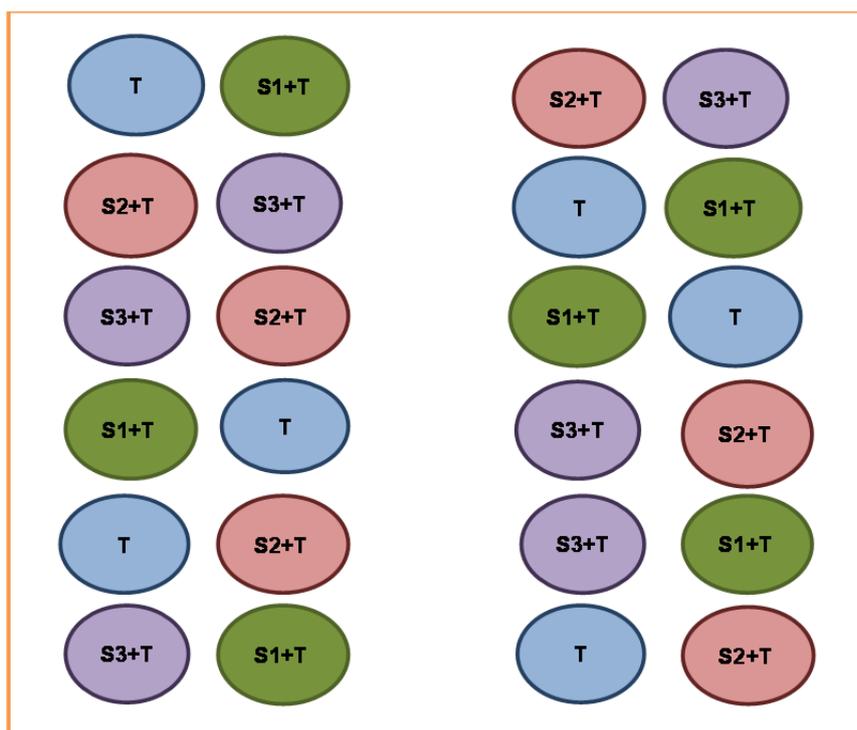


Figura 3.2. Distribución de los tratamientos en el invernadero. Cada número representa un tratamiento. T: [NaCl]=10 mM, S1+T: [NaCl]=30 mM, S2+T: [NaCl]=60 mM, S3+T: [NaCl]=90 mM a 35°C.

Recolección de frutos

Cuando los frutos comenzaron a madurar, éstos fueron recolectados progresivamente y, con el fin de determinar el rendimiento total y comercial, todos los frutos fueron pesados individualmente y clasificados por categorías comerciales (Tabla 3.4), según su peso, longitud, diámetro e incidencia de podredumbre apical. Las plantas se dejaron crecer hasta el doceavo racimo, y fue entonces cuando se decapitaron.

Tabla 3.4. Criterios de distribución por categorías de los frutos de tomate

| Categoría comercial | Criterio |
|---------------------|----------------------------------------------|
| Extra | >330 g |
| Primera | Entre 330 y 150 g |
| Segunda | Entre 150 y 70 g |
| No comercial | <70 g y con podredumbre apical, rajados, etc |

Para analizar la calidad de los frutos, se cosecharon un fruto del racimo dos y tres de cada planta. Así se analizaron doce tomates representativos por tratamiento. Al tratarse de una variedad de tomate pintón, el criterio a seguir para la recolección del fruto fue cuando estaba virando de naranja a rojo (Fotografía 3.3).



Fotografía 3.3. *Detalle del criterio del color para análisis de la calidad.*

Al fruto entero se le midieron parámetros de calidad físicos. Posteriormente se partió y la mitad del fruto se licuó con una licuadora y se midieron los parámetros químicos de calidad. También se guardó parte del zumo a -80°C para analizar fenoles totales y azúcares. La otra mitad se metió en la estufa a 70°C para obtener el contenido en agua y posteriormente se molió y analizó el contenido mineral.

Cuando los frutos del último racimo estaban madurando, se realizó el muestreo de las plantas. Éstas se separaron en hojas, tallos, raíz y frutos. Éstos fueron pesados en fresco y posteriormente se guardó una muestra representativa de cada órgano en una estufa a 70°C para la determinación del peso seco y del análisis mineral.

También se determinaron los diferentes parámetros de intercambio gaseoso. Éstos fueron cuantificados a dos tiempos de desarrollo diferentes para una misma planta. La primera determinación se hizo en el mes de marzo, después del trasplante a hidropónico y justo antes de la aplicación de los tratamientos de salinidad y altas

temperaturas. Y la segunda determinación se realizó en el mes de junio, coincidiendo con el periodo intermedio de recolección de frutos.

Parámetros climáticos durante el experimento

A continuación, en las figuras 3.3 y 3.4 se muestran las gráficas de temperatura (T) y humedad relativa (HR) respectivamente. Se han representado los valores medios de T y de HR por hora de cada módulo del invernadero donde se ejecutó el experimento (uno con temperaturas máximas de 25°C y el otro de 35°C), así como los valores medios exteriores en los meses de desarrollo del cultivo (marzo-julio).

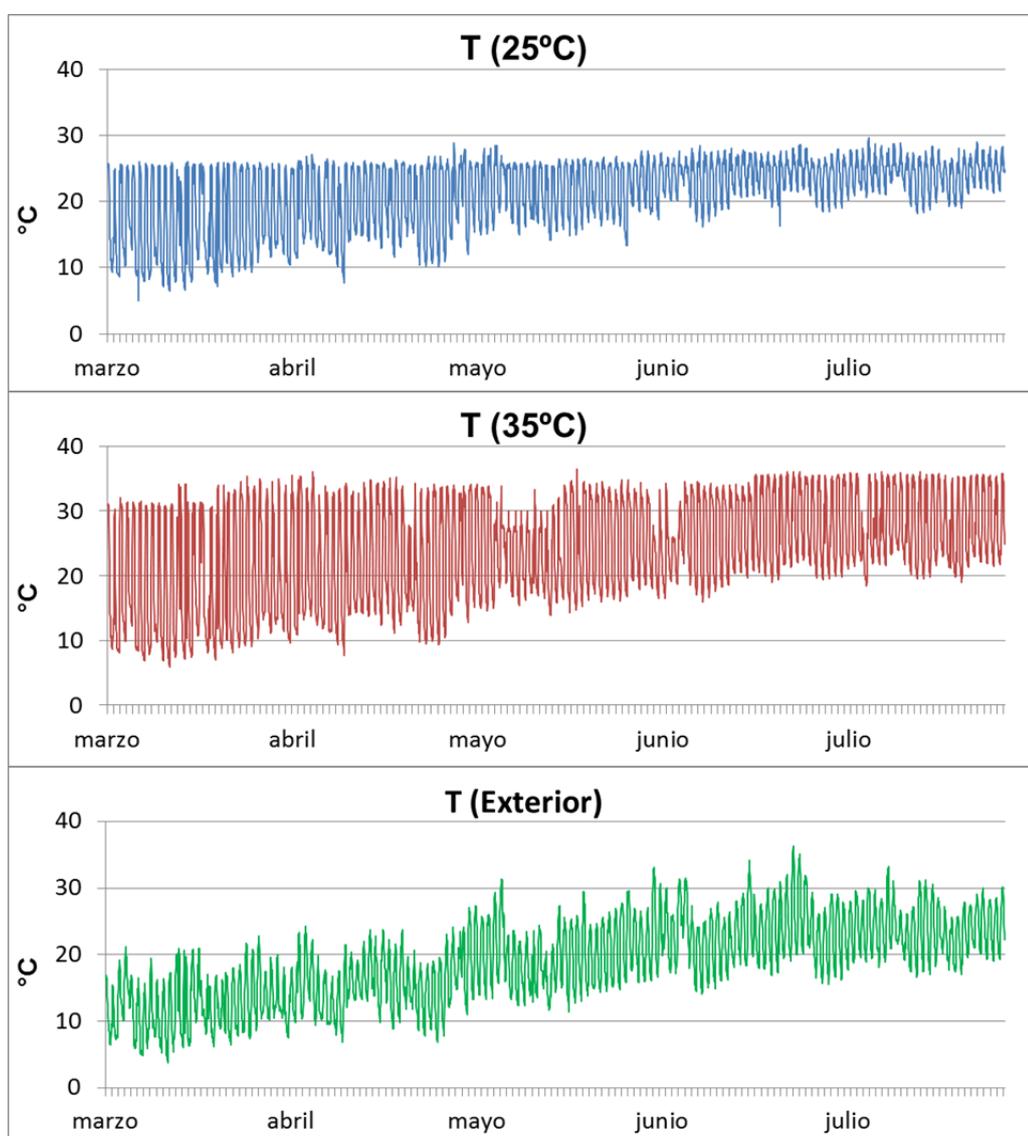


Figura 3.3. Valores medios de Temperatura por hora de los meses de marzo a julio exteriores, del módulo a 25°C y del módulo a 35°C durante el experimento.

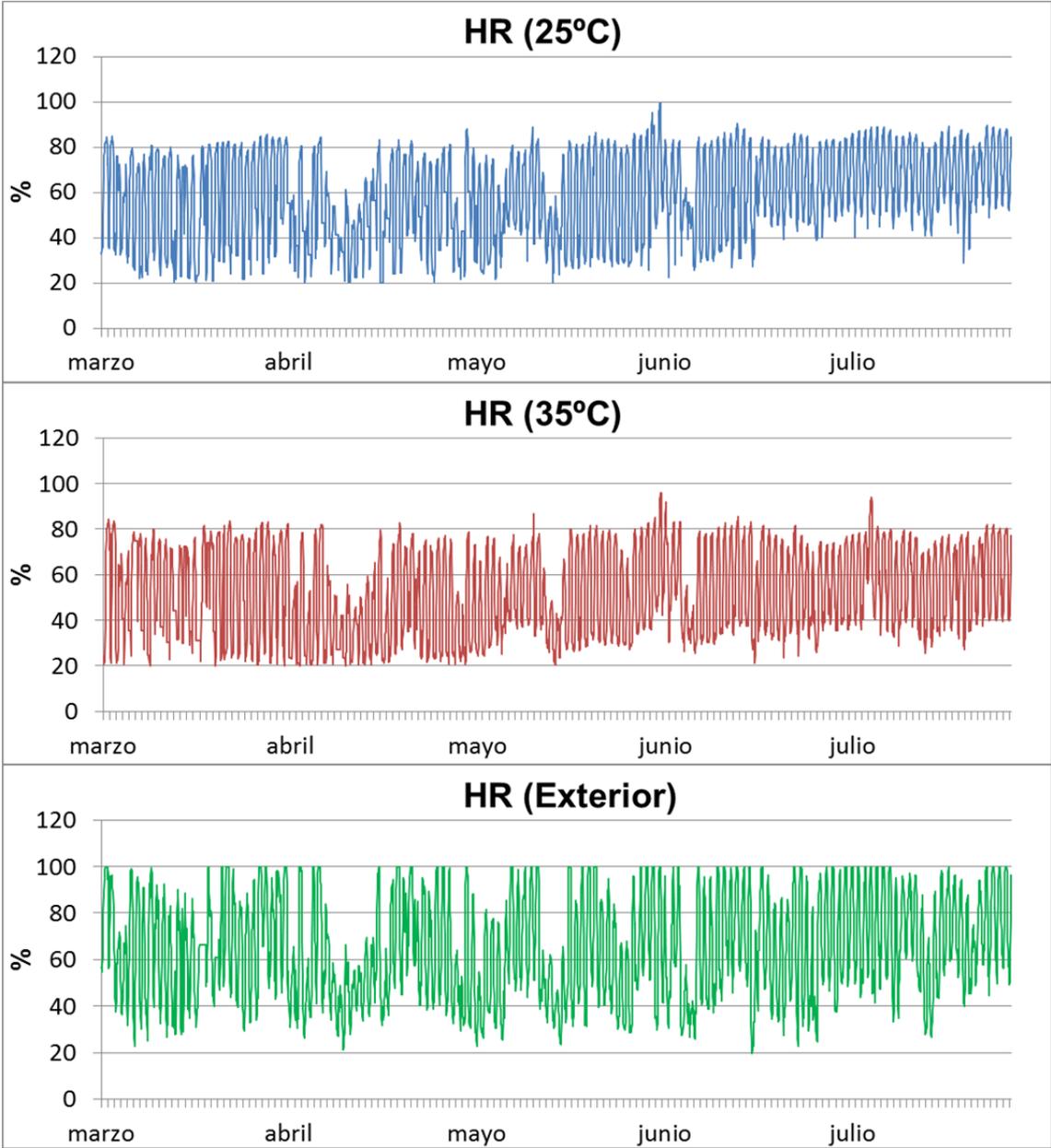


Figura 3.4. Valores medios de humedad relativa por hora de los meses de marzo a julio exteriores, del módulo a 25°C y del módulo a 35°C durante el experimento.

3.3. Experimentos en cámara de cultivo

Los experimentos 1b y 2 se realizaron con las variedades de tomate Óptima y Micro-Tom respectivamente y ambos se llevaron a cabo en cámara de cultivo. Las semillas de ambas variedades fueron prehidratadas en agua desionizada, con aireación y en oscuridad durante 48 horas y germinadas en bandejas con 3-4 cm de altura de vermiculita y humedecidas con solución 0,5 mM de CaSO_4 (Fotografía 3.4). La germinación se llevó a cabo en una cámara de germinación en oscuridad con una temperatura controlada de 28°C. Las semillas se taparon con film transparente para evitar pérdida de humedad excesiva. Las semillas tardaron en germinar entre 3 y 4 días.



Fotografía 3.4. Imágenes sobre el proceso de prehidratación (izquierda) y germinación (derecha).

Cuando las plántulas tenían un tamaño entre 3-4 cm de altura fueron transferidas a contenedores llenos con 17 litros de solución nutritiva Hoagland modificada, preparada siempre con agua desionizada, y aireación permanente (Figura 3.5). La composición de la solución nutritiva se indica en la Tabla 3.1. Ésta fue renovada semanalmente y el pH de las soluciones se mantuvo entre 5,5 y 6,0.

El experimento se desarrolló en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas. Se programó un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. La temperatura y la humedad relativa fueron de 25°C y 65 % durante el día y 22°C y 80 % durante la noche respectivamente. Como sistema de iluminación se empleó una combinación de tubos fluorescentes (Philips TLD 36/W 83, Silvana F 36WGRO) junto

con lámparas de vapor de sodio (Osram HQI. T 400 W), consiguiendo una densidad homogénea de flujo de fotones de $600 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Fotografía 3.5).

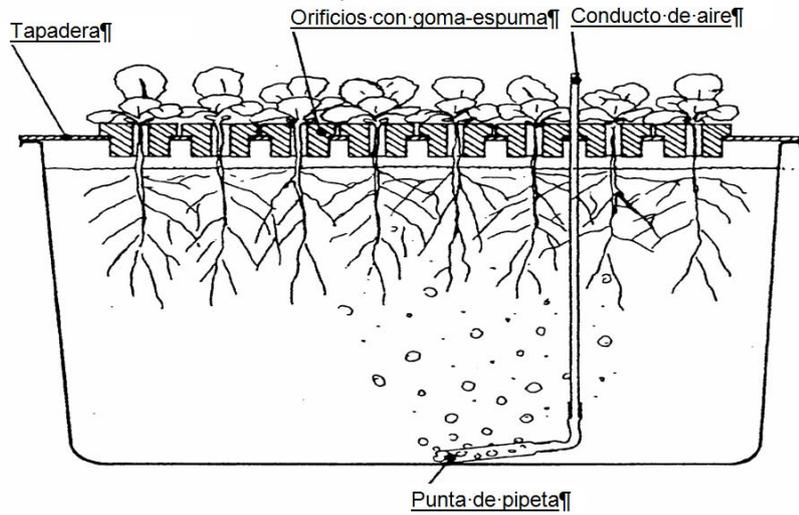


Figura 3.5. Esquema del sistema de cultivo empleado



Fotografía 3.5. Cámara de cultivo en condiciones ambientales control.

3.3.1. Experimento 1 b. Respuesta primaria de la planta de tomate a la combinación de salinidad y altas temperaturas. Aspectos fisiológicos, bioquímicos y moleculares

Las semillas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Óptima) fueron germinadas como ya se ha explicado anteriormente. Se trasplantaron 78 plantas a contenedores de 17 L en sistema de crecimiento hidropónico con solución nutritiva Hoagland modificada (Tabla 3.1), en la misma cámara de cultivo y con las mismas condiciones ambientales y controladas descritas anteriormente. Al cabo de 30 días de crecimiento con estas condiciones, se muestrearon y etiquetaron 6 plantas como “tiempo 0 h”. Al mismo tiempo, la mitad de las plantas (36) se trasladaron a otra cámara de cultivo cuya temperatura era de 35°C. Se eligió la temperatura de 35°C como “tratamiento por altas temperaturas” ya que era una temperatura subletal pero que inducía numerosos cambios fisiológicos, metabólicos y moleculares en las plantas de tomate (Rivero y col., 2002; Rivero y col., 2003; Rivero y col., 2004). Simultáneamente, la mitad de las plantas de cada cámara de cultivo (18 plantas) recibieron 120 mM de NaCl.

El diseño experimental consistió en la combinación de 2 tratamientos de temperatura con dos tratamientos de salinidad, obteniendo 4 tratamientos, distribuidos al azar (Tabla 3.5). Se hicieron 6 repeticiones por tratamiento y por cosecha. El experimento se repitió 2 veces.

Tabla 3.5. *Tratamientos de temperatura y salinidad*

| Salinidad (mM NaCl) | Temperatura | |
|---------------------|-----------------|--------------------------------------------|
| | 25°C | 35°C |
| 0 | Control | Altas temperaturas (T) |
| 120 | Salinidad (Sal) | Salinidad con Altas temperaturas (Sal + T) |

Se cosecharon 6 plantas de cada tratamiento después de las primeras 24h, otras 6 a las 48 h y otras 6 pasadas 72h. Todas las plantas se separaron en raíces, tallos y hojas y fueron pesados en fresco (PF). La mitad de las plantas (3 plantas) se

mantuvieron durante 72 h en una estufa a 70°C para su secado y pesada en seco (PS). Una vez seca se molió, se tamizó y se guardó para posteriores determinaciones. La otra mitad (3 plantas) se guardaron a -80°C para análisis posteriores (Figura 3.6).

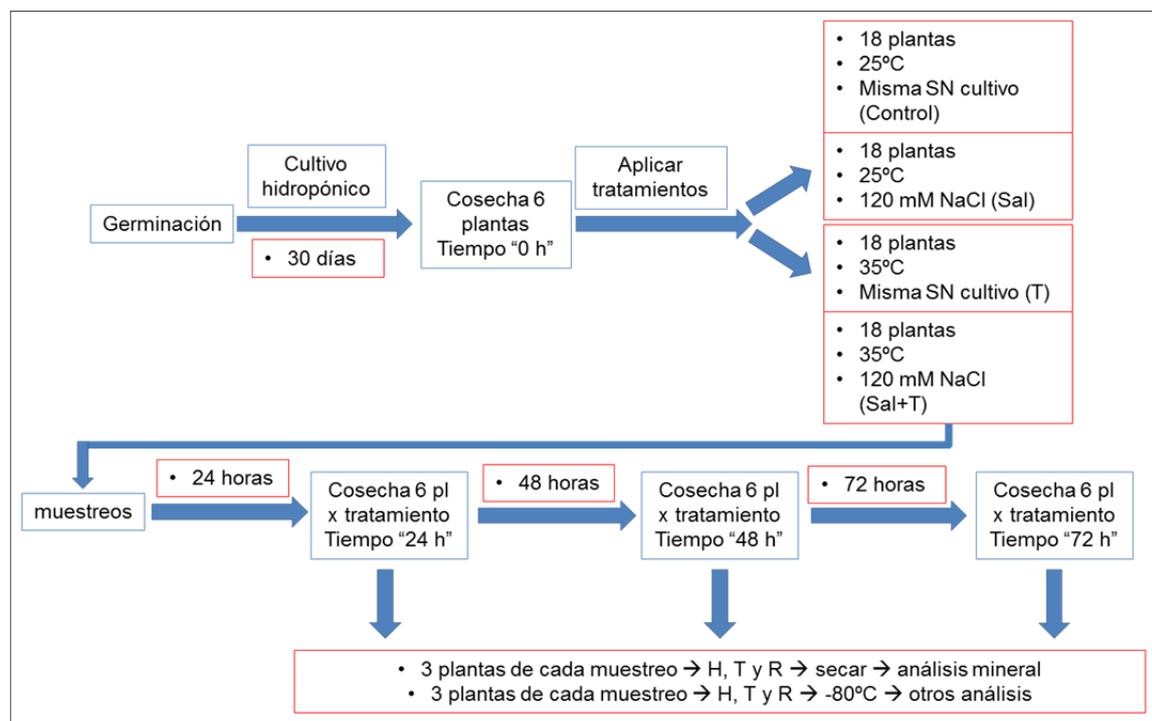


Figura 3.6. Esquema del experimento, detallando la aplicación de los tratamientos y los muestreos realizados.

En este experimento también se realizaron medidas de intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas. Estas medidas se realizaron a las 0h, 24h, 48h y 72h siempre de las mismas tres plantas de cada tratamiento y en el mismo número de hoja. Justo antes de cada muestreo se determinó potencial hídrico (Ψ_w) y potencial osmótico (Ψ_π), calculándose de estos resultados el potencial de turgor (Ψ_p). Todas las medidas de relaciones hídricas se realizaron en la misma hoja, una hoja totalmente expandida situada en la región media de la planta. Para la medida del contenido relativo de agua (CRA) se recolectaron hojas adyacentes a las empleadas para el potencial hídrico.

En el material vegetal seco se determinó la concentración de Na^+ y K^+ . Y en las muestras guardadas en el congelador a -80°C se realizaron los siguientes análisis:

- Determinación de la concentración de los principales osmoprotectores
- Actividades de las enzimas relacionadas con la síntesis y degradación de los osmoprotectores determinados.
- Expresión génica con PCR cuantitativa
- Cuantificación de proteínas
- Cuantificación de H_2O_2
- Peroxidación lipídica
- Oxidación proteica y actividad proteolítica

3.3.2. Experimento 2. Mecanismos responsables de la aparición de la podredumbre apical o blossom-end rot (BER) en frutos de tomate en plantas sometidas a deficiencia de calcio

Plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de la variedad Micro-Tom se cultivaron hasta el momento del cuaje de los primeros frutos, con solución nutritiva Hoagland modificada (Tabla 3.1), en cultivo hidropónico con aireación. A partir de ese momento, se aplicaron tres tratamientos de Ca^{2+} , 1mM como concentración óptima, y dos tratamientos por debajo del óptimo (0.5 y 0.1 mM), con el objetivo de inducir BER en los frutos.

Cada tratamiento se aplicó a 5 contenedores, en los cuales había 3 plantas por contenedor, así que cada tratamiento contaba con 15 plantas de microtomate distribuidas al azar en la cámara de cultivo, y cuyas condiciones ambientales ya se han descrito anteriormente.

Las flores que iban cuajando se marcaban con un marcador de diferente color para diferenciar su futuro muestreo, a los 10, 15 y 20 días después del cuaje (Figura 3.7), con el objeto de detectar los posibles cambios en el metabolismo oxidativo de estos frutos y su relación con la incidencia de BER (Fotografía 3.6).

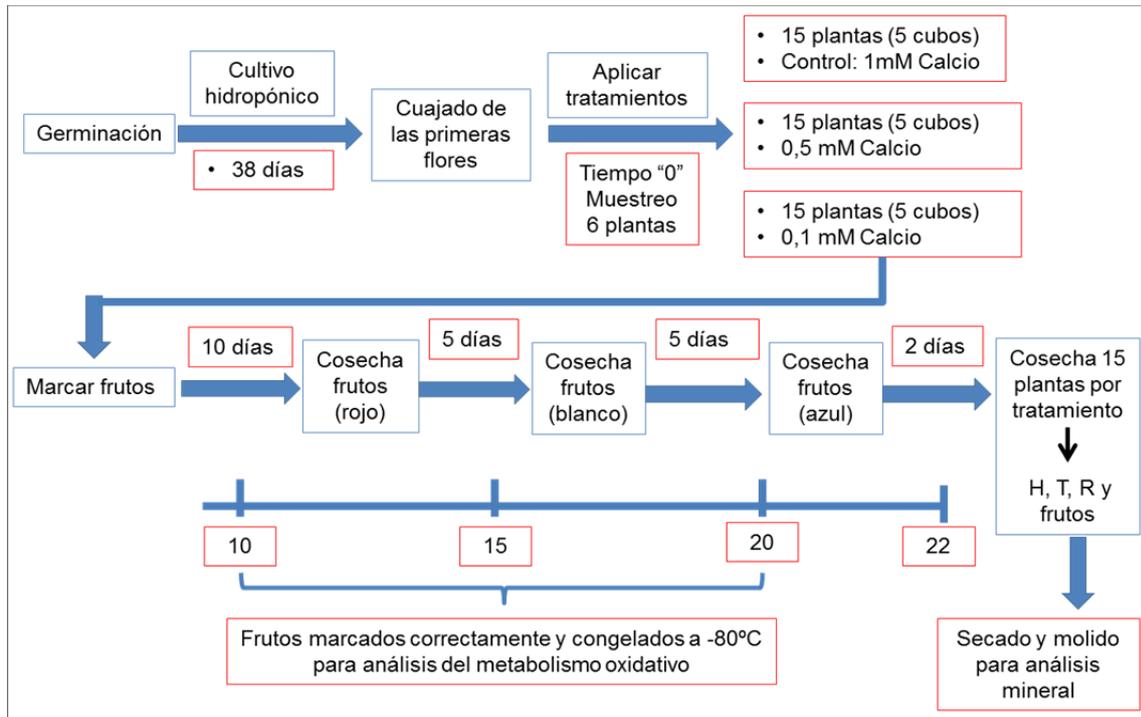


Figura 3.7. Diseño experimental empleado para profundizar en los mecanismos de respuesta relacionados con la calidad de tomate y con la aparición de BER.



Fotografía 3.6. Plantas de microtomate con los distintos tratamientos y con los frutos marcados.

Justo antes de aplicar los tratamientos se realizó un muestreo de 6 plantas. Al final del experimento se llevó cabo otro muestreo de 15 plantas por tratamiento, (después de recoger los frutos que tenían 20 días después del cuaje), las cuales fueron separadas en hojas, tallos, raíces y frutos (si tenían), pesándolos en fresco (PF) y guardando posteriormente el material vegetal en una estufa a 70°C para la determinación de su peso seco (PS) y para análisis mineral (concentración de Ca^{2+}).

Los primeros síntomas de BER se detectaron a los 12 días del cuaje (Figura 3.8). La mitad de frutos recolectados se almacenaron previa congelación a -80°C para las posteriores determinaciones analíticas. La otra mitad de estos frutos se secaron en una estufa a 70°C para la determinación de la concentración de Ca^{2+} . Para los frutos afectados con BER, todas las determinaciones y análisis que se describen más adelante se realizaron en la porción de tejido sano adyacente a la zona afectada. Del tratamiento de 0.1 mM de Ca^{2+} , sólo la mitad de los frutos mostraron BER, así que los análisis se realizaron por separado en frutos con BER y sin BER.



Figura 3.8. Detalle de los frutos afectados por la fisiopatía BER (B y C) con respecto al tratamiento Control (A). No hubo diferencias en tamaño ni forma de los frutos control y los afectados con BER (D).

Del material vegetal guardado para secar en la estufa, se realizó análisis de la concentración de Ca^{2+} de hojas, tallos, raíces y frutos, así como la determinación del crecimiento vegetativo en peso seco.

De los frutos guardados en el congelador a -80°C se realizaron los siguientes análisis:

- Análisis de la concentración de H_2O_2 y peroxidación lipídica
- Análisis de las actividades enzimáticas de CAT (catalasa), SOD (superóxido dismutasa) y de enzimas antioxidantes del ciclo ascorbato-glutatión (APX, DHAR, MDHAR, GR y NADPH oxidasa)
- Determinación de la concentración de ascorbato y glutatión

3.4. Técnicas analíticas utilizadas

3.4.1. Rendimiento de los frutos

Los frutos de tomate desarrollados en los experimentos de invernadero fueron cosechados cuando alcanzaban el color deseado. El rendimiento fue determinado para cada planta mediante el conteo y el pesado de todos los frutos. Cada fruto fue clasificado por categorías comerciales dependiendo de la forma, peso y el grado de podredumbre apical del fruto (Tabla 3.4).

3.4.2. Determinación del peso fresco y peso seco de las plantas

Durante los muestreos de material vegetal, la planta se separó en hojas, tallos, raíces y frutos (si tenían), y se pesaron en peso fresco (PF) con una balanza de precisión Sartorius (Acculab). A continuación se introdujeron en una estufa a 70°C y una vez habían perdido todo el contenido en agua, se pesaron en peso seco (PS) y se molieron en un molinillo de aspas. Posteriormente se tamizaron a través de un tamiz con tamaño de poro de 0.5 mm. Las muestras se almacenaron en envases de plástico guardados en desecadores con el fin de impedir la rehidratación de las mismas.

3.4.3. Análisis del contenido mineral en material vegetal

Análisis de la concentración de Ca^{2+} , Na^+ , K^+ y Mg^{2+}

Para analizar la concentración de cationes, se realizaron digestiones de 100 mg de material vegetal previamente seco (raíces, tallos, hojas y frutos) con $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ (5:3 en v:v) utilizando un programa en un microondas (CEM Mars X, Buckinghamshire, UK) en etapas, en el que se alcanzaban 200°C en 20 minutos y se mantenía esa temperatura durante 2 horas. El residuo se dejaba enfriar hasta temperatura ambiente y se aforaba a 25 mL, almacenándose en botellas de plástico hasta su posterior análisis. Se determinaron las concentraciones de Ca^{2+} , Na^+ , y K^+ por espectrometría de absorción atómica (Perkyn-Elmer 5500, Waltham, MA, USA). Cuando se necesitaba un análisis mineral más completo (concentración de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , B, Fe, Cu, Mn y Zn), las muestras eran analizadas por el servicio de ionómica del CEBAS-CSIC donde se determinaban mediante el uso de un ICP (Iris Intrepid II, Thermo Electrón Corporation, Franklin, USA).

Determinación de la concentración de Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- y H_2PO_4^- .

Para la determinación de estos aniones se siguió el método utilizado por (Abbas y col., 1991). Se pesaron 50 mg de material vegetal seco, a los que se le añadieron 10 mL de agua desionizada y se mantuvieron en agitación mecánica durante 30 min. A continuación la muestra se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min y se filtró.

El extracto obtenido se utilizó para la determinación mediante cromatografía iónica. Se utilizó un cromatógrafo Dionex modelo DX-100 con una precolumna Ionpac AG12A, 4x50 mm, una columna separadora de aniones Ionpac AS12A, 4x250 mm, una supresora electroquímica (ASRS-I) y un detector de conductividad eléctrica. La fase móvil utilizada fue una disolución 0.3 mM de NaHCO_3 y 2.7 mM de Na_2CO_3 . La recogida y el procesado de los datos se realizaron mediante el programa informático Chromeleon, que calcula la concentración de aniones de la muestra por comparación de las áreas con las de una muestra patrón.

3.4.4. Absorción y transporte de nutrientes en la planta

La velocidad de absorción específica fue calculada como la velocidad de acumulación de un nutriente en particular en la planta, por unidad de peso fresco de

raíz y por unidad de tiempo. Además se determinó la velocidad de transporte del catión hacia la parte aérea, calculada como la velocidad de acumulación del nutriente en la parte aérea de la planta, por unidad de peso fresco de raíz y por unidad de tiempo. Por ejemplo, la velocidad de absorción y de transporte a las 24h se calculó con las siguientes ecuaciones (Ecuación de Pitman, 1972):

$$V_{\text{absorción}} = \frac{(M_{24h} - M_{0h})}{(24 - 0)} \times \frac{(\ln PF_{\text{raíz } 24h} - \ln PF_{\text{raíz } 0h})}{(PF_{\text{raíz } 24h} - PF_{\text{raíz } 0h})}$$

Donde M_{0h} y M_{24h} son los contenidos en toda la planta del catión en dos cosechas, “0h” sería la cosecha inicial y “24 h” la segunda cosecha a las 24 horas. $PF_{\text{raíz } 0h}$ y $PF_{\text{raíz } 24h}$ es el peso fresco de la raíz en cada cosecha. La velocidad de absorción se dio en $\mu\text{mol catión} \cdot PF_{\text{raíz}}^{-1} \cdot h^{-1}$.

$$V_{\text{Transporte}} = \frac{(PA_{24h} - PA_{0h})}{(24 - 0)} \times \frac{(\ln PF_{\text{raíz } 24h} - \ln PF_{\text{raíz } 0h})}{(PF_{\text{raíz } 24h} - PF_{\text{raíz } 0h})}$$

Donde PA_{0h} y PA_{24h} son los contenidos en la parte aérea de la planta del catión en dos cosechas, “0h” sería la cosecha inicial y “24 h” la segunda cosecha a las 24 horas. $PF_{\text{raíz } 0h}$ y $PF_{\text{raíz } 24h}$ es el peso fresco de la raíz en cada cosecha. La velocidad de transporte se dio en $\mu\text{mol catión} \cdot PF_{\text{raíz}}^{-1} \cdot h^{-1}$.

3.4.5. 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.

Determinación del potencial hídrico de las plantas

Se midió el potencial hídrico de la hoja al alba (Ψ_w) 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 éstas fueron transformados a MPa mediante la fórmula $MPa = -0.00689 \times \text{psi}$.

Inmediatamente después de esta medida se envolvieron las hojas en papel de aluminio, se congelaron sumergiéndolas en nitrógeno líquido y después se guardaron en bolsas de plástico a -18°C para la posterior determinación de su potencial osmótico (Ψ_{π}).

Cálculo del potencial osmótico en hoja

Para medir el potencial osmótico, se descongelaron las hojas a temperatura ambiente y se les extrajo la savia por centrifugación durante 3 minutos a 2500 rpm a 24°C en microtubos perforados. El potencial osmótico (Ψ_{π}) se determinó midiendo la osmolalidad (mOsm/Kg) en alícuotas de $100 \mu\text{L}$ con un osmómetro (Digital Osmometer, Roebling, Berlín). Este se expresó en MPa mediante la siguiente conversión:

$$\Psi_{\pi} = -\text{lectura} \times 0.0024$$

Cálculo del potencial de turgor en hoja

El potencial de turgor (Ψ_p) se calculó como la diferencia entre el potencial osmótico (Ψ_{π}) y el hídrico (Ψ_w),

$$\Psi_p = \Psi_w - \Psi_{\pi}$$

Determinación del contenido relativo de agua (CRA)

Para la determinación del CRA se recolectaron hojas adyacentes a las empleadas para el potencial hídrico y se cortaron en forma de disco, se pesaron estos discos en fresco (Mf) y se sumergieron en agua desionizada durante toda la noche y en oscuridad para obtener discos totalmente hidratados. Estos discos hidratados (Mt)

se volvieron a pesar y se colocaron en una estufa a 80°C durante 24h para obtener el peso seco (M_d). El CRA se calculó con la fórmula descrita por Morgan (1984).

$$CRA = \frac{(M_f - M_d)}{(M_t - M_d)} \times 100$$

3.4.6. Intercambio gaseoso y parámetros de fluorescencia de clorofilas

Las medidas de las tasas de transpiración y de asimilación de CO_2 se realizaron con un sistema de fotosíntesis portátil (CIRAS-2 PP-System). Las hojas se equilibraron primero con un flujo de densidad de fotones de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ unos 20 minutos. Después de esto, se indujo la fotosíntesis en la hoja con $1000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y con una concentración de CO_2 en la cámara foliar de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La temperatura de la hoja se mantuvo a 25°C, y el déficit de presión de vapor de la hoja se mantuvo entre 1 y 1.3 kPa. Estas condiciones se mantuvieron constantes para la determinación de la tasa de asimilación de CO_2 y la tasa de transpiración en todos los tratamientos.

Las medidas de fluorescencia de clorofilas se realizaron en hojas totalmente expandidas y adyacentes a las usadas para la determinación de los parámetros de intercambio gaseoso. Se usaron tres plantas de cada tratamiento y las medidas se llevaron a cabo con un fluorímetro portátil (FMS-2, Hansatech). La eficiencia fotoquímica máxima del PSII se obtuvo con el índice F_v/F_m (máxima eficiencia cuántica de los centros de reacción del PSII) calculado a partir de F_o (fluorescencia mínima de hojas adaptadas a la oscuridad) y F_m (valor máximo de fluorescencia en hojas adaptadas a la oscuridad), siendo F_v la componente variable de la fluorescencia (obtenida al restarle al valor fluorescencia máxima el valor de fluorescencia inicial ($F_m - F_o$)). La eficiencia de las antenas en los centros de reacción del PSII (F_v'/F_m') se calculó midiendo los parámetros F_o' (fluorescencia mínima en hojas adaptadas a luz después de un pulso de luz roja) y F_m' (máxima fluorescencia en hojas adaptadas a la luz después de aplicar un pulso saturante de luz actínica) con radiación natural ($(F_m' - F_o')/F_m'$). La eficiencia fotoquímica de PSII de hojas adaptadas a luz (ϕPSII o $\Delta F/F_m'$)

se calculó con la fórmula $F'_m - F_s / F'_m = \Delta F / F'_m$ (Genty y col., 1989), siendo F_s (fluorescencia estable a cualquier nivel de luz).

Para medir los parámetros F_o , F_m , F_v , F_s , F'_o y F'_m se realizó la cinética de fluorescencia de clorofilas tal como se muestra en la figura 3.9. Primero las hojas fueron adaptadas a la oscuridad durante 30 minutos, entonces se iluminaron con luz de baja intensidad fotosintética ($PAR \leq 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para medir F_o . A esta medida le siguió un pulso de saturación de luz de $12000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 0.8 segundos para medir F_m . Entonces las hojas se iluminaron con luz actínica de $1500 \mu\text{mol m}^{-2}$ durante 100 segundos para medir F_s y transcurrido este tiempo se volvió a aplicar un pulso de saturación de luz como el anterior para medir F'_m . Después se apagaba la luz actínica e inmediatamente se aplicó un pulso de saturación de luz roja de 735 nm de intensidad $12000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 0.8 segundos para medir F'_o .

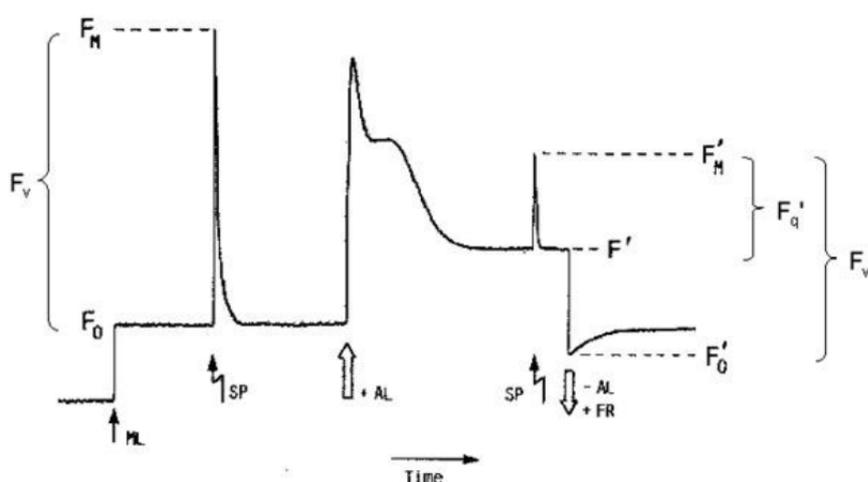


Figura 3.9. Secuencia de pulsos de luz seguida en las medidas de fluorescencia de clorofilas.

3.4.7. Determinación de los parámetros de calidad en frutos de tomate

Parámetros físicos de calidad

Tamaño y forma

Se midió el diámetro ecuatorial (D) y el longitudinal (L) de cada fruto, con un calibrador Digimatic digital de Mitutoyo CD-15D, con una precisión de 0.01 mm.

Firmeza

La firmeza del fruto se midió con un Texturómetro (TA XT plus Texture Analyzer), dando la fuerza en Newtons (N) necesaria para deformar el fruto un 5%.

Color

El color de los frutos se determinó con un colorímetro (Minolta CR300), y se expresaron como valores de Hunter L^* , a^* y b^* . La claridad era indicada por L^* , mientras que la cromaticidad (tono y croma) era indicada por a^* y b^* conjuntamente. El valor de a^* representa el eje que va desde colores verdes ($-a^*$) hasta colores rojos ($+a^*$) y b^* representa el eje que evoluciona desde azul ($-b^*$) hasta colores amarillos ($+b^*$). Cada color viene dado por tres valores de estas coordenadas que representan un punto en el espacio tridimensional (Figura. 3.10).

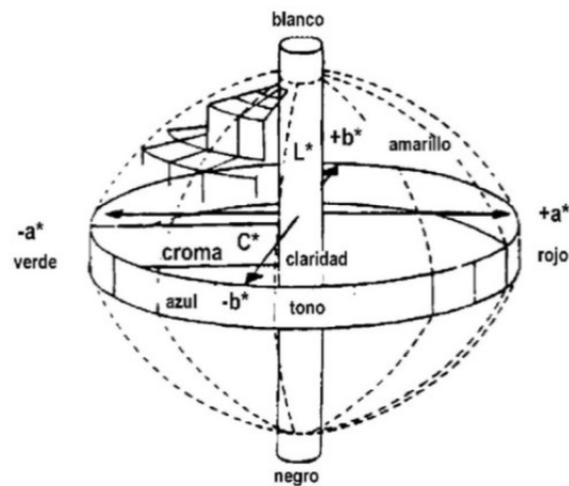


Figura 3.10. Representación gráfica de L^* claridad), a^* (tono) y b^* croma).

Para determinar el color de la piel del fruto se realizaron tres medidas en tres puntos equidistantes de la zona ecuatorial de los frutos enteros, obteniendo la media de los tres valores de L^* , a^* y b^* para cada fruto.

Determinaciones de los parámetros químicos

Para conseguir el licuado de tomate se utilizó una licuadora casera Moulinex. El zumo se filtró para evitar la presencia de sólidos en suspensión. En el zumo se midieron los siguientes parámetros:

pH y CE

El pHmetro-conductímetro utilizado para la medida fue un WTW pH/Cond 340i provisto de electrodo de conductividad, electrodo de pH y termómetro para compensación de temperatura.

Sólidos solubles totales (SST)

Los sólidos solubles totales se determinaron por el índice de refracción expresado en °Brix con un refractómetro (Digital refractometer, DRB 0-45 nD). La medida se realizó depositando una gota de zumo sobre el refractómetro (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 0.1N. A un vaso de vidrio se le añadió 3mL de zumo filtrado y 100 mL de agua desionizada. El electrodo del pHmetro se introdujo en el vaso y se adicionó NaOH 0,1N hasta alcanzar un pH de 8.1 (AOAC, 1984). La acidez se calculó mediante la fórmula:

$$Acidez = \frac{V_{NaOH} \times 195 \times 0.1}{3 \times V_{zumo}}$$

Donde V_{NaOH} es el volumen en mL de NaOH 0.1N empleados en la valoración y V_{zumo} es el volumen de zumo usado para la medición.

Determinación del contenido en fenoles totales

Se utilizó el método Folin-Ciocalteu adaptado a microescala (Waterman y Mole, 1994) y midiendo la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro microplaca Biotek PowerWave XS2 (Biotek Instruments, Inc.). Se mezcló 1 mL de zumo de tomate con 9 mL de metanol al 80%, se agitó la mezcla durante 30 minutos y después se centrifugó a 4200 rpm 15 minutos. A 500 µL del sobrenadante se le añadió 2.5 mL del reactivo Folling 10% y 2 mL de carbonato sódico (75 g/L). Después de dejar la mezcla 5 minutos en un baño a 50°C se determinó la absorbancia a 760 nm. La determinación se llevó a cabo por interpolación de los valores obtenidos con una curva patrón de 0, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 mg/L de ácido gálico. Los resultados se expresaron en miligramos de ácido gálico por litro de zumo.

Contenido en azúcares solubles en agua

Para la cuantificación de glucosa y fructosa, se tomó un volumen de 1 mL de muestra de zumo filtrado y se centrifugó a 9500 rpm durante 15 minutos en una centrifuga modelo 3K15. El sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de membrana tipo Whatman de 0,45 µm de poro. Los extractos acuosos fueron analizados mediante HPLC (Hewlett Packard serie 1100), el cual pinchaba un volumen exacto de 10 µL de muestra mediante un inyector mecanizado. La columna utilizada (Supelcogel C-610H HPLC) estaba conectada en serie a una precolumna (Supelcogel™ carbohydrate columns) y a una fase estacionaria de poliestireno-divinilbenceno sulfonado. La separación isocrática de los azúcares se realizó a una temperatura de 30°C, usando una fase móvil compuesta por 0.1 % de ácido fosfórico y 99.9% de agua ultrapura, previamente filtrada a través de un filtro de membrana de 0,45 µm y degasificada. Se empleó una velocidad de flujo de 0,5 mL/min y un detector de Índice de Refracción (RID). La cuantificación se realizó mediante comparación de áreas con respecto a una recta patrón (1, 2.5, 5 y 10 mg/mL) de glucosa y de fructosa.

3.4.8. Determinación de la concentración de osmoprotectores

Todas las medidas de absorbancia se realizaron con un espectrofotómetro microplaca Biotek PowerWave XS2 (Biotek Instruments, Inc.).

Prolina

El contenido de prolina se midió de acuerdo con el método propuesto por Irigoyen y col. (1992). Para ello, se homogeneizaron 0.2 g de hoja previamente congelada en un mortero con 5 mL de etanol 96%, seguido de un lavado con 10 mL de etanol 70%. Después se centrifugaron las muestras (10 min a 13000 g), y 2 mL del sobrenadante fueron incubados con 2.5 mL de ácido acético glacial y 2.5 mL de reactivo de ninhidrina a 100°C durante 45 min. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y a la mezcla se añadieron 5 mL de benceno. Finalmente, la absorbancia de las muestras fue medida a 515 nm.

Glicina betaína y colina

La concentración de Glicina betaína, GB, se determinó siguiendo el método propuesto por Grieve y Grattan (1983). Los extractos de hoja de tomate se prepararon mediante una agitación vigorosa con H₂SO₄ 2N y su posterior enfriamiento tal y como describió Rasheed y col. (2010). Estos extractos se mezclaron con un volumen igual de peryoduro, el cual fue preparado disolviendo el exceso de yodo en una solución de yoduro de potasio. Las muestras se agitaron y se mantuvieron a 4°C durante 16h. La mezcla se centrifugó a 10000 g a 4°C durante 15 minutos, y se descartó el sobrenadante. Se disolvió el precipitado de cristales de peryoduro en 10 mL de 1, 2-dicloroetano, se agitaron, y se dejaron a temperatura ambiente durante 15-20 minutos, y a continuación se midió la absorbancia a 365 nm.

La concentración de colina se determinó con un método descrito por Nie y col. (1993). La extracción se realizó de la misma manera que para la determinación de GB. Aproximadamente 10 µL de extracto se trataron con 0.5 unidades de colina oxidasa, 0.8 unidades de peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*), 118 µg de aminoantipirina y 40 µg de fenol en 200 µL de 50 mM Tris-HCl a pH 7.8 y se mantuvieron durante 30 minutos a 37°C. La concentración de colina se determinó midiendo la absorbancia de las muestras a 500nm. Tanto para la concentración de GB como de colina se realizó una corrección de la absorbancia por la posible actuación de enzimas endógenas a los 10 segundos de determinarse la primera medida.

Glucosa, sacarosa, fructosa y almidón

La concentración de azúcares solubles se obtuvo siguiendo el método propuesto por Blunden y col. (1985). A 0.5 g de hojas secas y pulverizadas se le añadió 5 mL de metanol en agua (62.5% v/v) y se dejaron toda la noche con agitación a temperatura ambiente usando un agitador orbital Luckham R100/TW. Posteriormente se añadió 5 mL de ácido perclórico (6% v/v HClO₄:H₂O) para precipitar las proteínas que pudieran interferir en los análisis. Las suspensiones resultantes se agitaron bien y se centrifugaron durante 10 minutos a 5000 g. El sobrenadante fue utilizado inmediatamente para el análisis de azúcares tal y como describieron Blunden y Wilson (1985). La concentración de almidón se determinó siguiendo el procedimiento enzimático de Rasmussen y Henry (1990). De esta manera, 200 µL de extracto fueron mezclados con 2.5 mL de tampón Tris-HCl 0.1 M pH 8.6 que contenía 1 mg/mL de MgCl₂. A este buffer se le añadió además 10 mg/mL de ATP, NAD y NADP. Posteriormente, a la mezcla se le añadió 20 µL de hexokinasa (280 U/mL disuelta en 3.2 M de (NH₄)₂SO₄) y se midió la absorbancia a 340 nm, llamando a esta determinación A₁. Posteriormente se adicionó a la mezcla 20 µL de glucosa-6-fostato deshidrogenasa (140 U/mL disuelta en 3.2 M de (NH₄)₂SO₄), se incubó la mezcla durante 15 min y se midió la absorbancia a 340 nm, llamando a esta determinación A₂. A continuación se adicionó 20µL de fosfoglucoasa isomerasa (700 U/mL disueltas en 3.2 M de (NH₄)₂SO₄), se incubó la muestra durante 15 min a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 340 nm, llamando a esta absorbancia A₃. A continuación se adicionaron 20 µL de fosfomanosa isomerasa (3000 U/mL disueltas en 3.2 M de (NH₄)₂SO₄), se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 40 min y se determinó la absorbancia a 340 nm, llamándola A₄. Finalmente, se añadieron 100 µL de fructosidasa (15000 U/mL disueltas en agua desionizada), se incubó la mezcla durante 50 min y se leyó la absorbancia a 340 nm, llamándola A₅. Los resultados fueron calculados de la siguiente manera:

- $A_2 - A_1 =$ Cambio en la absorbancia para la glucosa (ΔA_1)
- $A_3 - A_2 =$ Cambio en la absorbancia para la fructosa (ΔA_2)
- $A_5 - A_4 =$ Cambio en la absorbancia para la sacarosa (ΔA_3)

La concentración de azúcares fue calculada en base a una curva patrón de glucosa, fructosa o sacarosa (25-100 µg/mL) que siguió todo el proceso descrito

anteriormente para los extractos vegetales, y usando la ecuación de Lambert-Beer's, asumiendo un coeficiente de extinción para el NAD, NADP de $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. De esta manera la concentración de cada azúcar fue expresada en $\mu\text{mol/mL}$ y calculada:

$$c = \Delta A \times V/E \times d \times v$$

Donde c es la concentración, V es el volumen final del ensayo (2.94 para la glucosa, 2.96 para la fructosa y 3.08 para la sacarosa), d es el grosor de la cubeta del espectrofotómetro (1 cm) y v es el volumen del extracto usado (200 μL).

Concentración de trehalosa

El contenido de trehalosa se determinó con el método diseñado por Schulze y col. (1995). Para ello, se homogeneizaron 0.1 g de hojas congeladas y se les añadió 2 mL de buffer fosfato 20 mM (PBS, pH 5.8). Posteriormente las muestras fueron agitadas en un pulverizador celular supersónico (Ninbo Xin Yi Science Instrument Ltd., Co., Ninbo, Zhejiang) durante 30 minutos. Después de una centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C , se mezcló 200 μL del sobrenadante con 200 μL de H_2SO_4 al 1% y las muestras fueron introducidas en un baño a 90°C durante 10 minutos. Posteriormente las muestras se enfriaron en hielo unos 3 minutos y se les añadió 200 μL de NaOH al 30%. A continuación al sobrenadante se le añadió 3 mL de agente revelador (0.02 g de antrona (Sigma, USA)) y las muestras se volvieron a poner en el baño a 90°C unos 10 minutos. Acto seguido se volvieron a enfriar en hielo durante 3 minutos y se les añadió 10 mL de H_2SO_4 al 80%. Finalmente, se determinó la absorbancia a 630 nm. La concentración se trehalosa se calculó en base a una curva patrón (0.04-0.8 μM trehalosa).

3.4.9. Determinación de actividades enzimáticas

Todas las medidas de absorbancia se han realizado con un espectrofotómetro microplaca Biotek PowerWave XS2 (Biotek Instruments, Inc.).

Cuantificación de proteínas

La concentración de las proteínas solubles contenidas en el extracto vegetal se determinó mediante el método de Bradford (1976) con el fin de expresar las actividades en función de la concentración de las mismas.

Actividades P5CS, P5CR, OAT, PDH, PO

Para la extracción de Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS), Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR), ornitina aminotransferasa (OAT), prolina deshidrogenasa (PDH) y prolina oxidasa (PO) se siguió el método propuesto por Charest y Phan (1990) y se optimizó para nuestras condiciones (Rivero y col., 2004). Una cantidad entre 0.5-1 g de tejido vegetal fresco fue homogeneizado con 5 mL de buffer fosfato potásico 0.1 M pH 7.8. El homogeneizado se filtró y se centrifugó a 10000 rpm durante 20 min. El sobrenadante resultante fue usado para la determinación de las actividades de las enzimas implicadas en la síntesis y degradación de la prolina.

Para la determinación de dichas actividades la mezcla de reacción consistió en 0.1 mL de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.0, 0.1 mL de ácido L-glutámico monohidroxamato 10 mM, 0.1 mL de ATP 10 mM, 0.1 mL de cloruro magnésico 20 mM, 0.1 mL de ácido L-glutámico monosódico 50 mM, 0.25 mL de extracto enzimático. Las muestras se incubaron a 37°C en oscuridad durante 15 min. La reacción se detuvo por adición de 0.5 mL de SOLUCIÓN FINALIZADORA (HCl 2.5 N donde se disuelven 2.5 g de FeCl_3 + 6 g de ácido tricloroacético). En el caso de la actividad P5CR, la cantidad de ácido glutámico fue sustituida por P5C (Sigma-Aldrich) y el ATP fue excluido de la reacción. La mezcla resultante será utilizada para la determinación de las actividades P5CS y P5CR mediante la cuantificación del fósforo inorgánico (Pi) liberado por la actividad de estas enzimas a 630 nm durante 5 minutos (Geladopoulos y col., 1991). Para ello, a 0.25 mL de alícuota (tras la incubación y la adición de solución finalizadora) se le añadieron 1 mL de agua desionizada, 50 μL de reactivo "Verde Malaquita". Transcurridos 2 min se adicionó 50 μL de citrato sódico tribásico. Tras 15 min se procedió a la lectura de la absorbancia de las muestras frente a una curva patrón de fosfato potásico monosódico. Las actividades de ambas enzimas fueron expresadas como $\mu\text{mol Pi (mg prot)}^{-1} (\text{min})^{-1}$.

Para la cuantificación de la actividad OAT se siguió el método propuesto por Charest y Phan (1990), y la mezcla de la reacción fue la siguiente: 2.2 mL de buffer Tris-HCl 0.2 M pH 8.0, 0.2 mL de L-ornitina 46.8 mM, 0.2 mL de 2-oxoglutarato 12.5 mM, 0.2 mL de NADH 0.125 mM. La reacción se inició por adición de 0.2 mL de extracto enzimático y el cambio en absorbancia a 340 nm indicado por la reducción de

NADH fue seguido en el tiempo durante 5 min. La actividad se calculó utilizando el coeficiente de extinción para NADH de $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La actividad OAT se expresó como $\mu\text{mol NADH reducido (mg prot)}^{-1} (\text{min})^{-1}$.

La cuantificación de las actividades PDH y PO se llevaron a cabo basándonos en el método propuesto por Brandriss y Magasanik (1979).

Para la determinación de la actividad de la enzima PDH la mezcla de reacción consistió en: 2.4 mL de buffer $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-HCl}$ 0.15 M pH 10, 0.2 mL de NAD^+ 0.01 M, 0.2 mL de L-prolina 2.67 mM. La reacción comenzó por la adición de 0.2 mL de extracto enzimático. El cambio en absorbancia a 340 nm producido por la reducción del NAD^+ fue seguido en el tiempo durante 5 min. La actividad de PDH se calculó usando el coeficiente de extinción para NAD^+ de $16.9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La actividad PDH se expresó como $\mu\text{mol NAD}^+ \text{ reducido (mg prot)}^{-1} (\text{min})^{-1}$. Para la determinación de la actividad PO la mezcla de reacción consistió en lo siguiente: 2 mL de BUFFER DE REACCIÓN, que contenía buffer Tris-HCl 0.05 M pH 8.5 con 5 mM de MgCl_2 , 0.5 mM de FAD^+ , 1 mM KCN, 1 mM de metasulfato de fenacina, 0.06 mM de 2,6-diclorofenol-indofenol, 1M de L-prolina. Este buffer es estable a 4°C en oscuridad durante una semana. Se recomienda guardar el buffer en un frasco tapado con el fin de evitar su degradación por la luz. El buffer debe estar a temperatura ambiente antes de comenzar la determinación de la actividad PO. La reacción comenzó por adición de 100 μL de extracto enzimático. La reducción del FAD^+ se midió en el tiempo durante 5 min por variación de la absorbancia a 600 nm.

Actividad BADH

La actividad de BADH (betaína aldehído deshidrogenasa) se determinó como describió Sithtisarn y col. (2009) y se utilizó el mismo extracto vegetal que para la determinación de GB y colina descrita anteriormente (Rasheed y col., 2010). Un volumen final de mezcla de reacción de 0.5 mL estaba compuesto por 1.0 mM betaína aldehído y 0.3 mM NADP^+ disueltos en 100 mM de buffer fosfato potásico pH 8.0. Todas las determinaciones fueron llevadas a cabo a 30°C . La actividad BADH se obtuvo monitorizando el cambio en la absorbancia a 340 nm por reducción del NADH. La actividad de BADH se calculó utilizando el coeficiente de extinción para NADH de $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La actividad de BADH se expresó como $\mu\text{mol NADH reducido (mg prot)}^{-1} (\text{min})^{-1}$.

Extracción para actividades SS, SPS, NI, AI, FBPasa, FK

Las extracciones de sacarosa sintetasa (SS), fosfato sacarosa sintasa (SPS), invertasa neutra (NI), invertasa ácida (AI), fructosa 1, 6-bifosfatasa (FBPasa), y fructoquinasa (FK) se llevaron a cabo como describió Borsani y col. (2009). En todos los casos, se trituró 1 g de hojas en un mortero frío en presencia de polivinil polipirrolidona (PVPP, Sigma-Aldrich). Las muestras se homogeneizaron con 0.3 mL de buffer que contenía 400 mM TRIS-HCL, pH 8.5, 5 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 10 mM β-mercaptoetanol, 20% (v/v) de glicerol, 10 mM de ácido ascórbico, 1 mM de fluoruro de fenolmetilsulfonil (PMSF), 1% (v/v) triton X-100, 10 µg/mL quimostatina (chymostatin) y 10 µL de cóctel inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich).

En el caso de la extracción de las invertasas, se utilizó 400 mM HEPES-NaOH, pH 8.8 en vez de TRIS-HCL. Las muestras se centrifugaron a 10000 g durante 15 minutos a 4°C y los extractos obtuvieron de acuerdo con Penefsky (1977). La actividad enzimática se midió espectrofotométricamente en un volumen final de 250 µL a 340 nm y a 25°C.

Determinación de la actividad SS

La actividad SS se analizó como Morell y Copeland (1984). La producción de UDP-glucosa lleva asociada la reacción de reducción de NAD⁺ en presencia de un exceso de UDP-glucosa deshidrogenasa, produciendo un cambio en la absorbancia de la muestra a medir, la cual fue seguida espectrofotométricamente a 340 nm. Las mezclas de reacción contenían 20 µM buffer Hepes-KOH (pH 7.5), 100 µM sacarosa, 2 µM UDP, 1.5 µM NAD⁺, 25 µg UDP-glucosa deshidrogenasa y extracto vegetal. La actividad de SS se expresó como unidades internacionales (U) (mg prot)⁻¹, donde una unidad era definida como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 µmol de NAD⁺.

Determinación de la actividad SPS

La actividad SPS fue determinada de acuerdo con Miron y Schaffer (1991) en mezclas de reacción que contenían 50 mM buffer Hepes-NaOH (pH 7.5), 15 mM MgCl₂, 25 mM Fru6P (fructosa-6-fosfato), 25 mM G6P (glucosa-6-fosfato), 25 mM UDP-glucosa, y 40 µL de extracto vegetal. Las muestras se incubaron a 37°C durante

30 minutos, y la incubación se finalizó con la adición de 70 μL de KOH 30%. La actividad SPS se expresó como $\mu\text{mol sacarosa (mg prot)}^{-1} (\text{min})^{-1}$.

Determinación de la actividad NI y AI

Las actividades de las enzimas NI y AI fueron analizadas siguiendo el método propuesto por Borsani y col. (2009). La actividad de NI se obtuvo mediante la incubación de la siguiente mezcla de reacción: 200 mM buffer HEPES-NaOH (pH 7.5), 200 mM de sacarosa, y el extracto vegetal. La mezcla se incubó a 30°C a diferentes tiempos, y el progreso de la reacción se siguió con glucosa oxidasa/peroxidasa de rábano para detectar la cantidad de glucosa producida. La determinación de la actividad AI se realizó en las condiciones descritas anteriormente, excepto que la mezcla de la reacción llevaba 100 mM de buffer ácido acético/acetato de sodio, pH 5.0. En el caso de AI, antes de la determinación de glucosa, el extracto fue neutralizado según Vargas y col. (2007). NI y AI fueron expresadas como U (mg prot)⁻¹.

Determinación de la actividad FBPasa

La actividad FBPasa fue determinada siguiendo el método propuesto por van Schaftingen y Hers (1981) y Loggini y col. (1999). La mezcla de reacción contenía 1 mM de fuctosa-6-fosfato (Fru6P), 3 mM de glucosa-6-fosfato (G6P), 5 mM de ATP, 7 mM MgCl_2 , 5 mM Pi, 100 mM KCl, 20 mM bis-trispropano (Sigma), pH 7.1 en 1 mL de volumen final. La mezcla fue incubada a 37°C durante 10 min y posteriormente se añadió 250 μL de glicina 50 mM caliente (80°C) a pH 10. La mezcla se mantuvo a 80°C durante 5 min. Esta solución fue posteriormente neutralizada mediante la adición de 250 μL de HEPES 200 mM, pH 7.1 y posteriormente centrifugada a 9500 rpm 20 minutos. A 250 μL de sobrenadante se le añadieron 25 μL del extracto enzimático, se agitó bien la mezcla y se midió en el espectrofotómetro a 340 nm, para determinar la actividad de la enzima FBPasa. La actividad FBPasa se expresó como U (mg prot)⁻¹. Una unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima que era capaz de catalizar la conversión de 1 μmol de sustrato por minuto. Coeficiente de extinción 6.2 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Determinación de la actividad FK

La actividad FK fue determinada siguiendo el método propuesto por Borsani y col. (2009). La reacción estaba compuesta por 0.1 M de TRIS-HCl, pH 8.5, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM NAD, 1.5 U de fosfoglucoasa isomerasa, 10 mM de fructosa, 2 mM ATP, 2 U of glucosa-6- fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y el extracto. La reacción comenzó con la adición del ATP. La actividad se midió espectrofotométricamente a 340 nm en un volumen final de 1 mL a 30°C. La actividad FK se expresó como U (mg prot)⁻¹.

Determinación de la actividad T6PS.

Para la extracción realizada para la cuantificación de la actividad trehalosa-6-fosfato sintasa (T6PS) se utilizaron 200 mg de tejido vegetal fresco y se mezclaron con 2 mL de ácido tricloroacético 0.5 M. Las muestras fueron centrifugadas a 30000 g durante 20 min y el sobrenadante fue usado para la determinación de la actividad T6PS. Dicha actividad fue analizada usando el método propuesto por Cabib y Leloir (1958) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción contenía 40 mM HEPES/KOH (pH 6.8), 10 mM MgCl₂, 10 mM G6P (glucosa-6-fosfato), y 5 mM UDPG (UDP-glucosa). Las reacciones empezaron con la adición del extracto vegetal y finalizaron colocando los tubos en agua hirviendo durante 2 minutos. La actividad T6PS se midió espectrofotométricamente a 340 nm y fue expresada como U (mg prot)⁻¹, donde una unidad es definida como la cantidad de enzima necesaria para formar 1mM de glucosa.

Extracción para las actividades CAT, SOD, APX, MDHAR, DHAR, GR y NADPH oxidasa

Para la determinación de la actividad SOD (Superóxido dismutasa), CAT (Catalasa), APX (Ascorbato peroxidasa), DHAR (Dehidroascorbato reductasa), MDHAR (Monodehidroascorbato reductasa) y GR (Glutati6n reductasa) se realizaron extracciones enzimáticas a partir de 0.2 g de tejido de pericarpio sano de los frutos guardados a -80°C. El material vegetal fue triturado con nitr6geno líquido y homogeneizado con tamp6n MES/KOH 50 mM (pH 6.0), 40 mM KCN, 2 mM CaCl₂, y 1mM L-AsA (ácido asc6rbico). Las muestras se centrifugaron a 13000 g durante 10 min a 4°C. Se utiliz6 el sobrenadante para los análisis de actividad enzimática, del cual se guardaron alícuotas a -80°C para su posterior análisis.

A partir de esta extracción se determinaron las actividades anteriores utilizando un espectrofotómetro para microplacas PoweWave XS2 y siguiendo unos protocolos específicos para ese fin. Todas las actividades enzimáticas se llevaron a cabo a 20°C en 0.5 mL de volumen de reacción.

La concentración de las proteínas solubles contenidas en el extracto vegetal se determinó mediante el método de Bradford (1976) con el fin de expresar las actividades en función de la concentración de las mismas.

Determinación de la actividad CAT

La actividad de la enzima catalasa (CAT) fue determinada espectrofotométricamente, basándonos en el método propuesto por Chance y Maehly (1955), en una mezcla de reacción que contenía tampón 50 mM KH_2PO_4 (pH 7.0) y 15 mM H_2O_2 , con 100 μL de extracto para iniciar la reacción. La actividad se expresó como el cambio en la absorbancia a 240 nm debida a la degradación de H_2O_2 . La actividad de CAT se calculó usando el coeficiente de extinción de $39.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Aebi, 1984). La actividad CAT se expresó como μmol de H_2O_2 reducido $(\text{mg prot})^{-1} (\text{min})^{-1}$.

Determinación de la actividad SOD

La actividad de la enzima SOD (superóxido dismutasa) se determinó como describió McCord y Fridovic (1969), con algunas modificaciones. La mezcla de reacción consistía en 50 mM tampón HEPES (pH 7.8), 0.5 mM EDTA, 0.5 mM nitroblue tetrazolium (NTB), 4 mM xantina, 50 μL de extracto, y 0.04 U de xantina oxidasa. Se leyó la absorbancia a 560 nm al cabo de 10 minutos de reposo de las muestras. La actividad SOD se determinó frente una curva patrón, utilizando superóxido dismutasa de rábano (horseradish SOD, Sigma-Aldrich). La actividad SOD se expresó como unidades de SOD $(\text{mg prot})^{-1} (\text{min})^{-1}$, entendiéndose una unidad como la cantidad de enzima necesaria para neutralizar una unidad de xantina oxidasa.

Determinación de la actividad APX

La actividad de la enzima APX (ascorbato peroxidasa) se analizó con el protocolo modificado de Nakano y Asada (1987). La mezcla de reacción consistió en tampón 50 mM KH_2PO_4 (pH 7.0), 250 μL L-AsA, y 10 μL de extracto, y la reacción se inició mediante la adición de H_2O_2 . El cambio en absorbancia a 290 nm debida a la

oxidación del ascorbato fue seguida en el tiempo durante 5 min. 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 μmol de ácido ascórbico reducido $(\text{mg prot})^{-1} (\text{min})^{-1}$.

Determinación de la actividad MDHAR y DHAR

La determinación de las actividades de MDHAR (Monodehidroascorbato reductasa) y DHAR (dehidroascorbato reductasa) se llevaron a cabo como describieron Miyake y Asada (1992). La actividad de DHAR se analizó mezclando en reacción tampón 50mM HEPES (pH 7.0), 0.1 mM EDTA, 2.5 mM GSH, 0.2 mM DHA y 20 μL de extracto. La actividad de esta enzima se determinó midiendo el cambio de absorbancia durante 3 minutos a 265 nm debida a la reducción del DHA, utilizando un coeficiente de extinción de $7.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La actividad MDHAR fue medida en una mezcla de reacción que contenía 100 mM HEPES (pH 7.6), 2.5 mM AsA, 0.25 mM NADH, 50 μL de extracto y 0.4 U de ascorbato oxidasa. La actividad de MDHAR se determinó con el cambio de absorbancia durante 3 minutos a 340 nm debida a la reducción del NADH, utilizando un coeficiente de extinción de $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Las actividades MDHAR y DHAR fueron expresadas como μmol NADH oxidado $(\text{mg prot})^{-1} (\text{min})^{-1}$ y μmol DHA reducido $(\text{mg prot})^{-1} (\text{min})^{-1}$ respectivamente.

Determinación de la actividad GR

La actividad de la enzima glutatión reductasa (GR) se determinó siguiendo el método propuesto por Halliwell y Foyer (1976) con la siguiente mezcla de reacción: tampón HEPES 50 mM (pH 8.0), 0.5 mM EDTA, 0.25 mM NADPH, 100 μL de extracto y 0.5 mM de GSSG (glutatión oxidado). La actividad se determinó midiendo el cambio de absorbancia durante 3 minutos a 340 nm, y utilizando el coeficiente de extinción $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La oxidación no específica de NADPH se determinó antes de añadir GSSG y se sustrajo de la actividad específica de GR. La actividad GR fue expresada como μmol NADPH oxidado $(\text{mg prot})^{-1} (\text{min})^{-1}$.

Determinación de la actividad de NADPH oxidasa

La actividad NADPH oxidasa se calculó tal y como previamente describieron Cakmak y Marschner (1988), con un volumen de reacción de 1.5 mL que contenía tampón 0.1M K_2HPO_4 (pH 7.0), 0.1 mM EDTA y 50 μM NADPH. La reacción se iniciaba

al añadir 200 μL de extracto enzimático y la oxidación de NADPH fue seguida en el tiempo a 340 nm durante 3 minutos. La actividad NADPH oxidasa fue expresada como $\mu\text{mol NADPH oxidados (mg prot)}^{-1} (\text{min})^{-1}$.

Determinación de la concentración de ascorbato y glutatión

Para determinar la concentración de las formas de ascorbato y de las formas de glutatión, se realizaron extracciones de los frutos anteriormente guardados a -80°C , a partir de 0.2 g de tejido sano, finamente triturado con nitrógeno líquido y homogeneizado con 1.5 mL de HCl_4 . Las muestras se centrifugaron a 13000 g durante 10 min a 4°C . Del sobrenadante resultante se guardaron 400 μL para la determinación de ácido ascórbico (AsA) y otros 400 μL para las determinaciones de glutatión (GSH). A partir de estos extractos, se añadió 200 μL de tampón HEPES/KOH 0.1M (pH 7.0) para la determinación de AsA y 100 μL para determinar GSH. Se añadieron alícuotas de K_2CO_3 6 M gradualmente para ajustar el pH a 4.0-5.0 para la determinación de AsA y a 6.0-7.0 para determinar GSH y precipitar percloratos. Las muestras se centrifugaron tal y como se describe anteriormente, y se descartaron los precipitados. Se analizó la concentración de AsA reducido, DHA oxidado, glutatión reducido (GSH) y su forma oxidada (GSSG) como describió Griffith (1980), utilizando el espectrofotómetro descrito anteriormente. La concentración de las distintas formas de ascorbato fue determinado a una longitud de onda de 525 nm y las de glutatión a 412 nm. La concentración de AsA y DHA, así como de GSH y GSSG fue expresada como $\mu\text{mol g (PF)}^{-1}$.

3.4.10. Determinación de la concentración de H_2O_2

Se realizó la extracción de H_2O_2 como describieron McNevin y Uron (1953) con algunas modificaciones (Brennan y Frenkel, 1977; Rivero y col., 2007). La mezcla de reacción consistió en 2.5 mL del extracto enzimático, 0.5 mL de ICl_4 al 20% y se agitó enérgicamente. A continuación, se adicionaron 2.5 mL de NH_4OH al 20% gota a gota mezclándose minuciosamente. La mezcla resultante, se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min. El sobrenadante se desechó y el precipitado se lavó varias veces con acetona fría (empleando un volumen aproximado de 5 mL), hasta que el sobrenadante (formado) quedaba decolorado. El precipitado se solubilizó en 7.5 mL de H_2SO_4 2N. Seguidamente se llevó a un volumen final de 12.5 mL de H_2O desionizada. Finalmente, la solución obtenida se filtró (con embudos de papel). Por último, se

procedió a la lectura de las muestras a una longitud de onda de 415 nm. La concentración de peróxido de hidrógeno de los extractos se determinó comparando la absorbancia de las muestras con una curva patrón, representando los complejos de peróxido de titanio de 0.1 a 1mM. La concentración de H₂O₂ fue expresada como $\mu\text{mol g (PF)}^{-1}$.

Peroxidación lipídica

Se determinó Malondialdehído (MDA), como producto de degradación de la peroxidación lipídica, de la siguiente forma: se homogeneizó 0.5 g de tejido de hoja con 5 mL de disolución buffer 50 mM, que contenía 0.07% de NaH₂PO₄*2H₂O y 1.6% NaH₂PO₄*12H₂O, triturándolo con un mortero y se centrifugaron a 20000 g a 4°C durante 25 minutos. Se utilizó el sobrenadante para determinar el contenido de MDA. Los valores de absorción no específica a 600 nm se obtuvieron de la lectura a 532 nm con el espectrofotómetro descrito anteriormente. El restablecimiento de MDA en la cubeta se comprobó para evitar sobreestimaciones de valores de MDA debido a la interferencia de compuestos como antocianos. La concentración de MDA se calculó usando el coeficiente de extinción para MDA de 155 mM⁻¹cm⁻¹ (Fu y Huang, 2001).

3.4.11. Oxidación proteica y actividad proteolítica

La oxidación proteica se analizó como describieron Reznick y Packer (1994). De forma resumida, la reacción entre 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) y grupos de carbonil proteicos forman un compuesto de hidracina que se puede cuantificar espectrofotométricamente. Tejidos de hoja se homogeneizaron en 50 mM MES pH 6.7 con 1 mM EDTA. Después de centrifugar a 10000 g durante 15 minutos a 4°C, los sobrenadantes se utilizaron para analizar el contenido de grupos carbonilo de las proteínas a 370 nm. El contenido en grupos carbonilo se estandarizó al contenido de proteínas solubles del extracto. La actividad proteolítica (Distefano y col., 1997) fue determinada en extractos en bruto con la digestión de azocaseína y se midió con espectrofotómetro a 340 nm con el espectrofotómetro descrito anteriormente y se expresó como U (mg prot)⁻¹.

3.4.12. Técnicas moleculares

Cuantificación de la expresión genética mediante PCR cuantitativa

El ARN total de las hojas de tres plantas de tomate de cada tratamiento fue aislado utilizando el reactivo TRI-REAGENT (Sigma-Aldrich, Ref. T9424). El ARN fue purificado pasando las muestras a través de una columna por centrifugación (RNAeasy, Qiagen). Para eliminar trazas de ADN, el ARN se trató con DNAsa I (Fermentas life Sciences) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se obtuvo el cDNA de tres ARNs independientes (2µg de ARN total) utilizando el kit de síntesis SuperScript VILO cDNA (Invitrogen). De cada cDNA, se utilizaron tres repeticiones analíticas, de esta forma, cada muestra venía representada por nueve repeticiones en total. Se utilizó el programa Primer3 para diseñar los cebadores basados en las secuencias de unigenes disponibles para tomate en Sol Genomics Network (<http://solgenomisc.net/>). El número de accesión (código internacional) de los genes analizados y las secuencias utilizadas de los cebadores están representados en la tabla 3.5.

Se utilizaron dos controles internos independientes (actina y EIF-1a) cuya expresión no cambió a lo largo de las distintas muestras ni con los distintos tipos de estrés utilizados. De la expresión obtenida de los distintos genes analizados en este experimento se hizo una primera normalización frente a la actina. Para asegurarnos que actina era un gen inalterado con las condiciones ambientales utilizadas (control interno) se realizó una segunda normalización frente a EIF-1a, y no se observaron cambios en los niveles de expresión con respecto al obtenido con la normalización con actina.

Para llevar a cabo un estudio de la expresión de los genes seleccionados en nuestros experimentos mediante qPCR se utilizó un volumen total de reacción de 20 µL. Las reacciones incluyeron 2 µL de la muestra a analizar, 10 µL de Fast SYBR Green Master Mix, 0.9 µL de cada cebador y agua desionizada y esterilizada de grado molecular hasta un volumen total de 20 µL.

La reacción de la qPCR presentó las siguientes condiciones: 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos a 95°C durante 3 segundos y 60°C durante 30 segundos.

Las condiciones de amplificación y los análisis de los datos se realizaron en un sistema de PCR a tiempo real ABI StepOne Plus (Applied Biosystems) utilizando como controles internos actina y/o 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 antes de comenzar el estrés (0h).

3.5. Análisis estadístico

Los datos se analizaron realizando análisis estadístico con el SPSS v.19. Para la mayoría de los datos se usó el análisis de la varianza (ANOVA) utilizando $P=0.05$ como probabilidad de corte indicativa de diferencias significativas y de acuerdo con el diseño experimental de cada ensayo. La comparación entre los valores medios de los tratamientos se hizo mediante el test de rango múltiple Tukey.

La expresión génica relativa de los genes analizados por qPCR se calculó utilizando el método $2^{-\Delta Ct}$. Se calcularon las medias y error estándar para cada grupo de tratamiento (n=9). Finalmente, se calculó el cambio relativo para cada gen, dividiendo la media del valor de expresión relativa de cada tratamiento por la media de los valores de expresión del grupo control (antes del estrés).

El mapa de calor para osmoprotectores, expresión génica y actividades enzimáticas se crearon con una aplicación informática llamada *R*.

Tabla 3.5. Parejas de cebadores utilizados.

| | SGN Acc# | Cebadores |
|---------------------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| LeP5CS | SGN-U575897 | Sentido: 5'-ATTGTCAAGGTTGGGACTGC-3' Antisentido: 5'-AAGCTCCTGAAGCTGCTCAC-3' |
| LeP5CR | SGN-U567857 | Sentido: 5'- GGAGCTGGTAAAATGGCTGA-3' Antisentido: 5'- CTGATCCAGAATGGGCTGTT-3' |
| LeOAT | SGN-U563984 | Sentido: 5'- ATAAGAGAGGGGAGCGGTA-3' Antisentido: 5'- TCTTCATCGCCATTGTTGAC-3' |
| LePDH | SGN-U581540 | Sentido: 5'- TTCTGGGTAAAAGCCATGC -3' Antisentido: 5'- AAACGCCGCGACTACTCTGTT -3' |
| LePO | SGN-U578070 | Sentido: 5'- ATCGCTAAAAAGGCAGCAGA -3' Antisentido: 5'- CAAGCTTAAACCCATTGGA -3' |
| LeBADH | SGN-U577228 | Sentido: 5'- GCTTGGTGGAAAAAGTCCAA -3' Antisentido: 5'- AAGCAGCCAAAAAGAGTCCA -3' |
| LeCMO | SGN-U569932 | Sentido: 5'- TCCCAATTGAAGAAGCCATC -3' Antisentido: 5'- GATTGCCAGCCTTTGAAGAA -3' |
| LeSPS | SGN-U567040 | Sentido: 5'- GATGAGTGAGATGGGGGAGA -3' Antisentido: 5'- TCTTGGTCCAAAAGGAATGC -3' |
| LeSUS3 | SGN-U580181 | Sentido: 5'- TTGGATTTTGAGCCCTTCAC -3' Antisentido: 5'- AGAGAGGTGCCTGTTGAGGA -3' |
| LeNI | SGN-U586149 | Sentido: 5'- CGCAGAAAATTGTGCTTCAA -3' Antisentido: 5'- ATCGCATAGCCTCAGGAGAA -3' |
| LeAI | SGN-U580029 | Sentido: 5'- CCAGGGTTGCAATCTACAAG-3' Antisentido: 5'- CCATGTTGATGTTAGCAAGG-3' |
| LeFPBase | SGN-U583766 | Sentido: 5'- TACAGCCCGAATGATGAGTG -3' Antisentido: 5'- TTCACGATGCACTTTTGCTC -3' |
| LeG6PDH | SGN-U576857 | Sentido: 5'- GCACGTGCCAGGAAATTTAT -3' Antisentido: 5'- AAGCTCGTTTGTTCCTGAT -3' |
| LeFK2 | SGN-U586194 | Sentido: 5'- TTTGATCGTGGAGCCATGTA -3' Antisentido: 5'- CAAACGAAGGTTTGGGTCAT -3' |
| LeT6PS | SGN-U576716 | Sentido: 5'- TGACAAACAGCAGGCTCATC -3' Antisentido: 5'- CTTCTTGA CTGGGGCTTTG -3' |
| Actin (control interno) | SGN- U580609 | Sentido: 5'-TTCCCTCTATGCCAGTGGAC-3' Antisentido: 5'-CATCTCCAGAGTCCAGCACA-3' |
| EIF-1a (control interno) | SGN-U590849 | Sentido: 5'- GAACTGTCCAGTTGGTCGT -3' Antisentido: 5'- GTCAAACCAGTAGGGCCAAA -3' |

4. Resultados y discusión

4.1. Respuesta agronómica y fisiológica de tomate a la combinación de salinidad y altas temperaturas

El experimento se realizó en invernadero, donde se cultivaron plantas de tomate en cubos con 120 litros de disolución nutritiva durante el periodo primavera-verano. Se dispusieron 48 plantas de la variedad Anairis, en dos módulos independientes con diferentes temperaturas ambientales. En cada módulo se establecieron cuatro tratamientos de salinidad.

4.1.1. Rendimiento y calidad de frutos

Rendimiento de frutos comerciales

En la tabla 4.1 se representa el rendimiento de frutos comerciales, tamaño y número de frutos obtenidos en plantas de tomate sometidas a diferentes niveles de salinidad y a dos temperaturas ambientales diferentes. Como se puede apreciar, el rendimiento de frutos comerciales expresado como kg de tomates por planta, se redujo con el incremento de la salinidad, de manera que con 90 mM de NaCl se obtuvo un 68% menos de frutos comerciales con respecto a las plantas control. Esta reducción en el rendimiento de frutos comerciales debida al incremento de la salinidad, vino determinada por una reducción tanto en el tamaño, como en el n° de frutos respecto a las plantas control.

Un aumento de la temperatura de 25°C a 35°C también supuso una reducción en el rendimiento de frutos comerciales, la cual, en este caso, vino determinada por el menor número de frutos con respecto a 25°C, ya que un aumento en la temperatura no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre el tamaño de los frutos (Tabla 4.1). La interacción salinidad x temperatura no produjo diferencias significativas en ninguno de estos parámetros determinados. La respuesta al aumento de la salinidad siguió un patrón similar en ambas temperaturas (Figura 4.1).

Tabla 4.1. Efecto combinado de salinidad y alta temperatura sobre el **rendimiento comercial** (kg frutos/planta), **tamaño** (g/fruto) y **número de frutos** comerciales por planta.

| Efectos principales | | Rendimiento comercial | Tamaño | Nº frutos |
|--------------------------------|----|-----------------------|--------|-----------|
| Salinidad (mM NaCl) | 10 | 10.8 c | 233 c | 47 c |
| | 30 | 9.9 c | 220 c | 45 bc |
| | 60 | 6.5 b | 180 b | 37 b |
| | 90 | 3.5 a | 133 a | 27 a |
| Temperatura (°C) | 25 | 8.4 | 195 | 41 |
| | 35 | 7.0 | 188 | 36 |
| Análisis de la varianza | | | | |
| Salinidad | | *** | *** | *** |
| Temperatura | | *** | ns | * |
| Salinidad x Temperatura | | ns | ns | ns |

Las medias con letras diferentes indican diferencias significativas al 95% según el test de rango múltiple de Tukey. *, **, ***, ns indican diferencias significativas entre medias para $p < 0.05$, 0.01, 0.001 y no significativo respectivamente.

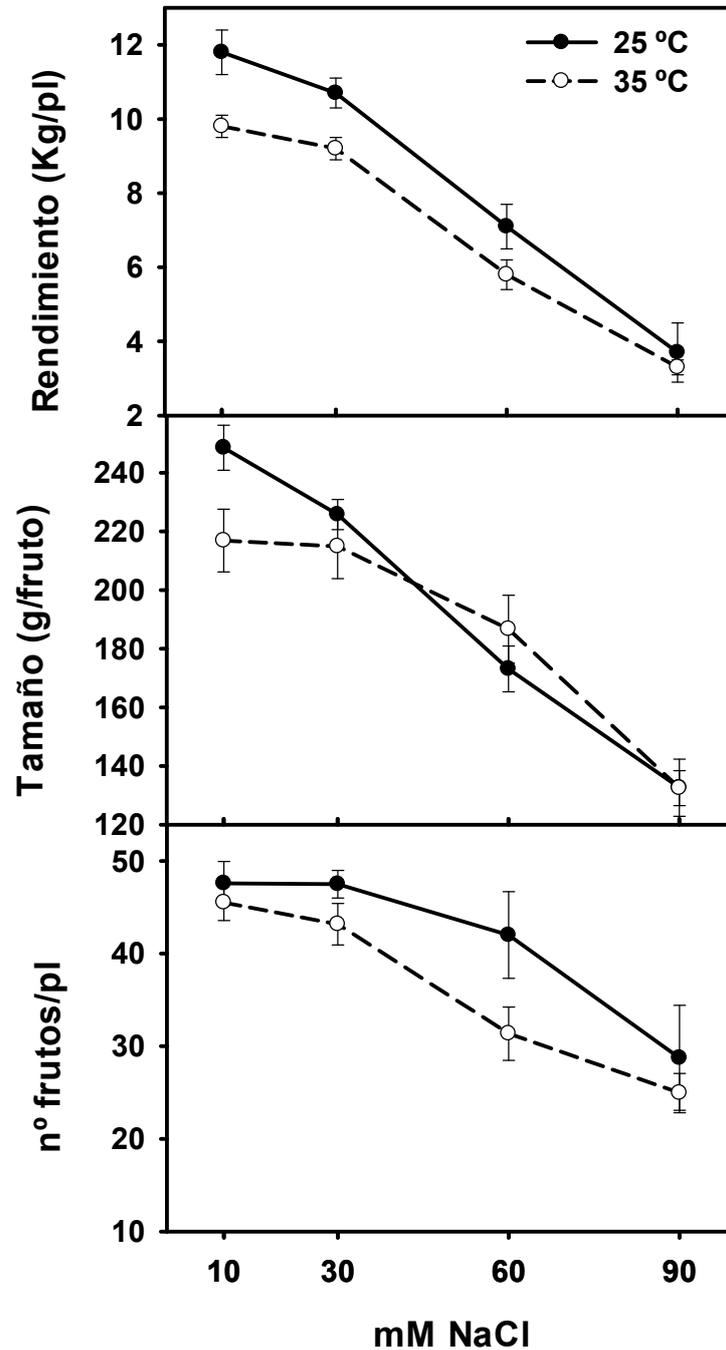


Figura 4.1. Rendimiento, tamaño y número de frutos comerciales al final del cultivo en respuesta a la concentración de sal y a dos temperaturas ambientales. Cada punto representa el promedio de 6 valores. La barra de error es $\pm EE$.

La figura 4.2 muestra gráficamente el rendimiento de frutos comerciales en gramos por planta para cada racimo. Estos se numeraron de 1 a 10 según desarrollo cronológico. Como se puede ver, el rendimiento de frutos comerciales aumentó del racimo 1 al 2 de forma general para todos los tratamientos salinos y para ambas temperaturas, pero a partir del tercer racimo se observó una reducción del mismo. Esta reducción fue más acusada en los tratamientos de 10 y 30 mM de NaCl.

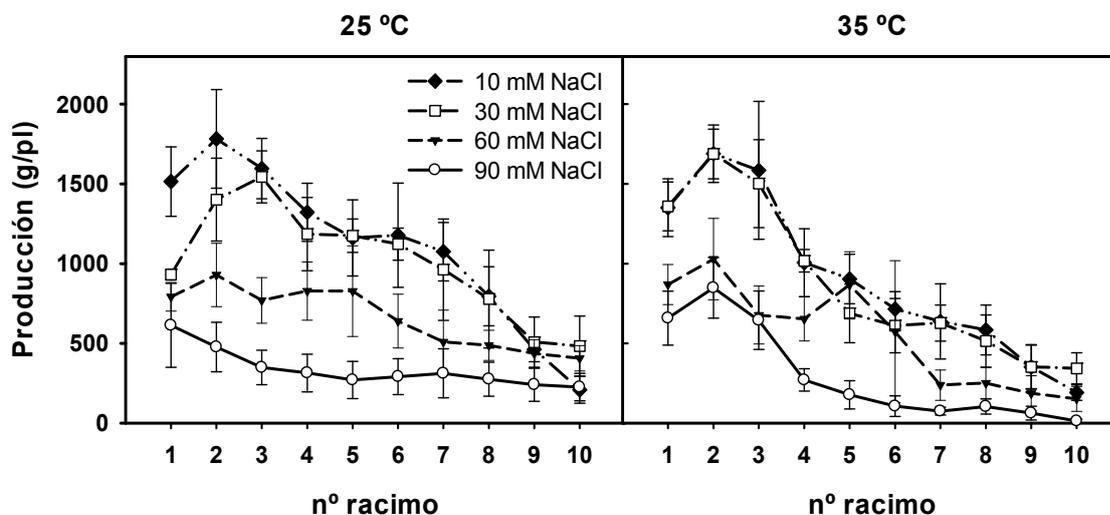


Figura 4.2. Rendimiento de frutos comerciales por racimo de frutos obtenidos cronológicamente (1-10) al final del cultivo en respuesta a la concentración de sal y a dos temperaturas ambientales. Cada punto representa el promedio de 6 valores. La barra de error es \pm EE.

Rendimiento por categorías comerciales

Los frutos obtenidos en los distintos tratamientos durante el experimento fueron clasificados en tres categorías comerciales: tomates “extra”, de “primera” y de “segunda” categoría, según la tabla 3.4 del apartado de Material y métodos de esta memoria.

Como podemos observar en la tabla 4.2, un aumento de la salinidad en el medio redujo significativamente la producción de frutos de “primera” y “extra”. Asimismo, un aumento de la temperatura de 25°C a 35°C también supuso una reducción significativa de la producción de frutos “extra” en un 32% y de “primera” categoría en un 19%.

Tabla 4.2. Efecto combinado de salinidad y alta temperatura sobre la **producción comercial** por categorías (kg PF frutos/planta).

| Efectos principales | | Extra | Primera | Segunda |
|-------------------------|----|-------|---------|---------|
| Salinidad (mM NaCl) | 10 | 4.2 b | 5.5 c | 1.3 a |
| | 30 | 3.1 b | 5.4 c | 1.5 ab |
| | 60 | 0.9 a | 3.5 b | 2.1 b |
| | 90 | 0.1 a | 1.5 a | 1.9 b |
| Temperatura (°C) | 25 | 2.5 | 4.3 | 1.6 |
| | 35 | 1.7 | 3.5 | 1.8 |
| Análisis de la varianza | | | | |
| Salinidad | | *** | *** | ** |
| Temperatura | | * | * | ns |
| Salinidad x Temperatura | | * | ns | ** |

Las medias con letras diferentes indican diferencias significativas al 95% según el test de rango múltiple de Tukey. *, **, ***, ns indican diferencias significativas entre medias para $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 y no significativo respectivamente.

Se puede observar que la interacción salinidad x temperatura tuvo efectos significativos sobre la producción de frutos “extra” y de “segunda” categoría (Tabla 4.2). En la figura 4.3 se representa la producción de frutos comerciales expresada en kg de tomates/planta y clasificadas según categoría comercial. La producción de tomates “extra” disminuyó con el aumento de la salinidad a 25°C, pero a 35°C, dicha producción fue similar en los tratamientos 10 y 30 mM de NaCl; por el contrario, con los tratamientos de 60 y 90 mM de NaCl la producción de tomates “extra” se redujo drásticamente a ambas temperaturas. Por otro lado, la producción de tomates de “segunda” categoría aumentó con el incremento de la salinidad a 25°C, mientras que a 35°C dicha producción se mantuvo constante.

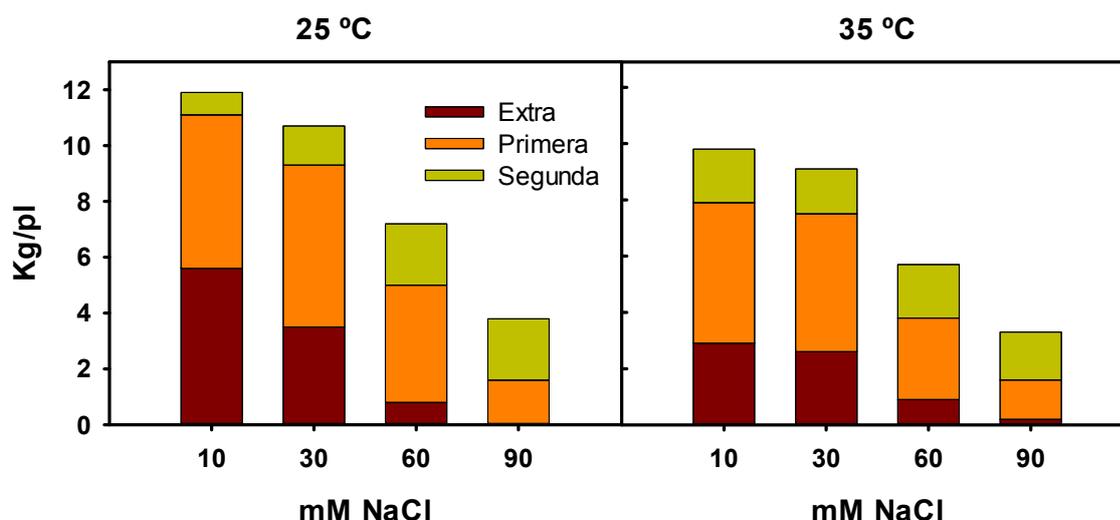


Figura 4.3. Producción de frutos comerciales clasificados por categorías al final del cultivo en respuesta a la concentración de sal y a dos temperaturas ambientales. Cada punto representa el promedio de 6 valores. La barra de error es \pm EE.

Rendimiento total

En la tabla 4.3 se muestran los datos correspondientes al rendimiento total, tamaño de los frutos y número de frutos obtenidos en plantas de tomate sometidas a diferentes niveles de salinidad y a dos temperaturas ambientales diferentes. Como se puede apreciar, la producción total expresada como Kg de tomates por planta, se redujo con el incremento de la salinidad, independientemente de la temperatura aplicada (25°C o 35°C), siendo los tratamientos de 60 y 90 mM de NaCl los que tuvieron un efecto más acusado en la reducción de la producción. Esta reducción en la producción total debida al incremento de la salinidad, vino determinada por una reducción tanto en el tamaño, como en el n° de frutos.

Un aumento de la temperatura de 25°C a 35°C también supuso una reducción de la producción total, la cual, en este caso, vino determinada por una reducción en el tamaño de los frutos con respecto a 25°C, ya que el número de frutos no se vio afectado significativamente por un aumento de temperatura (Tabla 4.3).

La interacción salinidad x temperatura fue significativa en cuanto al tamaño y número de frutos. Con respecto al tamaño de los frutos, se pudo observar que un incremento en los niveles de salinidad produjo una mayor reducción de dicho tamaño a

25°C que a 35°C. Indicando que el efecto de la salinidad sobre el tamaño de los frutos dependía de la temperatura a la que habían crecido las plantas de tomate. Con respecto al número de frutos, el análisis de los datos muestra una interacción significativa entre salinidad y temperatura. Mientras que a 25°C la salinidad no tuvo ningún efecto sobre el número de frutos (excepto a 90 mM NaCl), a 35°C el aumento de la salinidad produjo una reducción del 27 % en los mismos (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Efecto combinado de salinidad y temperatura sobre el **rendimiento total** (kg frutos/planta), **tamaño** (g/fruto) y **número de frutos por planta**.

| Efectos principales | | Rendimiento total | Tamaño | Nº frutos |
|----------------------------------------|----|-------------------|--------|-----------|
| Salinidad (mM NaCl) | 10 | 12.7 d | 223 c | 58 b |
| | 30 | 11.7 c | 208 c | 57 b |
| | 60 | 8.1 b | 149 b | 54 b |
| | 90 | 4.9 a | 103 a | 47 a |
| Temperatura (°C) | 25 | 9.7 | 180 | 54 |
| | 35 | 9.0 | 162 | 54 |
| Temperatura (°C) x Salinidad (mM NaCl) | | | | |
| 25 | 10 | 13.4 | 248 d | 54 abc |
| | 30 | 11.9 | 221 c | 54 bc |
| | 60 | 8.4 | 146 b | 57 abc |
| | 90 | 5.1 | 104 a | 50 ab |
| 35 | 10 | 12.0 | 198 c | 61 d |
| | 30 | 11.6 | 194 c | 60 cd |
| | 60 | 7.8 | 152 b | 51 ab |
| | 90 | 4.6 | 103 a | 45 a |
| Análisis de la varianza | | | | |
| Salinidad | | *** | *** | *** |
| Temperatura | | ** | *** | ns |
| Salinidad x Temperatura | | ns | *** | *** |

Las medias con letras diferentes indican diferencias significativas al 95% según el test de rango múltiple de Tukey. *, **, ***, ns indican diferencias significativas entre medias para $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 y no significativo respectivamente.

Frutos no comerciales

En la tabla 4.4 se representa el porcentaje de la producción no comercial de tomates clasificados por categorías de defectos morfológicos (frutos con BER, rajados, pequeños y otros), obtenidos en plantas de tomate sometidas a diferentes niveles de salinidad y a dos temperaturas ambientales diferentes. La salinidad aumentó el número de frutos de pequeño tamaño y la alta temperatura casi dobló la incidencia del rajado en frutos de tomate. La interacción salinidad x temperatura produjo diferencias significativas en el porcentaje de BER y de rajado (Figura 4.4). A 25°C un aumento de la salinidad aumentó significativamente la incidencia de BER, sin embargo a 35°C los niveles de BER fueron altos independientemente de nivel salino. En cuanto al rajado, un aumento de la concentración salina en el medio radicular disminuyó la incidencia del rajado en el tratamiento de 25°C. A 35°C los niveles de rajado se mantuvieron altos y solamente en el tratamiento de 90 mM NaCl este disminuyó ligeramente. Como se puede observar en la figura 4.4, el porcentaje de la producción no comercial aumentó a medida que se incrementó la salinidad en el medio.

Tabla 4.4. Efecto combinado de salinidad y alta temperatura sobre el **porcentaje de la producción no comercial** obtenido en cada categoría por planta.

| Efectos principales | | %BER | %Rajado | %Pequeños | %Otros |
|------------------------|----|--------|---------|-----------|--------|
| Salinidad (mM NaCl) | 10 | 5.7 a | 8.1 c | 1.2 a | 0 |
| | 30 | 7.2 ab | 5.7 b | 1.6 a | 0.6 |
| | 60 | 7.8 b | 4.3 b | 8.7 ab | 0.3 |
| | 90 | 10.2 c | 2.2 a | 16.4 b | 0.05 |
| Temperatura (°C) | 25 | 6.0 | 3.4 | 5.2 | 0.3 |
| | 35 | 9.5 | 6.7 | 6.5 | 0.1 |

| Análisis de la varianza | | | | | |
|-------------------------|--|-----|-----|-----|----|
| Salinidad | | *** | *** | *** | ns |
| Temperatura | | *** | *** | ns | ns |
| Salinidad x Temperatura | | *** | *** | ns | ns |

Las medias con letras diferentes indican diferencias significativas al 95% según el test de rango múltiple de Tukey. *, **, ***, ns indican diferencias significativas entre medias para $p < 0.05$, 0.01, 0.001 y no significativo respectivamente.

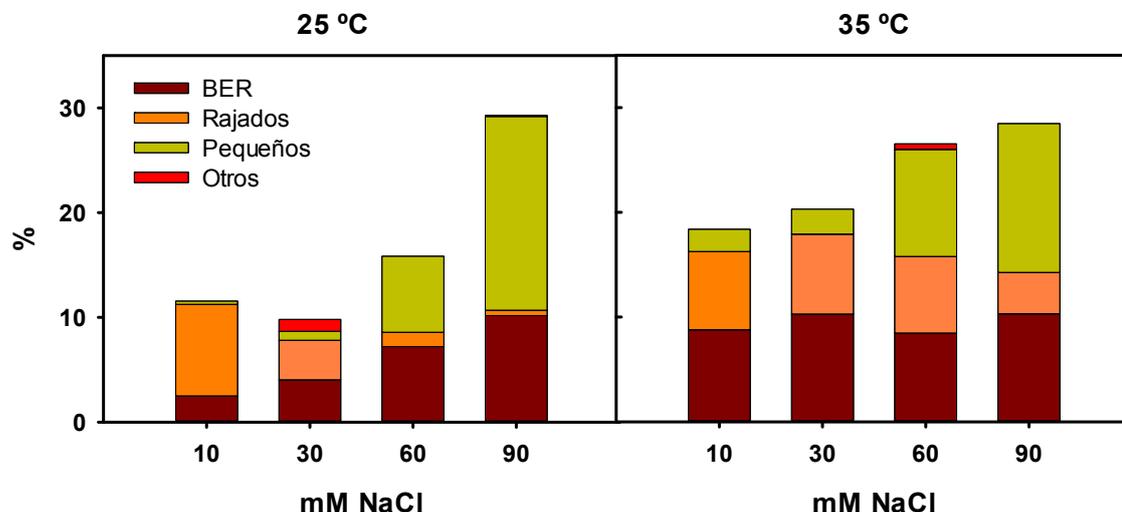


Figura 4.4. Porcentaje producción de frutos no comerciales clasificados por categorías de defectos morfológicos detectados al final del cultivo en respuesta a la concentración de sal y a dos temperaturas ambientales. Cada punto representa el promedio de 6 valores. La barra de error es \pm EE.

Calidad de frutos

La tabla 4.5 representa los parámetros del color de los frutos (L, a y b) en plantas de tomate sometidas a diferentes niveles de salinidad y a dos temperaturas ambientales diferentes. Se puede observar que estos parámetros prácticamente no variaron ni en función de la temperatura, ni de la salinidad (Tabla 4.5), lo que significa que, cumpliendo nuestro objetivo, todos los frutos se recolectaron en el mismo estado de maduración en el momento de realizar el análisis de calidad.

Tabla 4.5. Efecto combinado de salinidad y alta temperatura sobre los parámetros del color del fruto (L, a y b).

| Efectos principales | | L | a | b |
|-----------------------------------------------|----|-------|-------|-------|
| Salinidad (mM NaCl) | 10 | 44.25 | 17.04 | 25.04 |
| | 30 | 44.00 | 17.46 | 25.41 |
| | 60 | 43.82 | 17.21 | 25.79 |
| | 90 | 44.35 | 17.91 | 25.80 |
| Temperatura (°C) | 25 | 43.78 | 16.70 | 25.02 |
| | 35 | 44.45 | 18.09 | 26.00 |
| Temperatura (°C) x Salinidad (mM NaCl) | | | | |
| 25 | 10 | 43.79 | 15.98 | 23.95 |
| | 30 | 44.18 | 16.8 | 25.07 |
| | 60 | 43.51 | 17.13 | 25.81 |
| | 90 | 43.55 | 16.92 | 25.30 |
| 35 | 10 | 44.70 | 18.11 | 26.13 |
| | 30 | 43.80 | 18.16 | 25.78 |
| | 60 | 44.18 | 17.29 | 25.76 |
| | 90 | 45.03 | 18.72 | 26.29 |
| Análisis de la varianza | | | | |
| Salinidad | | ns | ns | ns |
| Temperatura | | ns | ns | ns |
| Salinidad x Temperatura | | ns | ns | ns |

Las medias con letras diferentes indican diferencias significativas al 95% según el test de rango múltiple de Tukey. *, **, ***, ns indican diferencias significativas entre medias para $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 y no significativo respectivamente.

En la tabla 4.6 se presentan algunos parámetros de calidad, algunos de los cuales están muy relacionados con las propiedades organolépticas de los frutos de tomate. Como puede observarse, la salinidad afectó significativamente a todos los parámetros determinados. El aumento de la salinidad aumentó los °Brix, la conductividad eléctrica y la acidez valorable, y disminuyó la firmeza y el pH del zumo de tomate. La temperatura también tuvo un efecto significativo sobre todos los parámetros excepto sobre la CE del zumo. El aumento de la temperatura redujo la firmeza, los °Brix y el pH y redujo la acidez valorable. Solamente se observó cierta interacción significativa entre la salinidad y la temperatura sobre la firmeza de los frutos, indicando, que a partir de 30 mM, el aumento de la salinidad afectó de forma más acusada la firmeza cuando las plantas crecían a 25°C (Figura 4.5). En el resto de parámetros no se observaron interacciones significativas (Figura 4.6).

Tabla 4.6. Efecto combinado de salinidad y alta temperatura sobre la *firmeza* (N), *°Brix*, *CE* (dS/cm), *pH* y *acidez valorable* (g ácido cítrico).

| Efectos principales | | Firmeza | °Brix | CE zumo | pH zumo | Acidez valorable |
|------------------------|----|---------|--------|---------|---------|------------------|
| Salinidad (mM NaCl) | 10 | 48.23 c | 5.50 d | 4.80 b | 4.28 c | 4.34 c |
| | 30 | 46.50 c | 5.91 c | 5.25 b | 4.23 b | 4.90 b |
| | 60 | 32.54 b | 6.72 b | 6.37 a | 4.18 b | 5.44 a |
| | 90 | 21.86 a | 7.12 a | 6.77 a | 4.12 a | 5.70 a |
| Temperatura (°C) | 25 | 40.74 | 6.39 | 5.84 | 4.25 | 4.95 |
| | 35 | 35.16 | 6.16 | 5.66 | 4.15 | 5.19 |

Análisis de la varianza

| | | | | | |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Salinidad | *** | *** | *** | *** | *** |
| Temperatura | ** | ** | ns | *** | * |
| Salinidad x Temperatura | * | ns | ns | ns | ns |

Las medias con letras diferentes en una misma columna son significativamente diferentes según el test de rango múltiple de Tukey. *, **, ***, ns indican diferencias significativas para $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 y no significativo respectivamente.

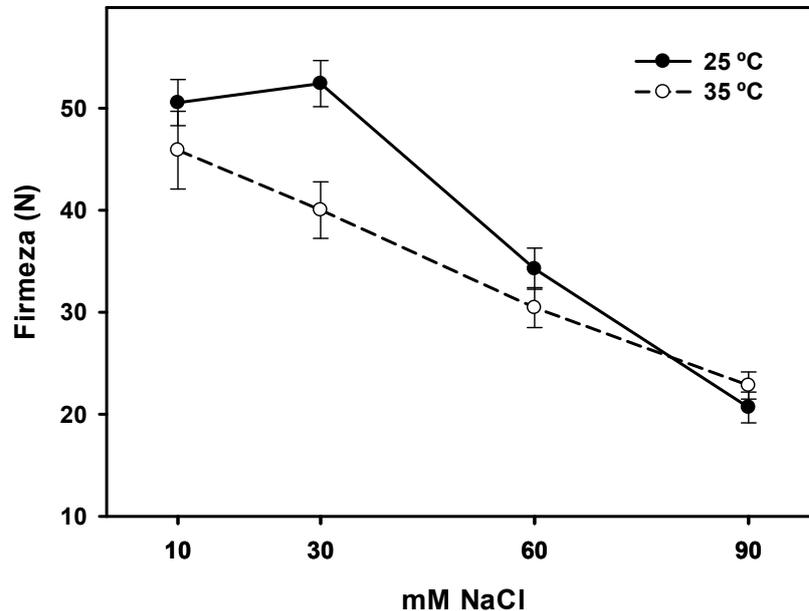


Figura 4.5. Firmeza al final del cultivo en respuesta a la concentración de sal y a dos temperaturas ambientales. Cada punto representa el promedio de 12 valores. La barra de error es \pm EE.

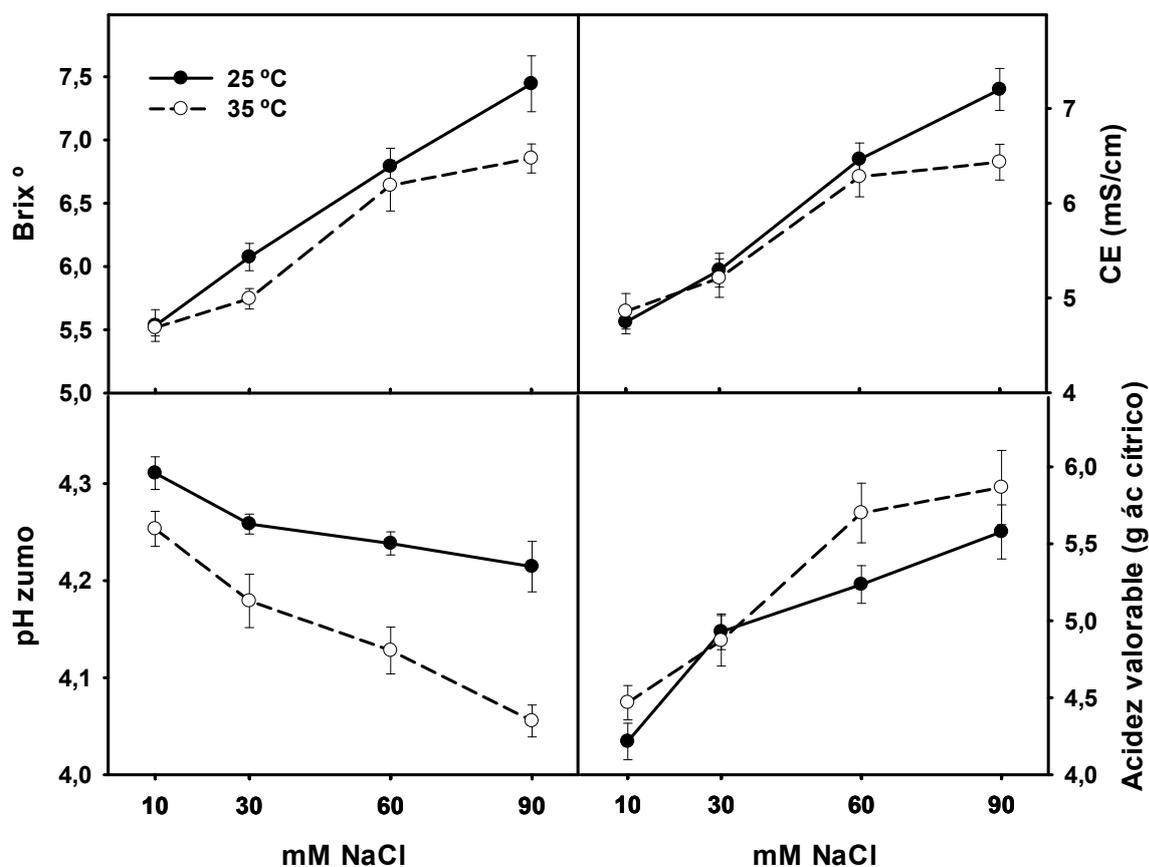


Figura 4.6. Parámetros químicos de calidad del fruto ($^{\circ}$ Brix, CE, pH y acidez valorable) al final del cultivo en respuesta a la concentración de sal y a dos temperaturas ambientales. Cada punto representa el promedio de 12 valores. La barra de error es \pm EE.

También se analizaron otros parámetros relacionados con la calidad tales como el porcentaje de materia seca en el fruto, la concentración de fenoles totales (g ácido gálico/L zumo), así como la concentración de glucosa (mg glucosa/mL) y de fructosa (mg fructosa/mL), en el zumo de frutos de plantas sometidas a diferentes concentraciones salinas y a dos temperaturas ambientales diferentes (Tabla 4.7). El aumento de la salinidad produjo un aumento significativo del porcentaje de materia seca y de la concentración de glucosa y fructosa en los frutos. Por el contrario las plantas cultivadas a alta temperatura disminuyeron significativamente el porcentaje de materia seca y la concentración de glucosa y fructosa.

Como puede verse en la tabla 4.7, el efecto de la salinidad sobre la concentración de compuesto fenólicos dependía de la temperatura a la que se desarrollaba el cultivo. La figura 4.7 B, muestra que a partir de 30 mM de NaCl la salinidad tiende a aumentar la concentración de fenoles a 25°C, por el contrario a 35°C un aumento de la salinidad producía una disminución de la concentración de fenoles.

Tabla 4.7. Efecto combinado de la salinidad y la temperatura sobre **porcentaje materia seca** (%), **fenoles totales** (mg ác. gálico/L), **glucosa** (mg/mL) y **fructosa** (mg/mL).

| Efectos principales | | Materia seca | | Fenoles totales | Glucosa | | Fructosa | |
|-------------------------|----|--------------|----|-----------------|---------|---|----------|---|
| Salinidad (mM NaCl) | 10 | 4.98 | a | 70.21 | 0.84 | c | 1.09 | b |
| | 30 | 5.47 | a | 75.27 | 0.87 | c | 1.12 | b |
| | 60 | 6.77 | ab | 74.47 | 1.08 | b | 1.44 | a |
| | 90 | 8.08 | b | 76.38 | 1.16 | a | 1.53 | a |
| Temperatura (°C) | 25 | 6.79 | | 74.65 | 1.03 | | 1.35 | |
| | 35 | 5.72 | | 73.22 | 0.92 | | 1.2 | |
| Análisis de la varianza | | | | | | | | |
| Salinidad | | *** | | ns | *** | | *** | |
| Temperatura | | ** | | ns | *** | | *** | |
| Salinidad x Temperatura | | ns | | * | ns | | ns | |

Las medias con letras diferentes en una misma columna son significativamente diferentes según el test de rango múltiple de Tukey. *, **, ***, ns indican diferencias significativas para $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 y no significativo respectivamente.

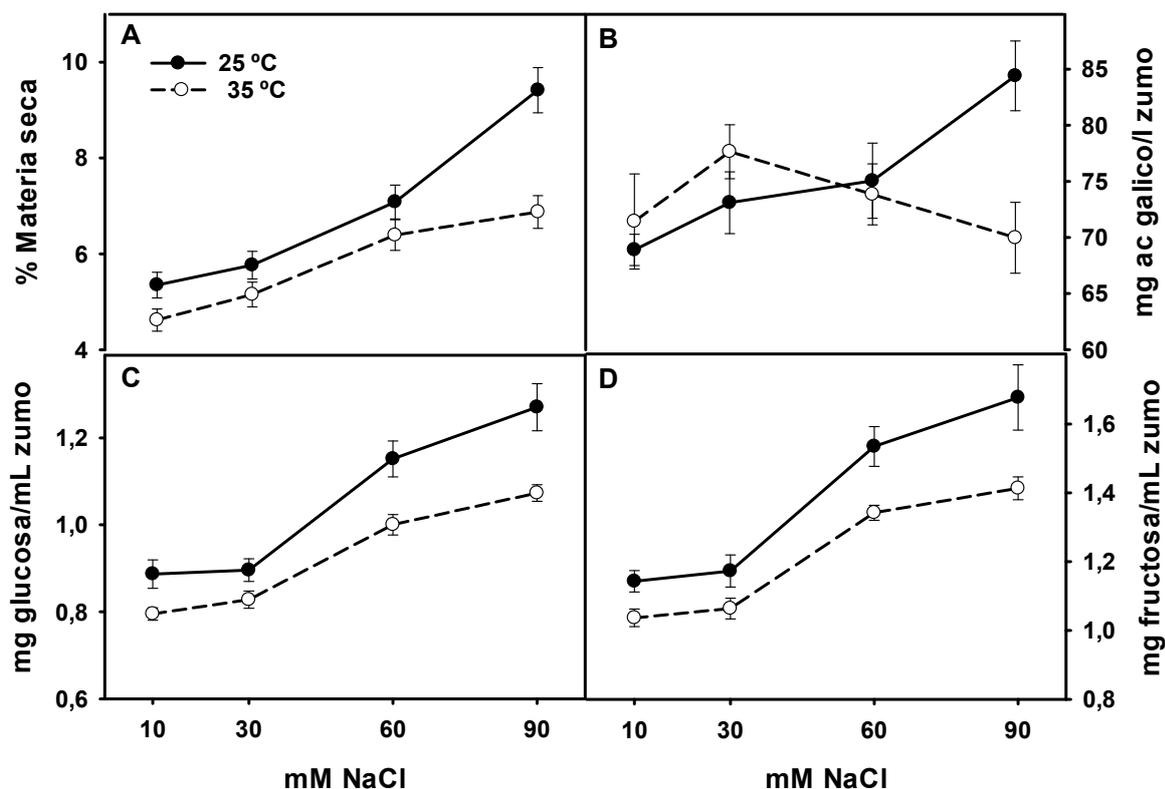


Figura 4.7. Porcentaje de materia seca (A), concentración de fenoles totales (B), concentración de glucosa (C) y concentración de fructosa (D) en el fruto al final del cultivo en respuesta a la concentración de sal y a dos temperaturas ambientales. Cada punto representa el promedio de 12 valores. La barra de error es \pm EE.

Análisis nutricional en frutos: Concentración de Na^+ , Ca^{2+} , K^+ y Mg^{2+}

En la tabla 4.8 se muestra la concentración de Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} y Na^+ en el fruto expresada como mmol/kg PS, de plantas de tomate sometidas a diferentes niveles de salinidad y a dos temperaturas ambientales diferentes. Se puede ver cómo el Ca^{2+} , K^+ y Mg^{2+} redujeron significativamente su concentración por efecto de la salinidad. Sin embargo, y como cabía esperar, la concentración de Na^+ aumentó de forma significativa con la salinidad. El incremento en la temperatura también dio lugar a un aumento significativo de la concentración de Mg^{2+} . Sin embargo, para el Ca^{2+} y el Na^+ el efecto observado fue inverso, de manera que una temperatura de 35°C dio lugar a una reducción significativa de la concentración de ambos cationes. La interacción

salinidad x temperatura no produjo efectos significativos sobre la concentración de los cationes analizados en el fruto (Figura 4.8).

Tabla 4.8. Efecto combinado de salinidad y alta temperatura sobre la **concentración de Ca^{2+} , K^+ , Na^+ y Mg^{2+}** (mmol/kg PS) en frutos.

| Efectos principales | | Ca^{2+} | K^+ | Mg^{2+} | Na^+ |
|--------------------------------|----|------------------|--------------|------------------|---------------|
| Salinidad (mM NaCl) | 10 | 215.06 a | 944.45 a | 58.57 a | 47.44 a |
| | 30 | 199.24 ab | 899.82 ab | 56.64 a | 90.72 b |
| | 60 | 194.62 bc | 843.58 bc | 55.25 a | 171.05 c |
| | 90 | 190.58 c | 797.92 c | 51.42 b | 269.68 d |
| Temperatura (°C) | 25 | 22.58 | 869.67 | 53.56 | 140.35 |
| | 35 | 20.43 | 880.56 | 57.78 | 137.87 |
| Análisis de la varianza | | | | | |
| Salinidad | | *** | *** | *** | *** |
| Temperatura | | *** | ns | *** | * |
| Salinidad x Temperatura | | ns | ns | ns | ns |

Las medias con letras diferentes en una misma columna son significativamente diferentes según el test de rango múltiple de Tukey. *, **, ***, ns indican diferencias significativas para $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 y no significativo respectivamente.

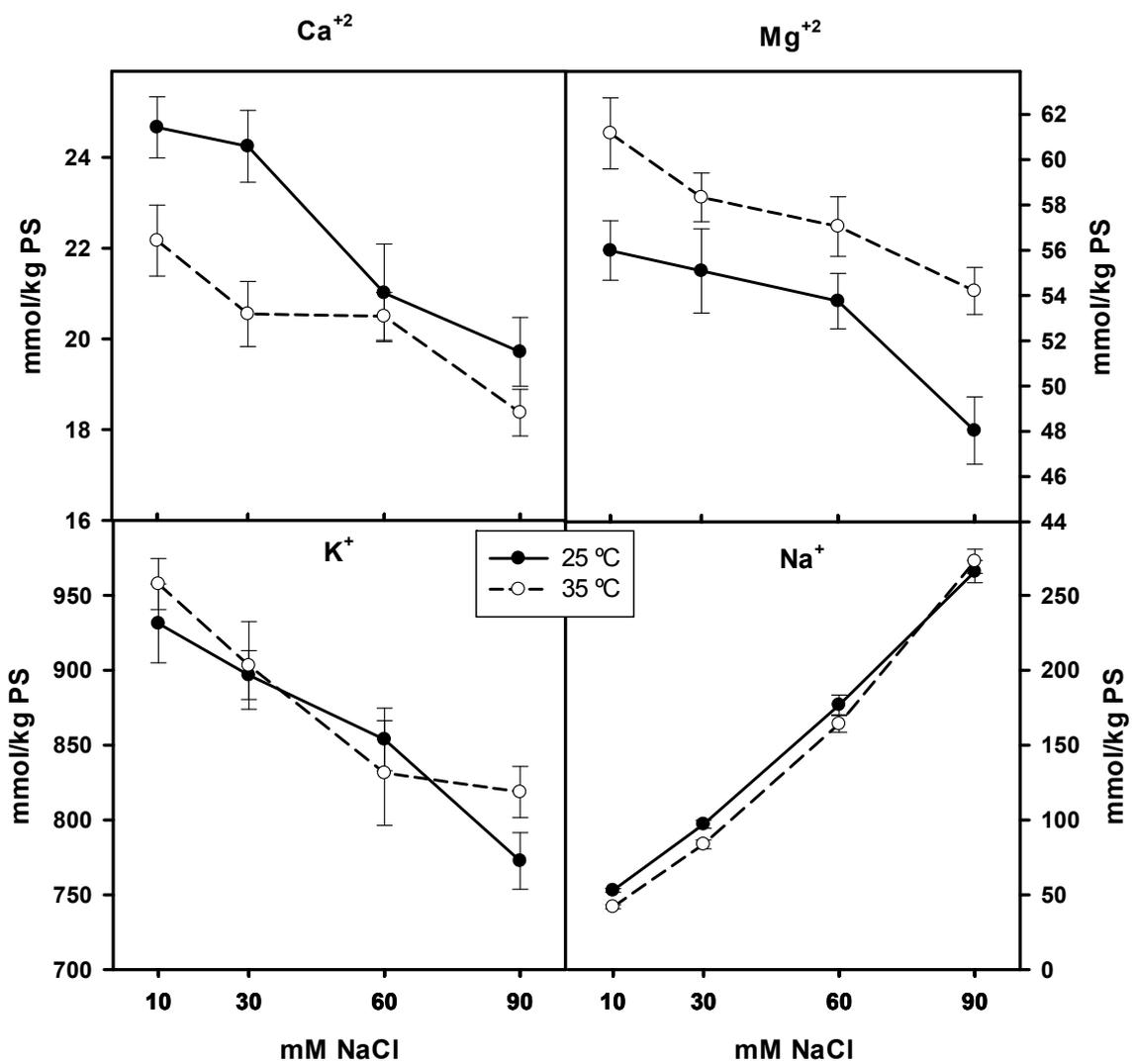


Figura 4.8. Concentración de Ca^{2+} , K^+ , Na^+ y Mg^{2+} en el fruto al final del cultivo en respuesta a la concentración de sal y a dos temperaturas ambientales. Cada punto representa el promedio de 12 valores. La barra de error es \pm EE.

4.1.2. Desarrollo de las plantas

Biomasa total

La tabla 4.9 muestra la biomasa total expresada como peso fresco y seco en plantas de tomate sometidas a diferentes niveles de salinidad y a dos temperaturas ambientales diferentes. Como se puede apreciar, tanto el PF total (kg/planta) como el PS total (g/planta), se redujeron con el incremento de la salinidad. De esta manera, el tratamiento 90 mM de NaCl dio lugar a una reducción del 48% en el PF y de un 32% del PS con respecto a las plantas control (10 mM NaCl).

Un aumento de la temperatura de 25°C a 35°C también supuso una reducción significativa tanto del PF como en PS total de las plantas (Tabla 4.9). Por otro lado, la interacción salinidad x temperatura no produjo diferencias significativas en ninguno de estos parámetros determinados (Figura 4.9).

Tabla 4.9. Efecto combinado de salinidad y alta temperatura sobre la **biomasa total** de peso fresco (PF) y de peso seco (PS).

| Efectos principales | | PF total (kg/planta) | PS total (g/planta) |
|-------------------------|----|----------------------|---------------------|
| Salinidad (mM NaCl) | 10 | 20.5 d | 1540 c |
| | 30 | 19.3 c | 1446 c |
| | 60 | 15.6 b | 1244 b |
| | 90 | 10.6 a | 1042 a |
| Temperatura (°C) | 25 | 17.3 | 1402 |
| | 35 | 16.2 | 1258 |
| Análisis de la varianza | | | |
| Salinidad | | *** | *** |
| Temperatura | | *** | *** |
| Salinidad x Temperatura | | ns | ns |

Las medias con letras diferentes indican diferencias significativas al 95% según el test de rango múltiple de Tukey. *, **, ***, ns indican diferencias significativas entre medias para $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 y no significativo, respectivamente.

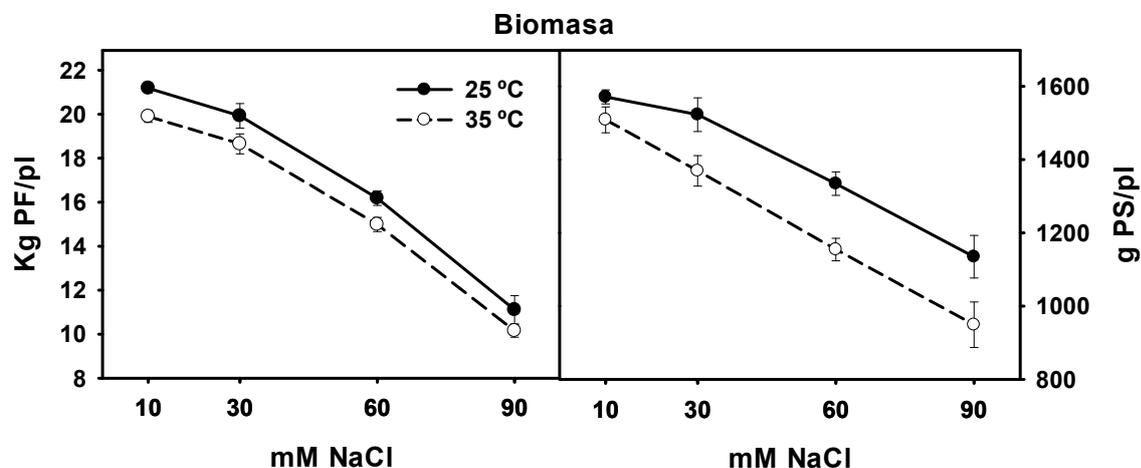


Figura 4.9. Peso fresco y peso seco al final del cultivo en respuesta a la concentración de sal y a dos temperaturas ambientales. Cada punto representa el promedio de 6 valores. La barra de error es \pm EE.

Desarrollo vegetativo

En la tabla 4.10 se muestra el PF (kg/planta) y PS (g/planta) de hojas, tallos y raíces obtenidos en plantas de tomate sometidas a diferentes niveles de salinidad y a dos temperaturas ambientales diferentes. Como se puede apreciar, tanto el PF como el PS de hojas y tallos se redujeron significativamente con el incremento de la salinidad con respecto a las plantas control (10 mM NaCl). Sin embargo, el PF y PS de raíces no sufrió variaciones significativas con los distintos tratamientos salinos (Tabla 4.10). Un aumento de la temperatura de 25°C a 35°C también supuso una reducción significativa en el PF y PS de las hojas (Tabla 4.10). Sin embargo, la temperatura no afectó significativamente ni al PF ni al PS de tallos y raíces. La interacción salinidad x temperatura tampoco produjo diferencias significativas en ninguno de estos parámetros determinados.

Tabla 4.10. Efecto combinado de salinidad y alta temperatura sobre el **desarrollo vegetativo** expresada en g/planta de PS y en kg/planta de PF.

| Efectos principales | | PF _{Hojas} | PF _{Tallo} | PF _{Raíz} | PS _{Hojas} | PS _{Tallo} | PS _{Raíz} |
|------------------------|----|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| Salinidad (mM NaCl) | 10 | 2.89b | 2.16 c | 2.79 | 427 b | 320 c | 100 |
| | 30 | 2.75 b | 1.95 bc | 2.88 | 398 ab | 273 b | 106 |
| | 60 | 2.82 b | 1.83 b | 2.85 | 363 ab | 246 b | 108 |
| | 90 | 2.03 a | 1.34 a | 2.39 | 337 a | 174 a | 94 |
| Temperatura (°C) | 25 | 2.90 | 1.84 | 2.72 | 402 | 254 | 97 |
| | 35 | 2.39 | 1.84 | 2.77 | 359 | 259 | 108 |

Análisis de la varianza

| | | | | | | |
|-------------------------|----|-----|----|-----|-----|----|
| Salinidad | ** | *** | ns | *** | *** | ns |
| Temperatura | * | ns | ns | *** | ns | ns |
| Salinidad x Temperatura | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

Las medias con letras diferentes indican diferencias significativas al 95% según el test de rango múltiple de Tukey. *, **, ***, ns indican diferencias significativas entre medias para $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 y no significativo respectivamente.

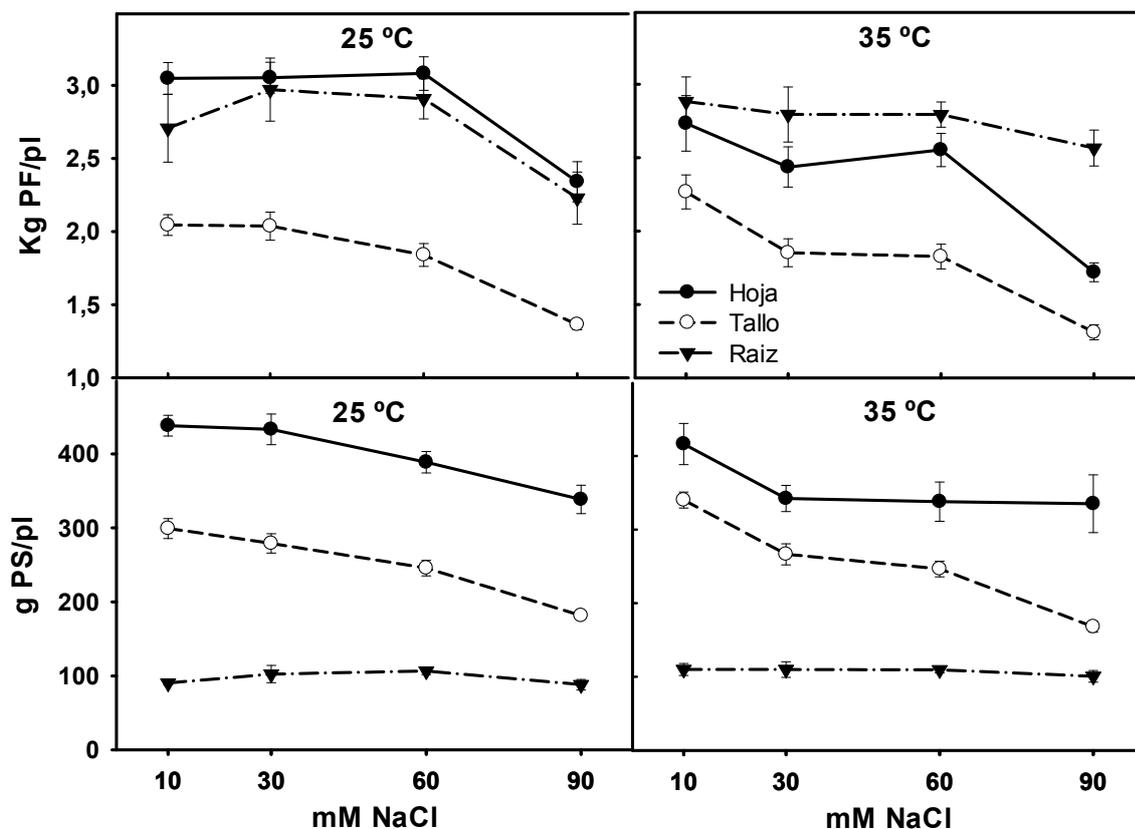


Figura 4.10. *Peso fresco (kg/planta) y peso seco (g/planta) total de hojas, tallos y raíces al final del cultivo en respuesta a la concentración de sal y a dos temperaturas ambientales. Cada punto representa el promedio de 6 valores. La barra de error es ± EE.*

Asimilación de CO₂, transpiración y conductancia estomática.

Los diferentes parámetros de intercambio gaseoso fueron cuantificados a dos tiempos de desarrollo diferentes para una misma planta. La primera determinación se hizo en el mes de marzo y justo antes de la aplicación de los diferentes tratamientos de salinidad y altas temperaturas, con el objetivo de determinar la variabilidad existente entre las diferentes plantas y entre las plantas en ambos invernaderos. Y la segunda determinación se realizó en el mes de junio, coincidiendo con el periodo intermedio de recolección de frutos, con el objetivo de evaluar las posibles diferencias que los tratamientos salinos y térmicos podrían estar causando sobre los procesos de intercambio gaseoso.

Todas las determinaciones llevadas a cabo durante el mes de marzo (antes de comenzar los tratamientos salinos y de estrés térmico) fueron similares en todas las plantas, y no se encontraron diferencias significativas entre las plantas crecidas en ambos invernaderos (Tabla 4.11).

Como podemos observar en la tabla 4.11, tras 3 meses de iniciar los diferentes tratamientos, un incremento de la salinidad dio lugar a una disminución significativa de todos los parámetros de intercambio gaseoso determinados. La tasa fotosintética no mostró diferencias significativas por efecto del aumento de temperatura (Tabla 4.11). Sin embargo, tanto la transpiración como la conductancia estomática mostraron valores mayores y estadísticamente significativos a 35°C respecto de los obtenidos a 25°C. Se observó una interacción significativa entre salinidad y temperatura sobre la transpiración y conductancia estomática. A niveles salinos bajos se observó un aumento importante de estos parámetros al aumentar la temperatura (Figura 4.11). Estas diferencias se mantuvieron al aumentar la salinidad, excepto en el tratamiento de 90 mM NaCl, donde los valores de transpiración y conductancia fueron similares.

Tabla 4.11. Efecto combinado de salinidad y alta temperatura sobre los diferentes parámetros fotosintéticos: Asimilación de CO₂ (mol CO₂ m⁻² s⁻¹), transpiración (μmol H₂O m⁻² s⁻¹) y conductancia estomática (mol H₂O m⁻² s⁻¹).

| Efectos principales | | Asimilación CO ₂ | Transpiración | Conductancia Estomática |
|-------------------------------------|----|-----------------------------|---------------|-------------------------|
| Antes de los tratamientos | | | | |
| | | 14.09 ± 0.94 | 5.36 ± 0.13 | 436.47 ± 1.15 |
| 3 meses después de los tratamientos | | | | |
| Salinidad (mM NaCl) | 10 | 15.31 a | 6.12 a | 485.1 a |
| | 30 | 14.51 a | 6.46 a | 496.9 a |
| | 60 | 12.72 b | 5.52 b | 407.9 b |
| | 90 | 9.55 c | 4.51 c | 288.5 c |
| Temperatura (°C) | 25 | 12.95 | 4.93 | 383.4 |
| | 35 | 13.70 | 6.63 | 479.8 |
| Análisis de la varianza | | | | |
| Salinidad | | *** | *** | *** |
| Temperatura | | ns | *** | *** |
| Salinidad x Temperatura | | ns | ** | * |

Las medias con letras diferentes indican diferencias significativas al 95% según el test de rango múltiple de Tukey. *, **, ***, ns indican diferencias significativas entre medias para $p < 0.05$, 0.01, 0.001 y no significativo respectivamente.

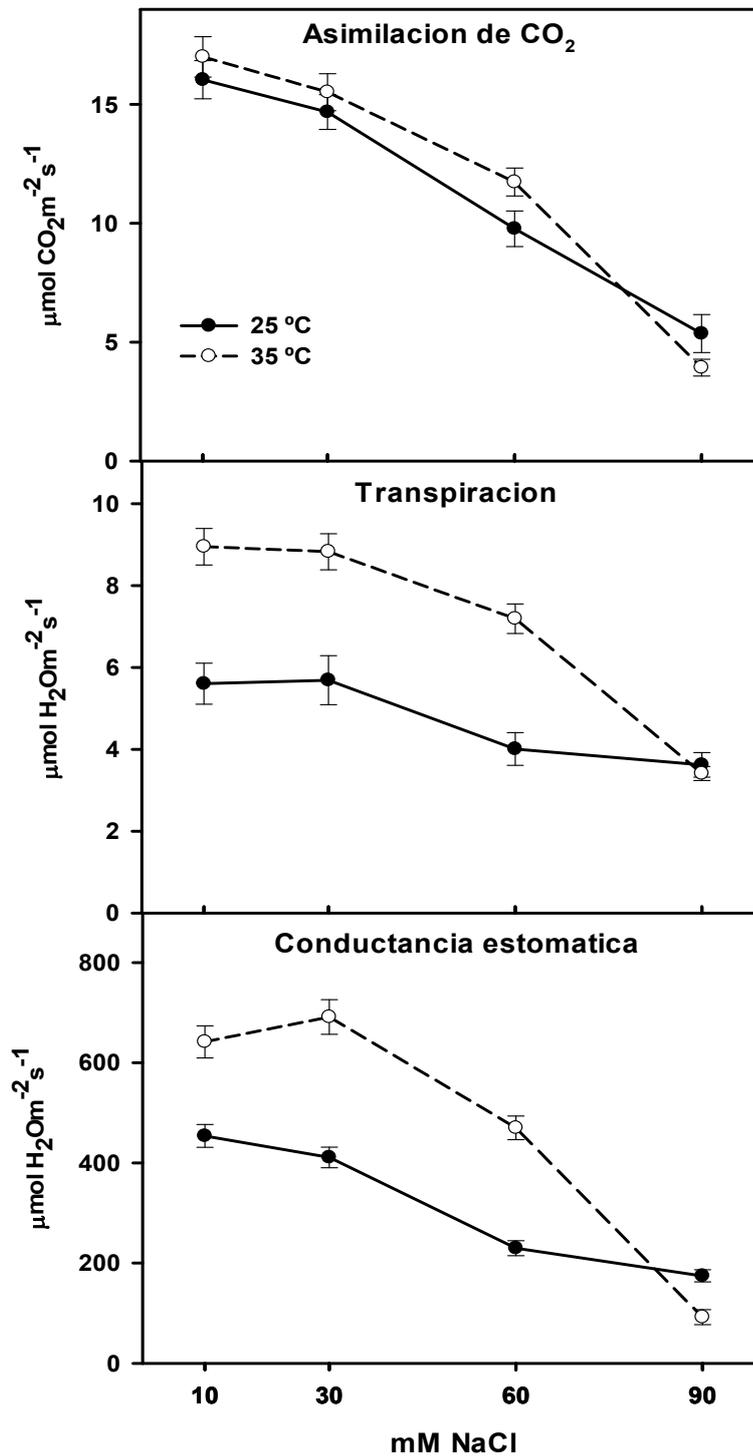


Figura 4.11. Asimilación de CO₂, transpiración y conductancia estomática en respuesta a la concentración de sal y a dos temperaturas ambientales. Cada punto representa el promedio de 6 valores. La barra de error es \pm EE.

4.1.3. Estado nutricional del cultivo

Análisis mineral de Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} y Na^+ en hoja, tallo y raíz

En la tabla 4.12 se presenta el efecto de la salinidad y las altas temperaturas sobre la concentración de Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y Na^+ expresada como mmol/kg PS, en plantas de tomate. Como se puede observar, tanto la concentración de Ca^{2+} , K^+ , y Mg^{2+} en las raíces se redujo significativamente con el incremento de la salinidad. También la concentración de Ca^{2+} y K^+ en hojas, y de Mg^{2+} en tallos se redujo significativamente con el incremento del nivel salino, sin embargo la concentración de Mg^{2+} en hojas y de Ca^{2+} en tallos no variaron significativamente. Como cabría esperar, la concentración de Na^+ aumentó significativamente con el incremento de la salinidad en todos los órganos analizados.

Un aumento de la temperatura de 25°C a 35°C también supuso una reducción significativa en la concentración de Ca^{2+} en hojas, de K^+ en hojas y tallos, y de Mg^{2+} y Na^+ en raíces (Tabla 4.12). Sin embargo, la concentración de Ca^{2+} y K^+ en raíces, de Mg^{2+} en tallos y de Na^+ en tallos aumentó de forma significativa al pasar de 25°C a 35°C. Finalmente, no se observaron diferencias significativas inducidas por el incremento de la temperatura en la concentración de Na^+ en hojas y de Ca^{2+} en tallos. (Tabla 4.12). La interacción salinidad x temperatura no dio lugar a diferencias significativas para la concentración de Ca^{2+} , K^+ y Mg^{2+} en ninguno de los órganos estudiados (Figuras 4.12 y 4.13). Sin embargo, si hubo diferencias significativas para la concentración de Na^+ en tallo y raíces. En tallos, la acumulación de Na^+ fue mayor para salinidades de 60 y 90 mM de NaCl con 35°C que con 25°C; mientras que en la raíz, las plantas cultivadas a 25°C en 60 mM de NaCl acumularon un 30% más de Na^+ que las cultivadas a 35°C (Figura 4.13).

Tabla 4.12. Efecto combinado de salinidad y alta temperatura sobre la **concentración de Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺ y Na⁺ (mmol/kg PS) en hoja, tallo y raíz.**

| Efectos principales | | Ca ²⁺ | K ⁺ | Mg ²⁺ | Na ⁺ |
|--------------------------------|----|------------------|----------------|------------------|-----------------|
| HOJA | | | | | |
| Salinidad (mM NaCl) | 10 | 1522,87 a | 349,18 a | 258,13 b | 171,19 a |
| | 30 | 1473,78 a | 247,20 b | 246,72 ab | 369,46 b |
| | 60 | 1409,50 a | 206,06 b | 231,12 ab | 753,93 c |
| | 90 | 1244,75 b | 207,81 b | 216,95 a | 1362,09 d |
| Temperatura (°C) | 25 | 1580,65 | 273,24 | 236,76 | 613,46 |
| | 35 | 1259,41 | 235,78 | 241,55 | 654,19 |
| Análisis de la varianza | | | | | |
| Salinidad | | *** | * | ns | *** |
| Temperatura | | *** | *** | * | ns |
| Salinidad x Temperatura | | ns | ns | ns | ns |
| TALLO | | | | | |
| Salinidad (mM NaCl) | 10 | 543,26 | 768,81 a | 199,16 b | 183,08 a |
| | 30 | 520,76 | 640,95 b | 196,81 ab | 415,45 b |
| | 60 | 506,21 | 484,31 c | 192,15 a | 762,40 c |
| | 90 | 476,70 | 416,69 d | 171,53 a | 1174,11 d |
| Temperatura (°C) | 25 | 502,13 | 608,75 | 178,94 | 552,79 |
| | 35 | 524,39 | 560,63 | 202,48 | 667,74 |
| Análisis de la varianza | | | | | |
| Salinidad | | ns | *** | * | *** |
| Temperatura | | ns | *** | *** | *** |
| Salinidad x Temperatura | | ns | ns | ns | * |
| RAIZ | | | | | |
| Salinidad (mM NaCl) | 10 | 215,06 a | 1538,73 a | 114,24 a | 276,00 a |
| | 30 | 199,24 ab | 1494,28 ab | 103,28 ab | 430,48 b |
| | 60 | 194,62 ab | 1369,59 b | 99,05 ab | 728,46 c |
| | 90 | 190,58 b | 1162,24 b | 92,31 b | 909,63 d |
| Temperatura (°C) | 25 | 167,27 | 1268,29 | 109,97 | 622,41 |
| | 35 | 233,28 | 1534,04 | 95,33 | 521,75 |
| Análisis de la varianza | | | | | |
| Salinidad | | *** | ** | * | *** |
| Temperatura | | * | * | *** | *** |
| Salinidad x Temperatura | | ns | ns | ns | *** |

Las medias con letras diferentes en una misma columna son significativamente diferentes según el test de rango múltiple de Tukey. *, **, ***, ns indican diferencias significativas para $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 y no significativo respectivamente.

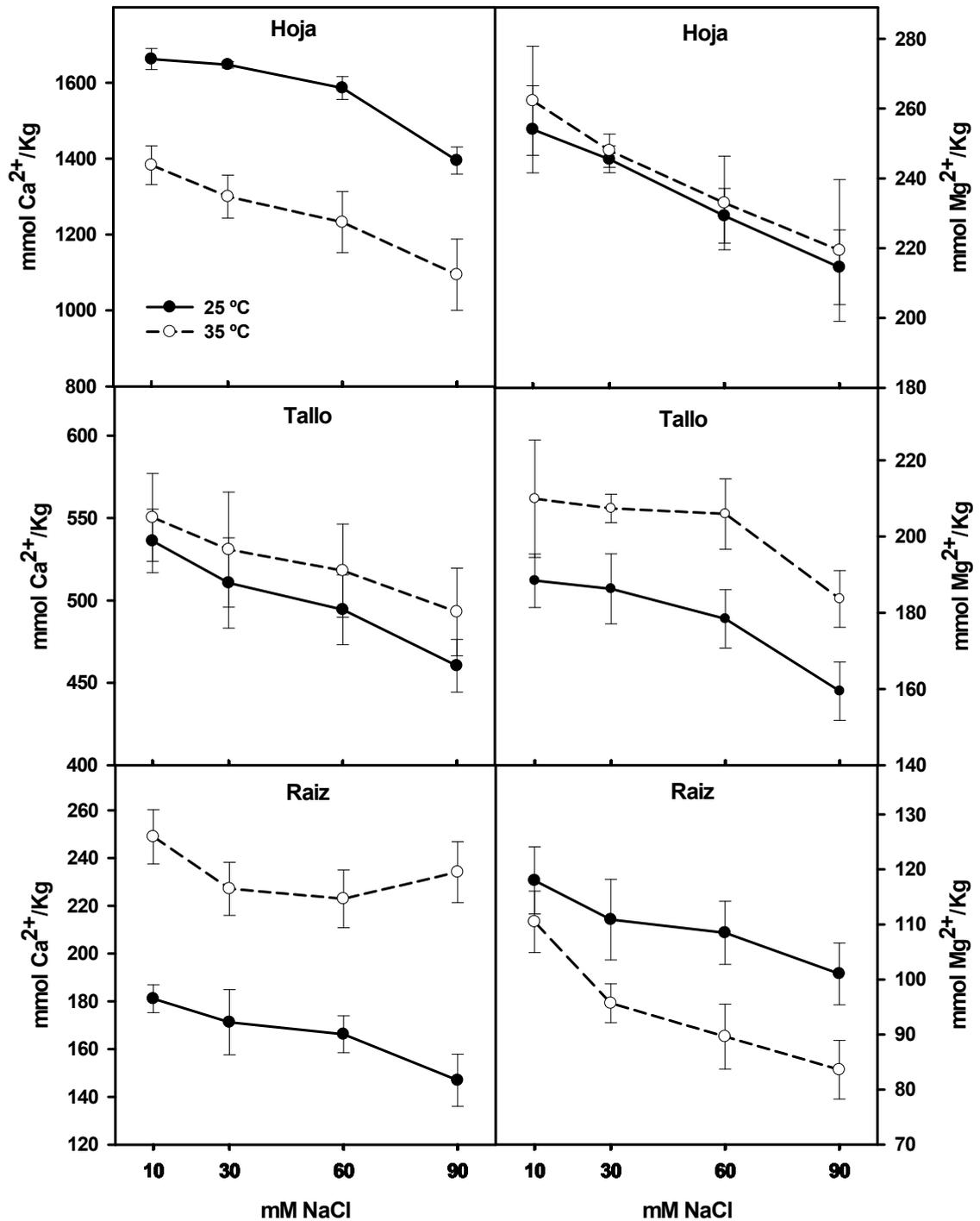


Figura 4.12. Concentración de Ca²⁺ y Mg²⁺ en hoja, tallo y raíz al final del cultivo en respuesta a la concentración de sal y a dos temperaturas ambientales. Cada punto representa el promedio de 6 valores. La barra de error es \pm EE.

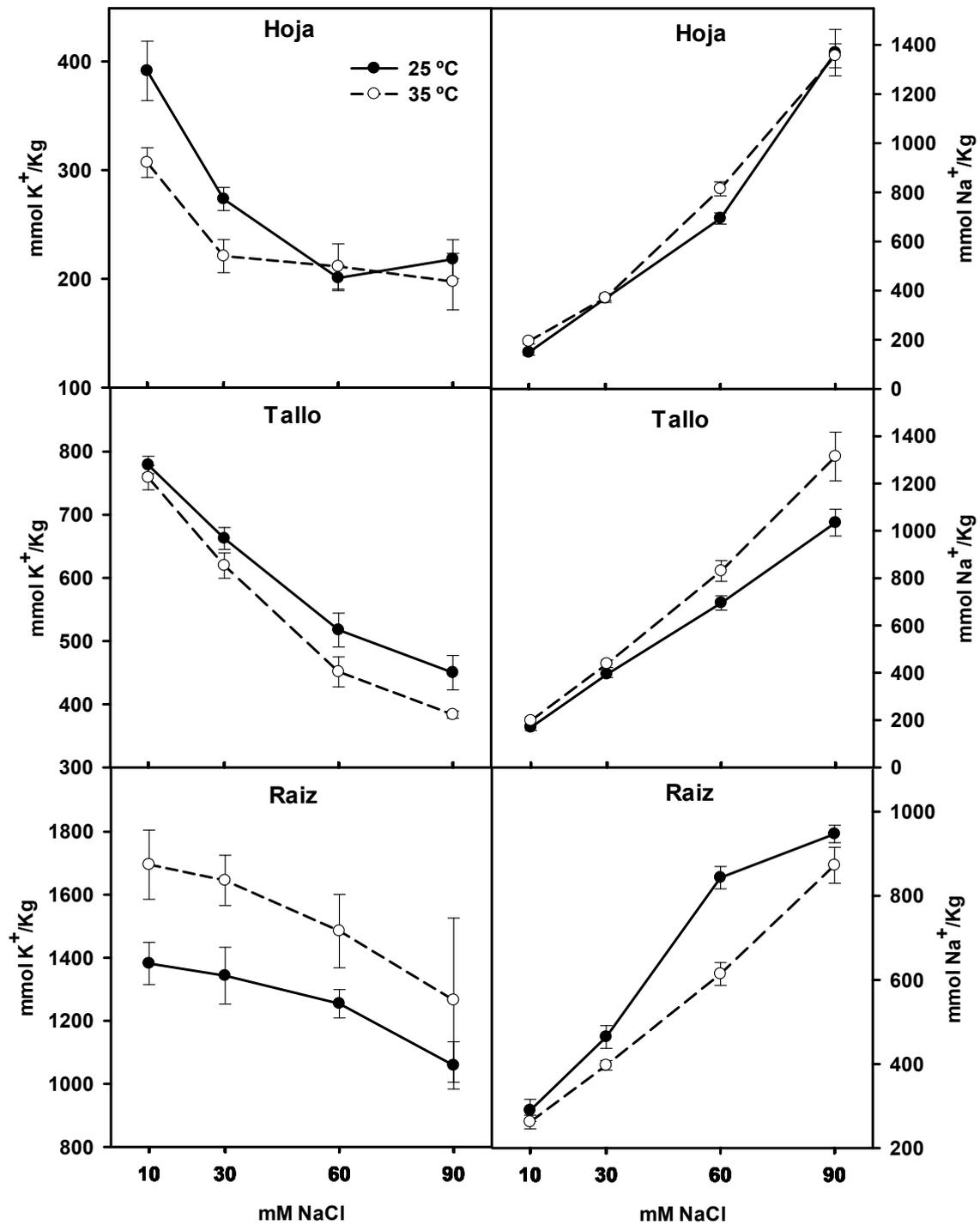


Figura 4.13. Concentración de K⁺ y Na⁺ en hoja, tallo y raíz al final del cultivo en respuesta a la concentración de sal y a dos temperaturas ambientales. Cada punto representa el promedio de 6 valores. La barra de error es ± EE.

Análisis mineral de Cl⁻ en hoja, tallo y raíz

La tabla 4.13 representa la concentración de Cl⁻ expresada como mmol/kg PS, en plantas de tomate sometidas a diferentes niveles de salinidad y a dos temperaturas ambientales diferentes. Como se puede observar, la concentración de Cl⁻ aumentó significativamente con el incremento de la salinidad, tanto en hojas, como en tallos y en raíces con respecto a las plantas control. Un aumento de la temperatura de 25°C a 35°C también supuso un aumento significativo en la concentración de Cl⁻ en hojas y tallos (Tabla 4.13).

La interacción salinidad x temperatura no dio lugar a diferencias significativas para la concentración de Cl⁻ en hojas, tallos y raíces (Tabla 4.13 y Figura 4.14).

Tabla 4.13. Efecto combinado de salinidad y alta temperatura sobre la **concentración de Cl⁻** (mmol/kg PS) en hoja, tallo y raíz.

| Efectos principales | | Hoja | Tallo | Raíz |
|-------------------------|----|--------|--------|--------|
| Salinidad (mM NaCl) | 10 | 442 a | 575 a | 499 a |
| | 30 | 805 b | 934 b | 646 b |
| | 60 | 1553 c | 1462 c | 965 c |
| | 90 | 2708 d | 2020 d | 1038 d |
| Temperatura (°C) | 25 | 1236 | 1147 | 749 |
| | 35 | 1402 | 1281 | 803 |
| Análisis de la varianza | | | | |
| Salinidad | | *** | *** | *** |
| Temperatura | | * | ** | ns |
| Salinidad x Temperatura | | ns | ns | ns |

Las medias con letras diferentes en una misma columna son significativamente diferentes según el test de rango múltiple de Tukey. *, **, ***, ns indican diferencias significativas para $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 y no significativo respectivamente.

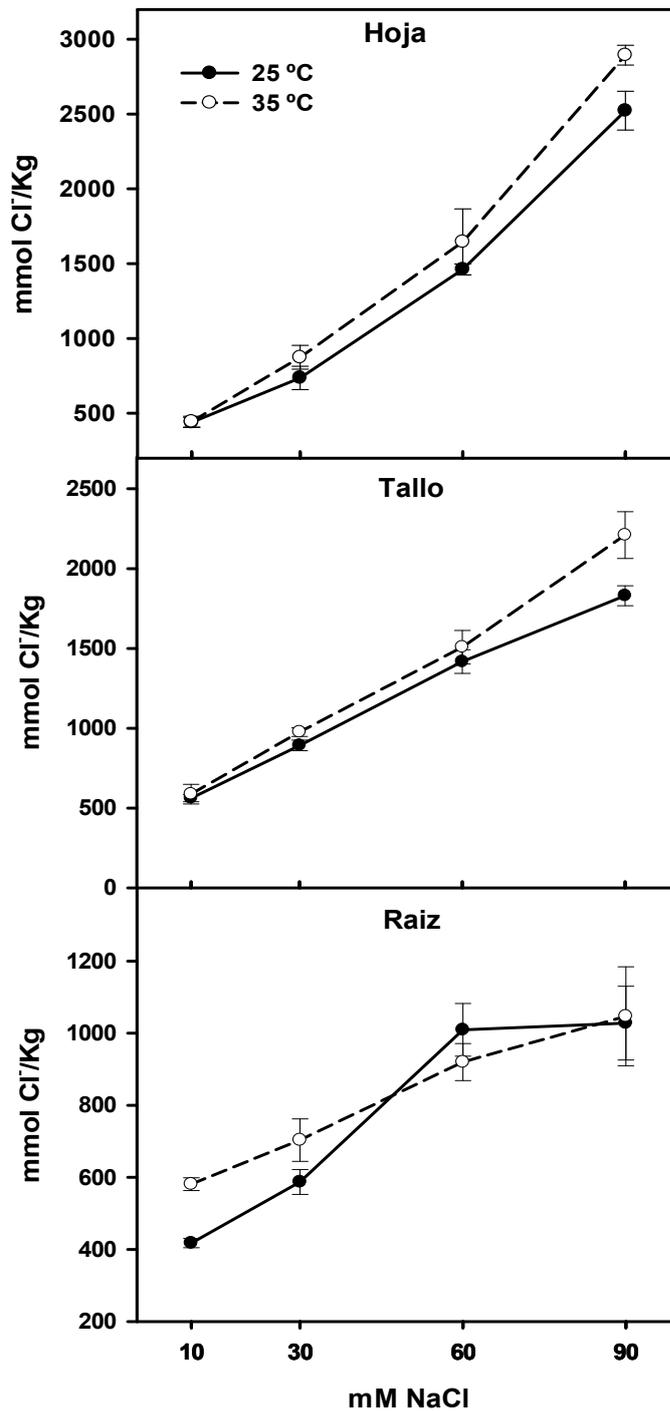


Figura 4.14. Concentración de Cl⁻ en hoja, tallo y raíz al final del cultivo en respuesta a la concentración de sal y a dos temperaturas ambientales. Cada punto representa el promedio de 6 valores. La barra de error es ± EE.

4.1.4. Discusión

Es bien conocido que la salinidad afecta negativamente al crecimiento de las plantas y a la producción de los cultivos (Cuartero y Fernandez-Munoz, 1999). Normalmente este problema se da en áreas con escasa pluviometría y que se caracterizan por tener un clima semiárido, como sucede en el sudeste español. En estas áreas, a veces, el problema de la salinidad viene aumentado por las altas temperaturas que tienen que soportar los cultivos durante su desarrollo. Sin embargo, son muy escasos los trabajos donde se ha estudiado la respuesta de las plantas a la combinación de dos estreses, o dicho de otra manera, sobre el estudio de si un incremento de la temperatura podría cambiar la respuesta de las plantas a la salinidad. Los resultados vistos anteriormente apuntan a la idea de que la respuesta de tomate a la salinidad puede variar con la temperatura y esta depende de la variable estudiada.

Desde el punto de vista agronómico, el parámetro más importante en el cultivo de tomate es la productividad del mismo, la cual está muy relacionada con el rendimiento y la calidad del fruto. Estos dos parámetros son los que definirán el valor comercial del cultivo.

En este experimento se observa claramente una reducción significativa del rendimiento comercial (Tabla 4.1). Sin embargo la respuesta en el rendimiento al aumentar la concentración salina en el medio de cultivo fue similar para las dos temperaturas ensayadas. La reducción en el rendimiento debido al aumento de la salinidad se debió de manera similar tanto a la reducción del tamaño de los frutos, como a la reducción en el número de frutos. Salinidades altas suelen afectar negativamente tanto al tamaño como al número de frutos, mientras que salinidades moderadas suelen afectar de forma más acusada al tamaño de los frutos, como resultado principalmente del descenso producido en la absorción de agua bajo estas condiciones (Mitchell y col., 1991). La reducción de la producción por el aumento de temperatura se debió principalmente a la reducción en el número de frutos. Hazra y Ansary (2008), mostraron que las altas temperaturas afectan considerablemente a la fase de cuajado de fruto de tomate, lo que podría afectar directamente al número de frutos totales de una planta.

Cuando se representa el rendimiento por racimo en función de los tratamientos (Figura 4.2), podemos ver que los máximos rendimientos se obtuvieron en los

primeros racimos y este fue decayendo conforme aumentaba el desarrollo del cultivo. Este decaimiento en la producción por racimo ya ha sido descrito por otros autores (Nuez, 1995); estos autores observaron que a partir del cuarto racimo se produce un notable descenso del porcentaje del cuajado, lo que era atribuido a la carga fisiológica de la planta. De acuerdo con estos resultados y con el fin de mejorar el rendimiento comercial en condiciones de salinidad y altas temperaturas, deberíamos centrarnos en los primeros racimos, ya que fue en esta etapa inicial del desarrollo donde se observaron las máximas diferencias entre los tratamientos salinos, tanto a 25°C como a 35°C.

De los resultados observados en la tabla 4.2, donde se observa una reducción de las categorías de tomate “extra” y de “primera” categoría producida por el aumento de la salinidad y el aumento de la temperatura, podríamos deducir que esto fue debido al efecto que estos dos factores tuvieron sobre el tamaño y el número de frutos, tal y como se ha discutido anteriormente.

En relación al rendimiento total, donde se incluye frutos comerciales y no comerciales, podemos observar que se produce una interacción significativa entre salinidad y temperatura sobre el número de frutos y el tamaño de los mismos, que al fin y al cabo son los parámetros que definen la producción total del cultivo (Tabla 4.3). Las dosis salinas y la temperatura utilizadas en nuestros experimentos dieron lugar a una proporción de tomates afectados por ciertas fisiopatías. Esto hizo aumentar la proporción de frutos no comerciales, a la vez que se disminuía el rendimiento total de las plantas. Algunos autores relacionaron el descenso de la producción comercial y el aumento de frutos con BER con el incremento de la salinidad en el medio (Martinez y col., 1987; Cuartero y Fernandez-Munoz, 1999). Plantas de tomate sometidas a altas temperaturas disminuyeron el peso fresco y el porcentaje de cuajado (Abdelmageed y Gruda, 2009) y aumentaron la incidencia del rajado en frutos de tomate (Dorais y col., 2004).

Dentro de las fisiopatías relacionadas con los estreses abióticos, la podredumbre apical (BER) y el rajado del tomate son dos de las más importantes a nivel mundial debido a las pérdidas económicas que generan. Ambas están relacionados con el transporte de agua al fruto (Bertin y col., 2000) y con desordenes nutricionales asociados a estos estreses. Los datos de este experimento muestran claramente una

interacción significativa entre salinidad y temperatura sobre el BER y el rajado en frutos de tomate (Tabla 4.4 y Figura 4.4). A baja temperatura la salinidad claramente aumentó la incidencia del BER, sin embargo este efecto no se observó cuando las plantas crecieron a 35°C. Esto fue debido a que las altas temperaturas tuvieron un efecto importante en el aumento del BER, sobre todo cuando la concentración salina fue baja o moderada. El BER se da cuando coincide una alta tasa de crecimiento con una disminución en el suministro de Ca^{2+} al fruto (Ehret y Ho, 1986; Ho y Adams, 1994; Ho y White, 2005). Normalmente esta circunstancia se da en condiciones de alta transpiración o muy baja transpiración, y está relacionado con las altas temperaturas o la dificultad para absorber y transportar agua por la planta (elevado potencial osmótico en la rizosfera). Una rápida expansión del fruto puede potencialmente diluir el contenido de Ca^{2+} en el mismo e incrementar la susceptibilidad a los desórdenes provocados por la deficiencia de este catión (Dekock y col., 1982; Bertin y col., 2000). Estudios previos han sugerido que dichos desórdenes pueden ser inducidos rápidamente en la parte distal de los frutos cuando la demanda de Ca^{2+} excede al abastecimiento de este catión vía xilema (Ho y col., 1993; Ho y White, 2005).

El aumento de la temperatura tuvo un claro efecto sobre el rajado de los frutos de tomate, aunque este efecto variaba con el nivel salino. A temperaturas más bajas el aumento de la salinidad disminuía la incidencia del rajado posiblemente debido a la dificultad de absorber agua del medio. Elevadas temperaturas ambientales pueden causar el rajado del tomate (Peet, 1992). Se ha visto que en cultivos de invernadero existe una correlación positiva entre el rajado de los frutos y las horas de máxima temperatura (Peet, 1992). Elevadas temperaturas en general, y repentinas subidas de temperaturas a la mitad de la tarde en particular, dan lugar a un rajado de los tomates ya rojos que están listos para ser cosechados (Frazier y Bowers, 1947). Esto era debido a que un aumento de la temperatura incrementaba la presión ejercida por la pulpa sobre la piel y a la vez dicho aumento de temperatura daba lugar a una bajada de la rigidez y resistencia de la piel, aumentando la incidencia del rajado (Lang y Daring, 1990), lo que explicaría que en nuestros experimentos una temperatura de 35°C aumentara el número de frutos rajados frente a 25°C.

El tomate es la segunda hortaliza más importante en el mundo después de la patata y es producido en 144 países de todo el mundo (<http://faostat.fao.org>), debido al papel fundamental que juega en la dieta y la nutrición humana (Atkinson y col., 2011).

Los atributos de calidad más importantes a tener en cuenta a la hora de procesar los tomates cosechados son los sólidos solubles, el pH, la acidez valorable, la viscosidad y el color (Saltveit, 2005). Comúnmente, uno de los parámetros que más influye en el sabor del tomate es el índice de refracción o °Brix, que estima la cantidad de sólidos solubles totales contenidos en un fruto. Aproximadamente la mitad de los sólidos solubles son azúcares reductores, mayoritariamente fructosa y glucosa (Nielsen, 1998). El resto de sólidos solubles están constituidos por ácidos orgánicos (cítrico y málico), amino ácidos, proteínas, lípidos, minerales, sustancias pécticas, celulosa y hemicelulosa (Barringer, 2004). Generalmente, el pH del zumo de tomate está entre 3.9 y 4.9 y depende de su contenido en ácidos orgánicos, siendo el ácido cítrico el más importante. Dado que el sabor del tomate depende directamente de la proporción de sólidos solubles contenidos en éste, la concentración de glucosa y fructosa así como su pH y acidez valorable son parámetros esenciales a tener en cuenta para evaluar la calidad de los mismos.

En nuestros experimentos, tanto los °Brix, como la concentración de glucosa y fructosa, así como la CE y la acidez valorable del zumo se incrementaron significativamente con el aumento de la salinidad (Tabla 4.6), tal y como indicaron anteriormente otros autores (Flores y col., 2003; Saltveit, 2005; Zushi y Matsuzoe, 2011; Cliff y col., 2012); mientras que la firmeza del fruto se vió reducida considerablemente con los tratamientos salinos (Tabla 4.6). Por otro lado, se observó que los tomates crecidos a 35°C poseían una menor firmeza. Además el porcentaje de materia seca, °Brix, y concentración de glucosa y fructosa eran menores que los encontrados a 25°C. El pH del zumo se modificó ligeramente, aunque dicha modificación no puede considerarse fisiológicamente importante, por lo que dicho dato no será discutido. En definitiva, podríamos decir, que un aumento de salinidad daba lugar a tomates de mejor calidad y un aumento en la temperatura dio lugar a frutos de menos calidad que aquellos desarrollados a 25°C. Ni la salinidad ni la temperatura daban lugar a diferencias significativas en el color de los frutos (Tabla 4.5); esto pudo ser debido a que todos los tomates eran cosechados en el mismo grado de madurez.

Macnish y col. (1997) atribuían la pérdida de dureza de la piel del tomate a la rotura enzimática de las sustancias pécticas de la epidermis. Aunque las enzimas responsables del ablandamiento de la piel del fruto no fueron determinadas en este experimento, Miller y col. (1987) y Marangoni y col. (1995) observaron elevados

niveles de pectilmetil esterasa (PME) en tomates sometidos a estrés salino y térmico. Otros investigadores (Auerswald y col., 1999; Fabre y col., 2011) han sugerido en sus trabajos que los cambios inducidos en la textura por incrementos en la CE de la solución nutritiva eran dependientes del cultivar utilizado en los ensayos. Por último, y tal y como indicaba Bolarin y col. (1993), tomates menos firmes también pueden ser consecuencia de la incapacidad de las células epidérmicas para mantener el turgor necesario.

El contenido de materia seca de los frutos está inversamente relacionado con el tamaño del fruto y directamente relacionado con el contenido total de azúcares del mismo (Ho, 1996). Tal y como muestran nuestros resultados, la salinidad aumentó el contenido de materia seca y la temperatura lo disminuyó significativamente (Tabla 4.7). Alrededor del 60-65% de materia seca del fruto corresponde a azúcares, principalmente glucosa y fructosa, y ácidos orgánicos, como ácido málico y ácido cítrico. Todos ellos tienen una gran influencia sobre el sabor final del fruto, y por tanto deben ser considerados dentro de los parámetros de calidad de los mismos (Debruyn y Kooistra, 1971; Salunkhe y col., 1974; Davies y Hobson, 1981; Stevens, 1986). Más del 80% de la cantidad de agua que penetra en un fruto es vía floema. Cuando el agua de riego utilizada es salina, se promueve un enriquecimiento en materia seca en el fruto (más azúcares y ácidos orgánicos); sin embargo, la producción puede verse seriamente mermada ya que la salinidad induce una baja acumulación de agua, inhibiéndose de esta manera la elongación celular y reduciéndose considerablemente el tamaño de los frutos.

De entre los compuestos más beneficiosos para la salud contenidos en el tomate destacan los carotenoides, los flavonoides y otros compuestos fenólicos importantes por su actividad antioxidante (Hertog y col., 1993; Nijveldt y col., 1996; Sawa y col., 1999; Rao y Agarwal, 2000; Bassoli y col., 2008; Marin y col., 2009). Los compuestos fenólicos son metabolitos ricos en carbono y representan el grupo más abundante de compuestos secundarios en plantas. Por ejemplo, son unos excelentes antioxidantes y en situaciones de estrés abiótico, pueden contribuir a la detoxificación de radicales libres y otras ROS (Dicko y col., 2005). Además, nutricionalmente hablando, son compuestos muy importantes, ya que tienen la capacidad de proteger frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades relacionadas con la edad en humanos (Hertog y col., 1993; Nijveldt y col., 1996). Por lo tanto, son otro indicador

importante a tener en cuenta a la hora de valorar la calidad de un fruto. Las plantas son capaces de sintetizar y acumular compuestos fenólicos en respuesta a estreses abióticos (EnglishLoeb y col., 1997), bióticos (Treutter, 2006) y como parte de los procesos de lignificación (Hammerschmidt y Nicholson, 1992). La concentración de fenoles totales encontrados en nuestros experimentos fue diferente dependiendo del tratamiento aplicado. Al aumentar la salinidad a 25°C, la concentración de fenoles aumentaba significativamente. Por el contrario a partir de 30 mM NaCl, un aumento de la salinidad a 35°C produjo un descenso en la concentración de fenoles (Figura 4.7 B).

Según indicaron Borghesi y col. (2011), un incremento en la salinidad de la solución de riego en plantas de tomate resultaba en un aumento de la concentración de compuestos fenólicos. Por otro lado, y contrariamente a lo publicado anteriormente por otros autores (Rivero y col., 2001; Shen y col., 2007), el descenso en la concentración de compuestos fenólicos observado en tomates desarrollados a elevada temperatura y con los tratamientos salinos más elevados, pudo ser debido a un efecto inhibitorio de la temperatura sobre las enzimas de síntesis de los mismos, bien a nivel de transcripción o por modificaciones post-transcripcionales de la proteína debidas a las altas temperaturas, como ya indicaran LoizaVelarde y col. (1997).

La nutrición juega un papel fundamental tanto en el rendimiento del cultivo como en la calidad de los frutos. Es bien conocido que un aporte adecuado de K^+ aumenta la acidez valorable en frutos de tomate (Davies y Winsor, 1967; Adams y col., 1978; Davies y Hobson, 1981) y de esta manera se mejora considerablemente el sabor de los mismos. Además, una deficiencia de K^+ está asociada a desórdenes en la maduración de los frutos (Adams y Kloepper, 2002). Los niveles de K^+ en fruto encontrados en nuestro experimento disminuían con el aumento de la salinidad y no fueron afectados ni por un aumento de la temperatura ni por la combinación de ambos estreses abióticos (Tabla 4.8). Este descenso en la concentración de K^+ en fruto debida a la salinidad podría estar relacionada con la disminución de la calidad de los mismos, produciendo una mayor incidencia en el rajado (Huang y Snapp, 2004). Los niveles de Ca^{+2} y Mg^{+2} también se vieron reducidos por el incremento de la salinidad en la solución. Sin embargo la temperatura redujo el Ca^{+2} y aumentó la concentración de Mg^{+2} (Tabla 4.8). El Ca^{+2} , como se ha indicado ya anteriormente, juega un papel fundamental en la calidad de los frutos, debido fundamentalmente a su implicación en la aparición de desórdenes nutricionales, como BER (Mestre y col., 2012). Así, un

incremento en la nutrición cálcica podría ayudar considerablemente a disminuir estos desórdenes fisiológicos observados en los frutos (Lichter y col., 2002). Por otro lado, si el Mg^{+2} se encuentra en concentraciones deficientes, el tamaño de los frutos puede verse drásticamente mermado. Sin embargo, si se aumenta la concentración de Mg^{+2} por encima de las dosis recomendadas, pero sin llegar a los niveles de toxicidad, se podría incrementar la incidencia de BER, ya que este nutriente es capaz de desplazar al Ca^{+2} , a menos que éste último sea aportado también en dosis superiores (Carvajal y col., 1999; Hao y Papadopoulos, 2004). Nuestros resultados muestran que un aumento de la salinidad disminuye la concentración de Ca^{+2} y Mg^{+2} en el fruto, lo que podría explicar el aumento en número de frutos no comerciales y el aumento en los mismos de rajado y BER. Además, a 35°C la concentración de Ca^{+2} fue menor y la de Mg^{+2} mayor que en frutos desarrollados a 25°C (Figura 4.8), lo que podría explicar que a 35°C el Mg^{+2} desplaza con mayor facilidad al Ca^{+2} y además explicaría también el aumento de frutos rajados y con BER contabilizados a esta temperatura con respecto a 25°C. Finalmente, la presencia de iones divalentes, tales como el Ca^{+2} y el Mg^{+2} suelen ser buenos indicadores de la firmeza interna, es decir, de la pulpa del tomate, ya que son iones que participan directamente de las uniones pécticas, lo que apoyaría también nuestros resultados.

Una de las principales consecuencias de la exposición de las plantas a un estrés por salinidad o a una temperatura superior a la considerada óptima para el desarrollo de un cultivo es la reducción de su crecimiento vegetativo (Parida y Das, 2005), lo que conlleva finalmente a pérdidas importantes de producción. De esta manera, uno de los indicadores más usados mundialmente para definir tolerancia a salinidad o a altas temperaturas es la producción de biomasa (Juan y col., 2005). Nuestros resultados muestran que ambos estreses aplicados por separado dieron lugar a una reducción importante en la producción de biomasa, observándose sobre todo una reducción en producción de frutos. Si nos centramos en la biomasa foliar, de tallos y de raíces, se observa sobretodo una reducción en la biomasa foliar (tanto por salinidad como por aumento de temperatura) y de tallos (observada únicamente con los tratamientos salinos) (Tabla 4.10). Son muchos los trabajos que tratan individualmente los efectos que diferentes dosis salinas (Martinez y col., 1987; Flores y col., 2001; Fernandez-Garcia y col., 2004; Bartels y Sunkar, 2005) o un aumento en la temperatura (Wahid y col., 2007; Abdelmageed y Gruda, 2009) tienen sobre la producción de biomasa.

Ambos estreses aplicados individualmente disminuyen el crecimiento de nuestras plantas debido fundamentalmente a una reducción de la tasa fotosintética, ya sea debido al cierre estomático causado por la reducción en el contenido hídrico celular, por la reducción del transporte de asimilados que inhibiría la fotosíntesis por una acumulación de sustrato (Hare y col., 1998), o por una inhibición de las reacciones bioquímicas de la fotosíntesis debida a la temperatura, como son una inhibición de la RuBisCO, de los complejos del oxígeno, un cambio en la ultraestructura de los cloroplastos, de las membranas tilacoidales o una inhibición de los centros de reacción del PSII (Havaux, 1993; Allakhverdiev y col., 2003; Wang y col., 2009; Cheng y col., 2012). Nuestros resultados indican que efectivamente, dosis salinas de 60 y 90 mM de NaCl dieron lugar a una inhibición importante de la asimilación de CO₂, tanto a 25°C como a 35°C (Figura 4.11). Contrariamente, a 35°C la transpiración de las plantas fue mayor que a 25°C en casi todos los tratamientos salinos debido a una mayor apertura de los estomas, excepto a 90 mM, donde todos los parámetros sufrieron una fuerte inhibición. Cabría destacar que aunque en el tratamiento 60 mM de NaCl a 35°C, las plantas tuvieron una mayor transpiración y una mayor conductancia estomática con respecto a las plantas a 10 mM NaCl, la asimilación de CO₂ no se vio afectada por la temperatura y únicamente la salinidad tuvo un efecto negativo sobre este parámetro. Esto nos lleva a pensar que la asimilación de CO₂ no estuvo condicionada por factores físicos (es decir, estomáticos), sino que más bien sufrió una inhibición a nivel bioquímico debida a la salinidad, tal y como ya indicaron otros investigadores (Havaux, 1993; Hare y col., 1998; Allakhverdiev y col., 2003; Wang y col., 2009; Cheng y col., 2012). En cualquier caso, podríamos concluir que la reducción de biomasa observada en cada uno de los tratamientos anteriormente descritos fue debida, al menos en parte, a una inhibición de la asimilación de CO₂.

Finalmente, cabría esperar, que al combinar salinidad con altas temperaturas, la reducción en biomasa fuese más drástica que la observada con cada estrés abiótico por separado, como ya publicó Johnson y col. (1992). Existen numerosos trabajos que nos muestran como cultivos que tienen que desarrollarse bajo condiciones de salinidad o de altas temperaturas muestran a menudo un desequilibrio nutricional, debido a una inhibición directa de la absorción de nutrientes, o a un desajuste por competición directa en la absorción de unos nutrientes con otros (Cakmak, 2005). Uno de los efectos tóxicos más conocidos derivados de un estrés salino y que afecta

directamente a la productividad es la acumulación de iones Na^+ y Cl^- en la hoja (Ashraf y Harris, 2004). La acumulación de esos iones puede alterar el balance iónico general dando lugar a un desequilibrio iónico debido al bloqueo de la absorción de otros iones como el K^+ , Ca^{+2} y Mg^{+2} , y provocando síntomas visuales de deficiencia de estos últimos (Blasco y col., 2013). Nuestros resultados muestran que bajo condiciones de salinidad, las concentraciones de los iones Na^+ y Cl^- aumentaron con el incremento en la dosis salina empleada (Tablas 4.12 y 4.13). En el caso del Na^+ , la acumulación de este ión no se vio afectada por la temperatura ambiental utilizada. Sin embargo, la acumulación de Cl^- sí que fue mayor con 35°C . Está bastante asumido y demostrado que un exceso de Na^+ es uno de los principales responsables de la reducción de crecimiento y productividad observadas en aquellas plantas que crecen bajo condiciones de salinidad (Kingsbury y Epstein, 1986; Lin y Kao, 2001; Tsai y col., 2004; Hong y col., 2009), y de esta manera, los mecanismos de extrusión de Na^+ a las células, que permitiría una tolerancia a la salinidad, son conocidos al detalle hasta su nivel molecular (Amtmann y Sanders, 1999; Tester y Davenport, 2003; Apse y Blumwald, 2007). Muchos trabajos se han basado en el estudio de la acumulación de Na^+ en plantas estresadas con NaCl como medida de tolerancia de las mismas a dicho estrés, a pesar de los muchos ejemplos donde no existe una correlación entre la sensibilidad de esa planta a la salinidad y las concentraciones iónicas en hojas (Greenway y Munns, 1980; Genc y col., 2007). Por otro lado, a menudo se observa una muy buena correlación entre elevadas concentraciones de Cl^- y la sensibilidad a la salinidad de una determinada especie (Kingsbury y Epstein, 1986; Gorham y col., 1990) y sin embargo, los estudios basados en una posible toxicidad de Cl^- bajo condiciones salinas son bastante más escasos. Los efectos de elevadas concentraciones de Cl^- sobre los mecanismos de tolerancia a la salinidad han sido, hasta el momento, poco estudiados, a pesar de ser el anión más predominante en suelos salinos. El Cl^- es un micronutriente esencial con importantes funciones como la regulación enzimática en el citoplasma, cofactor en la fotosíntesis, estabilizador del potencial de membrana y regulador del pH celular (Xu y col., 2000; White y Broadley, 2001), siendo todas ellas funciones metabólicamente muy importantes para la supervivencia celular. Se ha observado que plantas de judía cultivadas en condiciones de salinidad presentaban elevadas concentraciones de Cl^- en sus hojas, lo que parecía ser el factor fundamental que daba lugar a una clorosis severa y una importante reducción fotosintética (Hajrasuliha, 1980), todo ello correlacionado con una reducción

del crecimiento. Estos datos podrían ayudar a explicar nuestros resultados, donde un aumento en la temperatura de crecimiento de las plantas a 35°C no afectaba a la concentración en hojas de Na⁺ (Tabla 4.12) pero sí la de Cl⁻ (Tabla 4.13), observándose una disminución en la fotosíntesis, en el crecimiento de las plantas así como en la producción total comparadas con las plantas crecidas a 25°C.

Por otro lado, la acumulación Na⁺ y Cl⁻ podría ser la causa de reducción en la concentración de Ca⁺², Mg⁺² y K⁺ observada con el incremento de salinidad, independientemente de la temperatura aplicada (Figuras 4.12 y 4.13). Cuando aumentamos la temperatura ambiental de crecimiento de 25°C a 35°C, la concentración de Mg⁺² en tallos, de K⁺ en raíces, y de Ca⁺² en tallos y raíces era mayor que la encontrada a 25°C (Figuras 4.12 y 4.13). Algunos autores han mostrado que la absorción de nutrientes en plantas de tomate aumentaba cuando la temperatura de crecimiento se incrementaba en +5°C (Gent y Ma, 2000). De hecho, estos autores demostraron que calentando la solución nutritiva durante algunas horas durante el día, se aumentaba la absorción para la mayoría de los nutrientes. Por otro lado, algunos trabajos realizados previamente señalan que la temperatura de crecimiento no afecta tanto a la absorción de nutrientes, sino a la translocación de estos dentro de la planta (Darawsheh y Bouranis, 2006), de manera que un aumento en la temperatura ambiental de +5°C aumentaría la translocación de nutrientes desde la raíz hacia la parte aérea en un 20%. Ambas hipótesis apoyarían estos resultados encontrados en nuestro experimento.

4.2. Respuesta primaria de la planta de tomate a la combinación de salinidad y altas temperaturas. Aspectos fisiológicos, bioquímicos y moleculares.

Para analizar la respuesta primaria de plantas de tomate a la combinación de salinidad y altas temperaturas en comparación con ambos estreses aplicados individualmente, llevamos a cabo un estudio multidisciplinario abordando aspectos fisiológicos, bioquímicos y moleculares de algunos de los mecanismos implicados en la respuesta de tomate durante las primeras 72 horas de estrés. El estudio de esta respuesta primaria podría ayudarnos a detectar qué mecanismos, genes y proteínas están implicados en la tolerancia a la combinación de dos estreses abióticos muy comunes en muchas zonas agrícolas, como son la salinidad y las altas temperaturas, y a identificar genes y compuestos específicos que pueden ser utilizados para la mejora de la tolerancia de los cultivos bajo estas condiciones. Este experimento se llevó a cabo en cámara de cultivo.

4.2.1. Crecimiento vegetativo

Dependiendo del órgano de la planta analizado (parte aérea o raíces), los efectos de los distintos tratamientos aplicados dieron resultados diferentes, siendo el tratamiento de salinidad el que más afectó al crecimiento de parte aérea y raíces (Figura 4.15).

Los valores obtenidos de PF de la parte aérea de las plantas sometidas a estrés por altas temperaturas fueron muy similares a los obtenidos en condiciones control. La combinación de estreses (Sal + T) en comparación con los tratamientos control y altas temperaturas redujo significativamente el PF de la parte aérea en las primeras 48 h de estrés. Sin embargo, el tratamiento de salinidad fue el que más afectó al desarrollo de la parte aérea y de la raíz de las plantas, con una reducción del 35% en la parte aérea (Figura 4.15 A) y del 38% en las raíces (Figura 4.15 B) comparado con las plantas control ($p < 0.001^{***}$).

La reducción en el desarrollo de las raíces fue menos drástico cuando se aplicó un estrés por altas temperaturas o Sal + T en combinación (con una media del 18% de reducción) ($p < 0.001^{***}$; Figura 4.15 B).

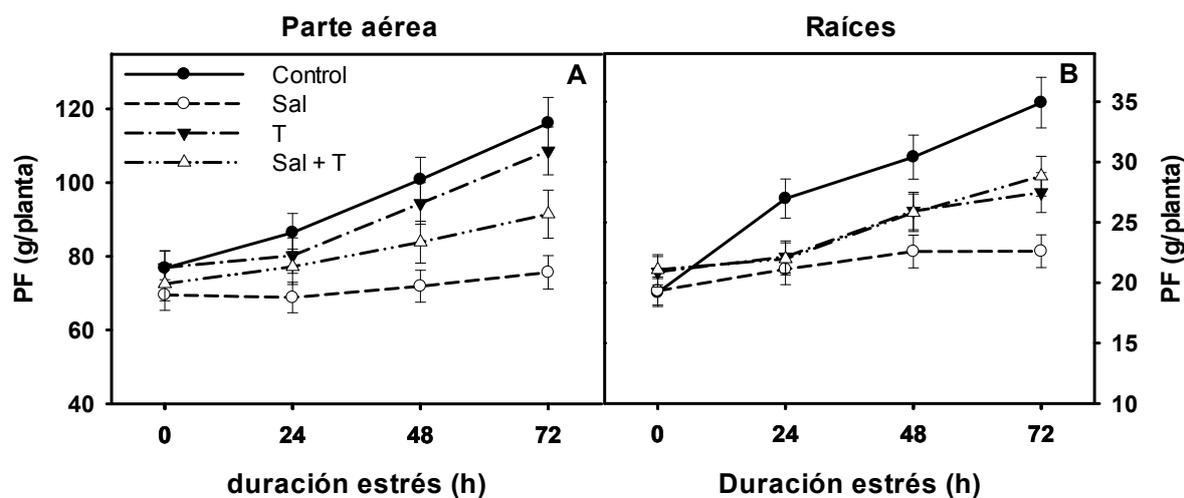


Figura 4.15. Peso fresco de parte aérea y raíces de plantas de tomate cultivadas hasta 72 horas, con tratamientos control, salinidad (Sal), altas temperaturas (T) y salinidad + altas temperaturas (Sal + T). La figura es representativa de dos experimentos independientes. Los valores representan la media \pm EE ($n=6$).

4.2.2. Concentración de Na^+ y K^+

Se analizó la concentración de Na^+ y K^+ en hojas, tallo y raíces durante las primeras 72h de aplicación del estrés (Figura 4.16). Como era de esperar, la concentración de Na^+ en las plantas control y en plantas crecidas únicamente con altas temperaturas fue insignificante, ya que a estas plantas no se le aplicó NaCl adicional en la solución nutritiva. La concentración de Na^+ de las plantas del tratamiento de salinidad fue del 38% mayor tanto en tallo como en hojas (Figura 4.16 A, 4.16 B) comparado con el tratamiento de combinación Sal + T. Sin embargo, la concentración de Na^+ en las raíces de las plantas sometidas al tratamiento de combinación Sal + T fue un 28% mayor que en las plantas del tratamiento de salinidad (Figura 4.16 C).

La concentración de K^+ en las plantas control y en plantas tratadas únicamente con alta temperatura fue muy similar y no se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos durante las 72h que duró nuestro experimento ($p>0.05$ ns; Figuras 4.16 B, 4.16 D, 4.16 F). Sin embargo, cuando las plantas fueron sometidas a salinidad o a la combinación de ambos estreses (Sal + T), la concentración de K^+ se

redujo significativamente en hojas, tallos y raíces, siendo la salinidad el tratamiento que más redujo la concentración de K^+ en todos los órganos analizados ($p < 0.001^{***}$).

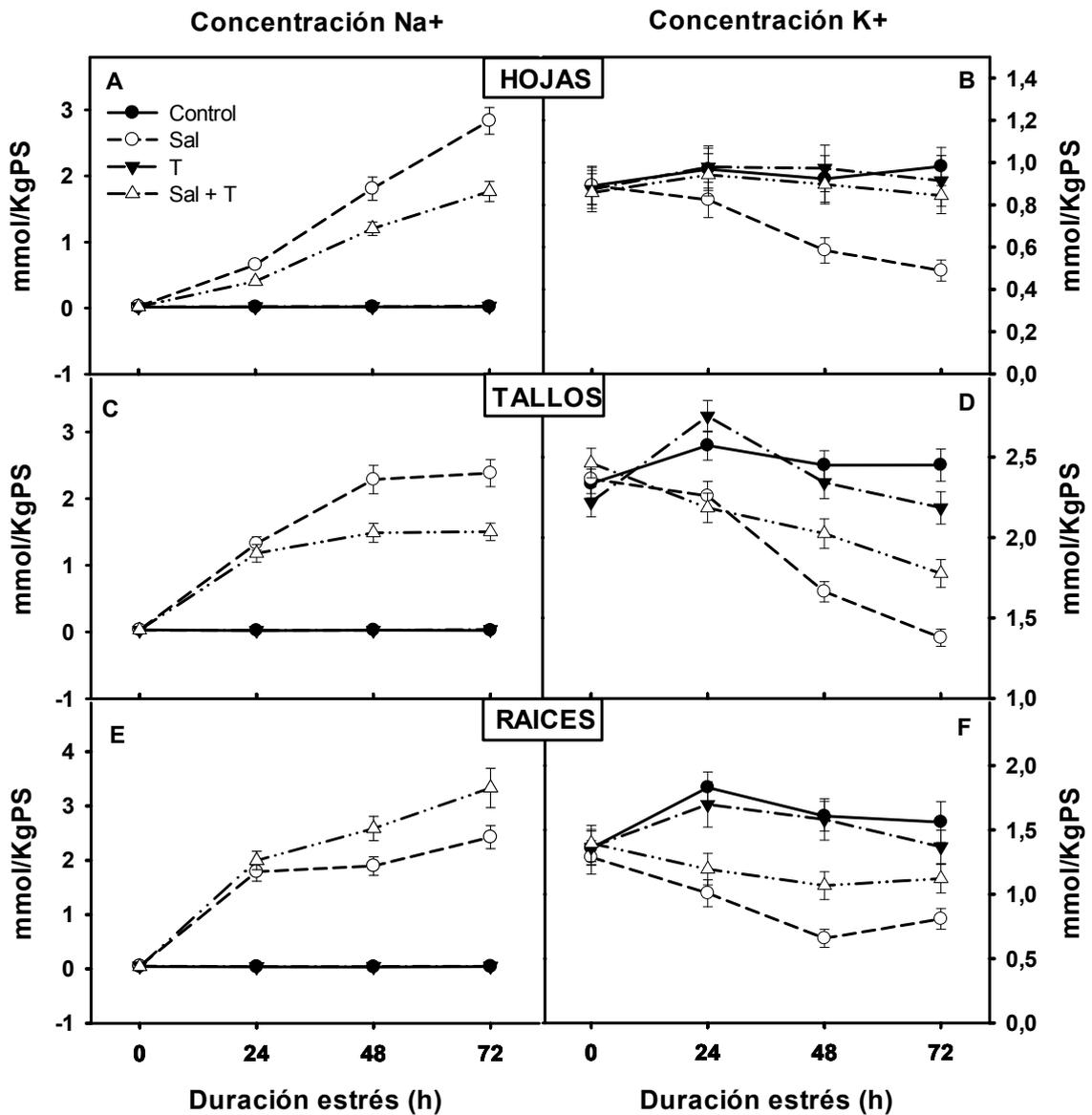


Figura 4.16. Concentración de Na^+ en hojas (A), tallos (C) y raíces (E) y concentración de K^+ en hojas (B), tallos (D) y raíces (D) de plantas de tomate cultivadas 72h con tratamientos control, salinidad (Sal), altas temperaturas (T) y la combinación de salinidad con altas temperaturas (Sal+ T). La figura es representativa de dos experimentos independientes. Los valores representan la media \pm EE ($n=6$).

La relación $[Na^+]/[K^+]$ (Figura 4.17) se utiliza con frecuencia como indicador de la tolerancia de las plantas a la salinidad. Las plantas desarrolladas con el tratamiento salino presentaron la mayor relación, mientras que la combinación de salinidad y altas temperaturas mostró una menor relación $[Na^+]/[K^+]$. Esta relación fue similar en los tratamientos control y altas temperaturas y mucho más bajo que para el tratamiento salino y el de combinación de estreses (Figura 4.17).

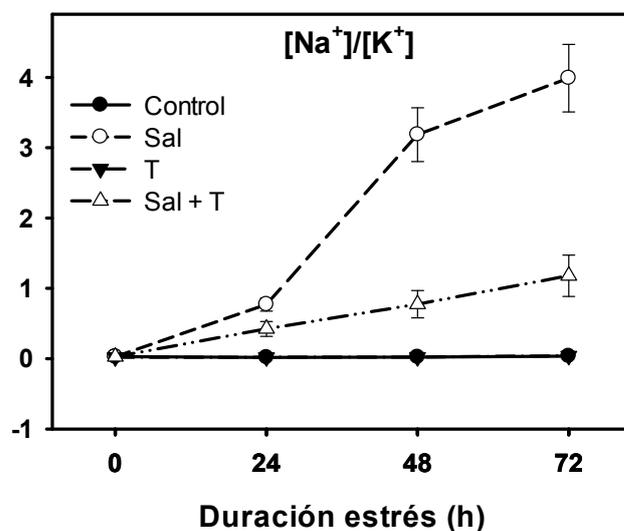


Figura 4.17. Relación Na^+/K^+ en plantas de tomate cultivadas 72h con tratamientos control, salinidad (Sal), altas temperaturas (T) y la combinación de salinidad con altas temperaturas (Sal + T). La figura es representativa de dos experimentos independientes. Los valores representan la media \pm EE (n=6).

4.2.3. Absorción y transporte de Na^+ y K^+

Debido a las diferencias en las concentraciones de Na^+ y K^+ observadas, se decidió llevar a cabo el estudio de las tasas de absorción y transporte para dichos nutrientes (Figura 4.18). Después de la aplicación del estrés con NaCl, se observaron dos efectos: primero, la absorción de Na^+ aumentó considerablemente en los tratamientos de salinidad y Sal + T en las primeras 24h, aunque esta tasa de absorción disminuyó en las siguientes 48h, y aún más después de 72h; segundo, la absorción de Na^+ disminuyó cuando el estrés por altas temperaturas era combinado

con salinidad, siendo un 33% menor después de 48h y un 47% más bajo después de 72h de tratamiento comparado con salinidad.

De manera similar, la tasa de transporte de Na^+ fue mucho más baja con la combinación de estreses que solo con salinidad (Figura 4.18 B), con reducciones después de 72h de estrés de hasta 72% con respecto al tratamiento salino. Durante las 48h y 72h de estrés, la absorción de K^+ fue muy similar en las plantas tratadas con altas temperaturas o con Sal + T, aunque se redujo con respecto al control en ambos tratamientos (Figura 4.18 C). El tratamiento de salinidad indujo una respuesta particular en la absorción de K^+ , observándose valores negativos de absorción, que podrían indicar una salida neta de K^+ de las raíces (Figura 4.18 C). Cuando se estudió la tasa de transporte de K^+ (Figura 4.18 D) se observaron resultados similares, con una inhibición obvia del transporte de K^+ con el tratamiento salino.

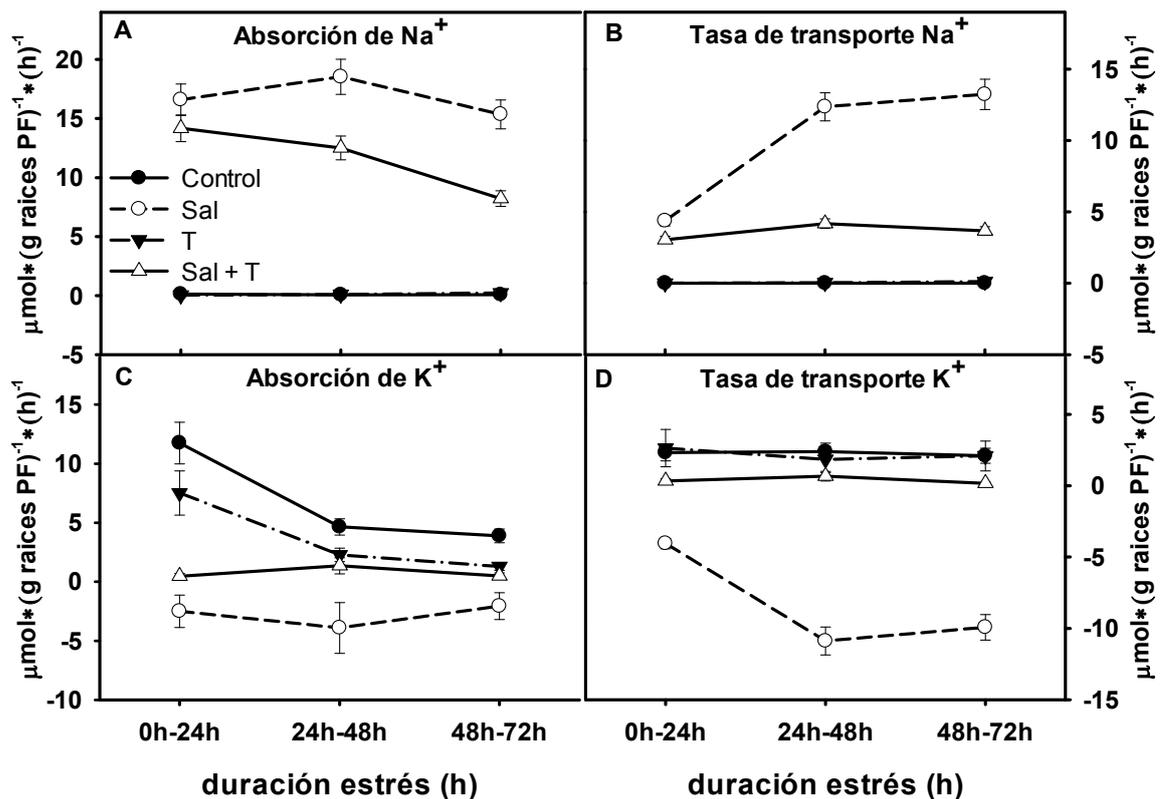


Figura 4.18. Absorción (A y C) y tasa de transporte (B y D) de Na^+ y K^+ de plantas de tomate cultivadas 72h con tratamientos control, salinidad (Sal), altas temperaturas (T) y la combinación de salinidad con altas temperaturas (Sal + T). La figura es representativa de dos experimentos independientes. Los valores representan la media \pm EE (n=6).

4.2.4. Relaciones hídricas en la planta

Para determinar cómo las relaciones hídricas pueden ser afectadas bajo condiciones de estreses abióticos combinados, se estudiaron una serie de parámetros, como fueron el potencial hídrico y osmótico, el potencial de turgor y el contenido hídrico de las plantas (Figura 4.19). Los valores obtenidos de potencial hídrico en las plantas crecidas con Sal + T fueron similares a los obtenidos en el tratamiento con altas temperaturas, con reducciones de un 35% con respecto a las plantas control tras 72h de estrés. Con el tratamiento salino se registraron los valores más negativos de potencial hídrico (Figura 4.19 A). Los valores obtenidos para el potencial osmótico fueron un 40% menores con respecto a las plantas control después de 72h de estrés, independientemente del tratamiento aplicado (Figura 4.19 B). De acuerdo con esto, se observó un incremento en el potencial de turgor de forma diferente dependiendo del estrés aplicado. Así, el potencial de turgor cuando los estreses eran aplicados en combinación siguió un patrón similar al observado en el tratamiento de altas temperaturas, mientras que en el tratamiento salino no aumentó tanto como en los otros dos tratamientos (Figura 4.19 C).

Con respecto al contenido en agua, solo la salinidad dio lugar a diferencias significativas con respecto a los valores obtenidos en plantas control, resultando en una reducción significativa y progresiva durante el tiempo de exposición al estrés con respecto a las plantas control. Esta reducción fue de hasta un 7% al final del experimento en tratamientos salinos con respecto a plantas control, mientras que el tratamiento de altas temperaturas y el de combinación (Sal + T) mostraron valores de contenido en agua similares a las plantas control (Figura 4.19 D).

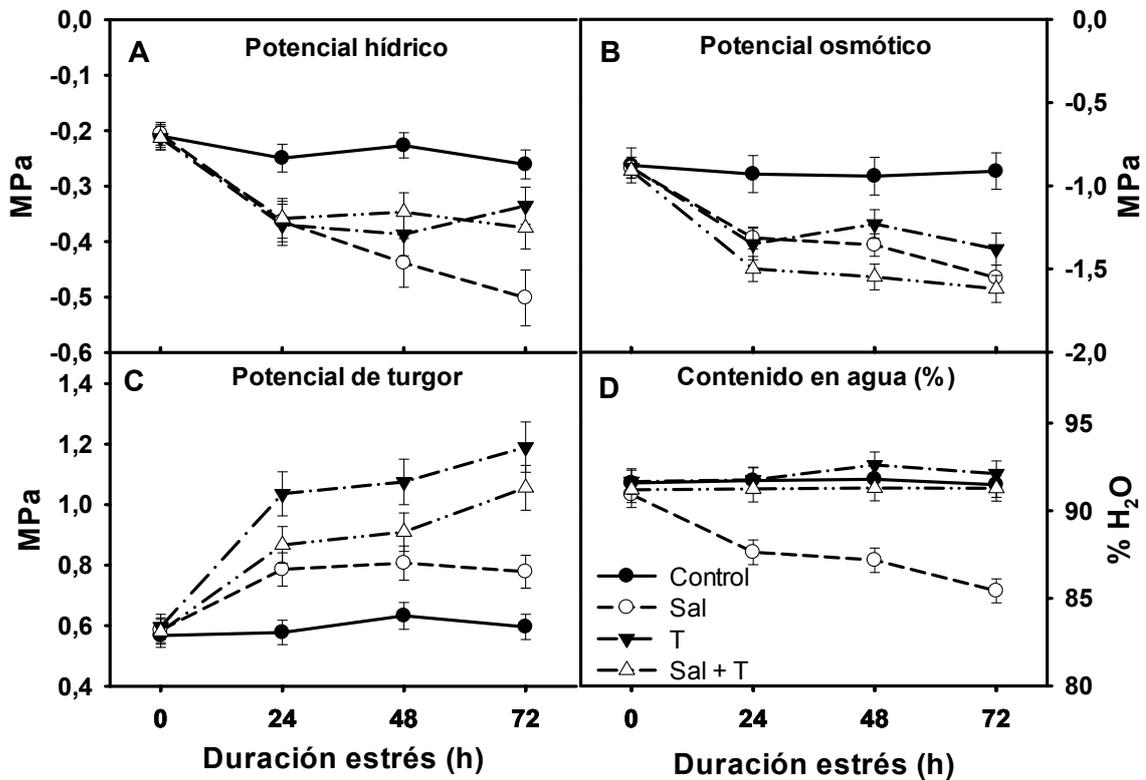


Figura 4.19. Parámetros relacionados con el contenido en agua en hojas de tomate cultivadas 72h con tratamientos control, salinidad (Sal), altas temperaturas (T) y la combinación de salinidad con altas temperaturas (Sal + T). (A) Potencial hídrico, (B) potencial osmótico, (C) potencial de turgor y (D) contenido en agua. La figura es representativa de dos experimentos independientes. Los valores representan la media \pm EE (n=6).

4.2.5. Parámetros fotosintéticos

Para determinar la respuesta fisiológica de las plantas a la combinación de estreses durante el crecimiento vegetativo, se estudiaron los cambios en la asimilación de CO₂, en la tasa de transpiración, en la máxima eficiencia cuántica de los fotosistemas (F_v/F_m), y en la eficiencia de PSII (ϕ PSII) (Figura 4.20). Nuestros resultados demostraron que el tratamiento salino fue el que más afectó a dichos parámetros, mostrando una gran reducción de asimilación de CO₂ y tasa de transpiración (Figuras 4.20 A y 4.20 B), así como para los valores de F_v/F_m y ϕ PSII con respecto a las plantas control (Figuras 4.20 C y 4.20 D).

Cuando el tratamiento de salinidad se aplicó junto a las altas temperaturas (Sal + T), los valores de estos parámetros fueron muy similares a los de las plantas del

tratamiento de altas temperaturas, con excepción de la tasa de transpiración (Figura 4.20 B). En este último caso, las plantas desarrolladas a altas temperaturas mostraron un aumento significativo de la tasa de transpiración, mientras que la combinación (Sal + T) dio valores similares a los obtenidos en condiciones control (Figura 4.20 B).

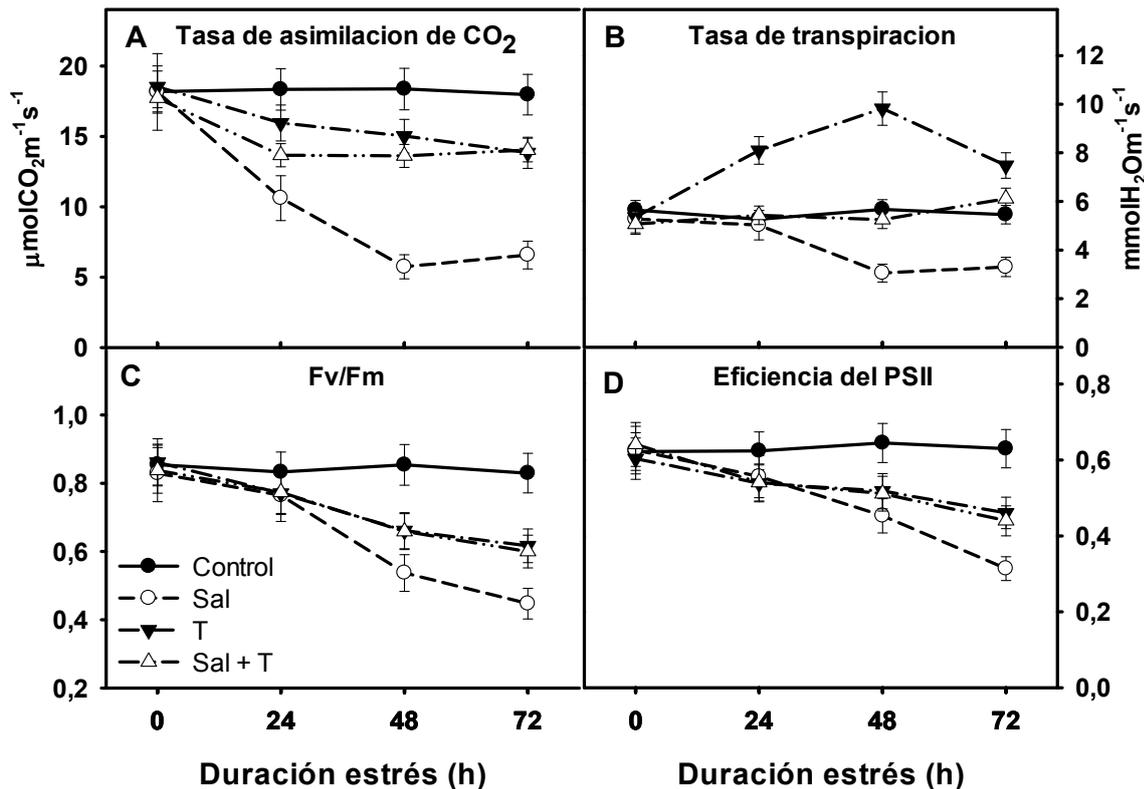


Figura 4.20. Parámetros relacionados con la fotosíntesis en hojas de tomate cultivadas 72h con tratamientos control, salinidad (Sal), altas temperaturas (T) y la combinación de salinidad con altas temperaturas (Sal + T). (A) Tasa de asimilación de CO₂; (B) tasa de transpiración; (C) máxima eficiencia cuántica de los fotosistemas (Fv/Fm); (D) eficiencia del PSII. La figura es representativa de dos experimentos independientes. Los valores representan la media ± EE (n=12).

4.2.6. Síntesis y acumulación de osmoprotectores

Se estudió la concentración de algunos de los osmoprotectores más importantes acumulados en las plantas, como prolina, compuestos de amonio cuaternario (glicina betína (GB) y colina), y azúcares solubles (sacarosa, fructosa y glucosa). También se estudió la concentración de almidón y trehalosa (Figura 4.21). Y cómo el control de su acumulación se podría ver afectado con la combinación de salinidad y altas temperaturas a nivel bioquímico o molecular (Figuras 4.21-4.23) en relación a dichos estreses aplicados de forma individual.

Seleccionamos un grupo de las enzimas más importantes implicadas en la ruta biosintética de cada compuesto analizado (síntesis y degradación) y se analizó la actividad enzimática de cada enzima seleccionada (Figura 4.22). De manera similar, también fue determinada la expresión de los genes que codifican directamente para estas enzimas mediante un estudio por qPCR, como ya se ha descrito anteriormente en el apartado de Material y Métodos (Figura 4.23).

Para simplificar, y con el fin de entender mejor los resultados obtenidos, las concentraciones de osmoprotectores, las actividades enzimáticas y la expresión génica han sido representados en un mapa de calor, donde se refleja el \log_2 de los valores absolutos obtenidos para cada uno de ellos. Este \log_2 se calculó sobre la normalización de los datos obtenidos en plantas control antes de la aplicación de cualquier estrés. De esta manera, un \log_2 de 1 o -1 equivale al doble o la mitad del valor obtenido con respecto a plantas control respectivamente. Se seleccionó el punto 48h de estrés por considerarse como el punto más representativo, debido a que los cambios fisiológicos más importantes se producían en dicho periodo de tiempo (Figuras 4.15-4.20). Los valores absolutos se pueden ver en las Tablas 4.14 y 4.16 (para osmoprotectores y actividades enzimáticas respectivamente) y los valores \log_2 se pueden encontrar en las tablas 4.15, 4.17 y 4.18 (para osmoprotectores, actividades enzimáticas y expresión génica respectivamente).

Determinación de la concentración de osmoprotectores

La concentración de prolina, glicina betaína, GB, colina (Cho), sacarosa, fructosa, glucosa, almidón y trehalosa obtenidas después de 48h en plantas desarrolladas con salinidad, altas temperaturas o con la combinación de ambos

estreses se han representado en la figura 4.21 y los valores absolutos se han presentado en las tablas 4.14 y 4.15. Tras 48h de estrés, la combinación (Sal + T) resultó en un perfil de acumulación de osmoprotectores diferente del observado cuando estos dos estreses se aplicaron de forma independiente.

Se observó un aumento en la concentración de GB en el tratamiento Sal + T de 4 veces superior al encontrado en las plantas control. Estos resultados fueron similares a los observados cuando la temperatura era aplicada como estrés simple (Figura 4.21). El tratamiento Sal + T también afectó a la concentración de sacarosa, acumulándose significativamente, aunque en menor grado que cuando la salinidad o las altas temperaturas eran aplicadas de forma independiente. Además, la acumulación de almidón fue mayor con el tratamiento de la combinación de estreses que con los estreses aplicados individualmente.

Como resultado inesperado, vimos que la concentración de trehalosa fue de 8 veces mayor en el tratamiento Sal + T que en las plantas control, mientras que este compuesto apenas vio modificada su concentración con el tratamiento de altas temperaturas, y con salinidad la concentración obtenida fue parecida a las plantas control. Por otra parte, las concentraciones de prolina y fructosa en el tratamiento Sal + T fueron similares a las obtenidas con el tratamiento de altas temperaturas, mientras que la concentración de colina presentó un perfil similar de acumulación observada en el tratamiento salino. Sin embargo, y contrariamente a lo observado con salinidad y altas temperaturas, la concentración de glucosa en el tratamiento Sal + T no cambió con respecto a las plantas control (Figura 4.21).

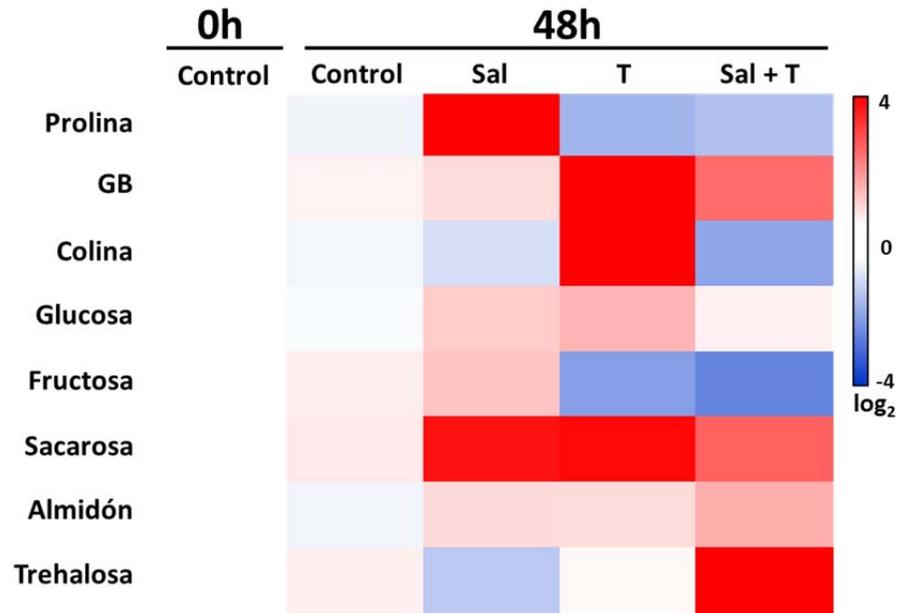


Figura 4.21. Mapa de calor de un grupo de osmoprotectores en hojas de tomate obtenido a las 48h siguientes de la aplicación de los tratamientos control, salinidad (Sal), altas temperaturas (T) y la combinación de salinidad con altas temperaturas (Sal + T). El color rojo representa la concentración mayor relativa y el color azul representa la concentración menor relativa cuando se comparan con las muestras control antes de iniciar el estrés (0h). La escala es el \log_2 de la media de los valores de concentración después de su correspondiente normalización frente a las muestras control ($n=6$). La figura es representativa de dos experimentos independientes.

Tabla 4.14. Concentración absoluta de un grupo seleccionado de compuestos relacionados con el estrés en plantas de tomate. Los valores representan la media \pm EE (n=6). (*) La concentración de compuestos marcados con asterisco están expresados como $\mu\text{g/g PF.}$; La concentración de compuestos marcados sin asterisco están expresados como mg/g PF.

| | 0h | 48h | | | |
|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Control | Control | Sal | T | Sal + T |
| Prolina (*) | 6.351 \pm 0.124 | 5.721 \pm 0.145 | 121.7 \pm 2.124 | 2.979 \pm 0.451 | 3.381 \pm 0.042 |
| GB (*) | 0.018 \pm 0.002 | 0.021 \pm 0.002 | 0.027 \pm 0.001 | 8.067 \pm 0.472 | 0.093 \pm 0.001 |
| Colina (*) | 0.141 \pm 0.003 | 0.131 \pm 0.002 | 0.102 \pm 0.004 | 2.715 \pm 0.224 | 0.056 \pm 0.001 |
| Glucosa | 10.28 \pm 1.021 | 9.915 \pm 0.586 | 18.25 \pm 1.021 | 23.18 \pm 1.124 | 12.09 \pm 0.965 |
| Fructosa | 12.21 \pm 1.202 | 14.74 \pm 0.965 | 23.26 \pm 1.365 | 4.575 \pm 0.321 | 3.487 \pm 0.042 |
| Sacarosa | 3.815 \pm 0.124 | 4.852 \pm 0.045 | 50.30 \pm 2.124 | 56.94 \pm 2.457 | 21.47 \pm 1.114 |
| Almidón | 10.55 \pm 0.954 | 9.625 \pm 0.978 | 15.86 \pm 1.134 | 15.61 \pm 1.114 | 25.81 \pm 1.024 |
| Threalosa (*) | 0.485 \pm 0.025 | 0.574 \pm 0.021 | 0.279 \pm 0.014 | 0.525 \pm 0.054 | 8.647 \pm 0.214 |

Tabla 4.15. Log_2 de la concentración de un grupo de osmoprotectores en plantas de tomate. La normalización de los datos fue realizada con respecto a las plantas control antes del estrés (0h).

| | log_2 | | | | |
|------------------|----------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 0h | 48h | | | |
| | Control | Control | Sal | T | Sal + T |
| Prolina | 0 | -0.151 \pm 0.03 | 4.259 \pm 0.12 | -1.093 \pm 0.09 | -0.910 \pm 0.08 |
| GB | 0 | 0.214 \pm 0.04 | 0.552 \pm 0.04 | 8.748 \pm 0.35 | 2.313 \pm 0.24 |
| Colina | 0 | -0.118 \pm 0.02 | -0.461 \pm 0.03 | 4.266 \pm 0.21 | -1.314 \pm 0.08 |
| Glucosa | 0 | -0.053 \pm 0.001 | 0.827 \pm 0.06 | 1.172 \pm 0.12 | 0.233 \pm 0.06 |
| Fructosa | 0 | 0.271 \pm 0.04 | 0.929 \pm 0.06 | -1.416 \pm 0.15 | -1.807 \pm 0.19 |
| Sacarosa | 0 | 0.344 \pm 0.05 | 3.720 \pm 0.11 | 3.899 \pm 0.48 | 2.492 \pm 0.23 |
| Almidón | 0 | -0.133 \pm 0.01 | 0.587 \pm 0.03 | 0.564 \pm 0.05 | 1.289 \pm 0.10 |
| Threalosa | 0 | 0.243 \pm 0.05 | -0.797 \pm 0.09 | 0.115 \pm 0.02 | 4.156 \pm 0.15 |

4.2.7. Determinación de las actividades enzimáticas

Se llevó a cabo la determinación de las actividades de las principales enzimas implicadas en la ruta biosintética de prolina, GB, sacarosa y trehalosa, para poder comprender mejor el perfil de acumulación de los osmoprotectores observado anteriormente con la combinación de estreses Sal + T (Figura 4.22, Tablas 4.16 y 4.17). Las actividades de todas las enzimas estudiadas fueron diferentes dependiendo del tipo de estrés aplicado. Con Sal + T se observó la inhibición de la síntesis de prolina a través de la vía del glutamato (enzimas P5CS y P5CR), con un aumento en la actividad de OAT (involucrada en la síntesis de prolina desde la vía ornitina). Se observó además un aumento de las actividades de las enzimas responsables de la degradación de prolina (PDH y PO) bajo estas condiciones. Estos resultados no son comparables con los resultados obtenidos cuando se aplicaron los estreses individualmente. Con salinidad, sólo las enzimas implicadas en la síntesis de prolina vía glutamato (P5CS and P5CR) mostraron un incremento de su actividad con respecto a las plantas control, mientras que las enzimas que degradan prolina vieron drásticamente reducida su actividad. Por otra parte, con estrés por altas temperaturas, todas las enzimas analizadas, implicadas en la síntesis o la degradación de prolina, tuvieron una reducción de su actividad con respecto a las plantas control (Figura 4.22).

Por otro lado, la combinación Sal + T produjo un incremento de la actividad de la enzima limitante en la síntesis de GB (BADH). Estos resultados fueron similares a los obtenidos en las plantas sometidas a las altas temperaturas. Cuando el tratamiento aplicado fue salinidad, observamos totalmente lo contrario, con una fuerte inhibición de la enzima BADH.

Tanto para la síntesis como para la degradación de sacarosa, ambos, salinidad y altas temperaturas mostraron un perfil similar, con un incremento de las actividades de las enzimas relacionadas con la síntesis de sacarosa (SPS, SS, y FK), y una inhibición de las enzimas relacionadas con la degradación de este compuesto (NI, AI). La actividad FBPasa se vio inhibida bajo ambos estreses aplicados de manera individual. Sin embargo, cuando se aplicó salinidad junto a altas temperaturas, observamos diferencias importantes con respecto a los tratamientos aplicados individualmente. En primer lugar, la síntesis de sacarosa se indujo a través de la actividad SS, mientras que la actividad FK fue drásticamente inhibida y la SPS no cambió con respecto a las

plantas control. Además, y al contrario que con la aplicación de los estreses de forma individual, Sal + T incrementó la actividad FPBasa con respecto a las plantas control.

De acuerdo con la acumulación de trehalosa (Figura 4.21), la actividad T6PS, enzima limitante en la síntesis de este compuesto, fue fuertemente inducida cuando la salinidad fue aplicada junto a las altas temperaturas. Estos resultados son contrarios a los hallados cuando se aplicaron los dos estreses individualmente (Figura 4.22).

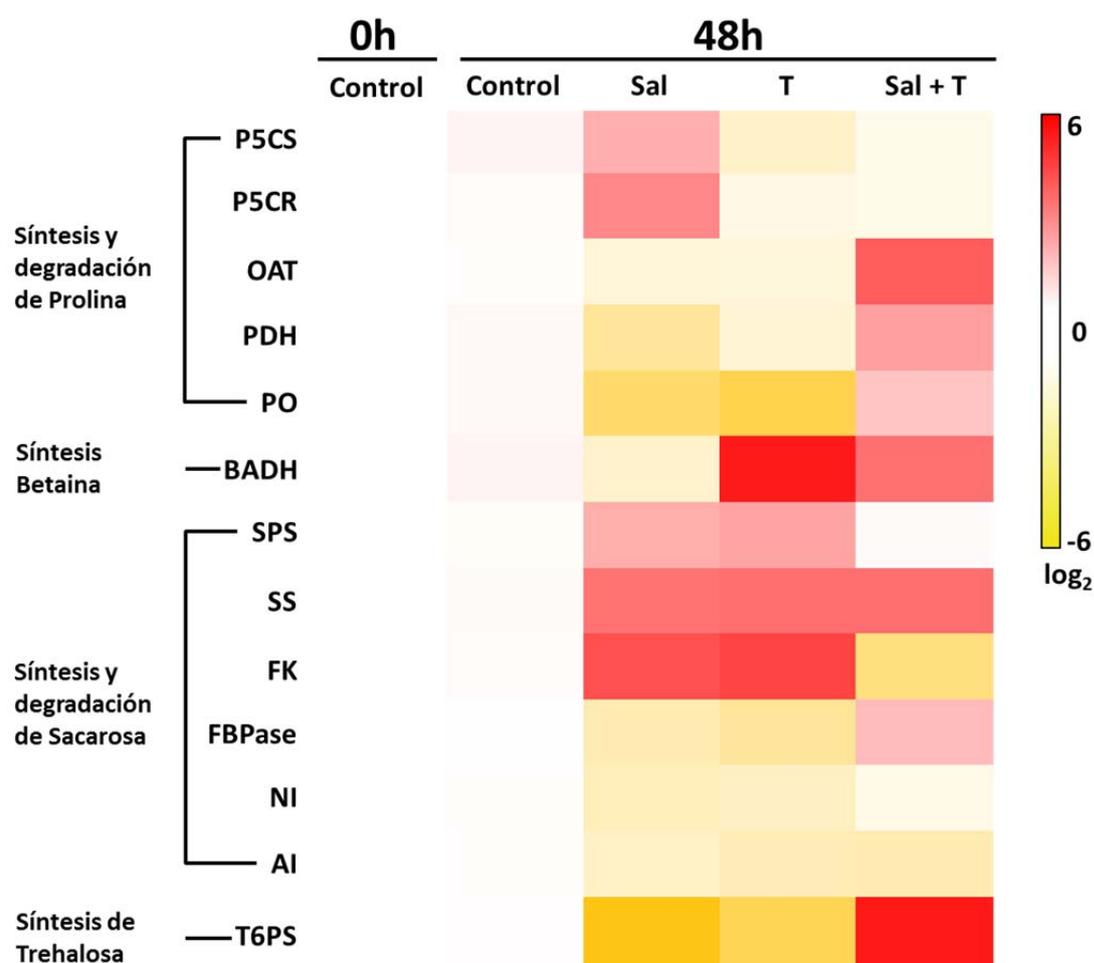


Figura 4.22. Mapa de calor de un grupo de enzimas relacionadas con las rutas biosintéticas de los osmoprotectores (síntesis y degradación). Las distintas actividades se midieron en hojas de tomate a las 48h siguientes de la aplicación de los tratamientos control, salinidad (Sal), altas temperaturas (T) y la combinación de salinidad con altas temperaturas (Sal + T). El color rojo representa la actividad mayor y el color amarillo representa la actividad menor relativa cuando se compararon con las muestras control antes de iniciar el estrés (0h). La escala es el log₂ de la media de los valores de concentración después de la normalización (n=6). La figura es representativa de dos experimentos independientes.

Tabla 4.16. Actividad absoluta de las enzimas implicadas en la síntesis y acumulación de los osmoprotectores nombrados anteriormente en las Tablas 4.14 y 4.15. Los datos representan la media \pm EE ($n=6$). La actividad se ha expresado en unidad internacional (U) por mg de proteína soluble total en todos los casos, excepto para invertasas (NI y IA) cuya actividad se ha expresado en mU/mg de proteína soluble total.

| | 0h | 48h | | | |
|---------------|------------------|------------------|--------------------|-------------------|------------------|
| | Control | Control | Sal | T | Sal + T |
| P5CS | 23.67 \pm 1.24 | 26.83 \pm 2.01 | 56.81 \pm 2.14 | 9.722 \pm 0.95 | 16.92 \pm 1.14 |
| P5CR | 8.492 \pm 0.12 | 8.965 \pm 0.95 | 31.47 \pm 2.01 | 5.377 \pm 0.99 | 5.797 \pm 0.57 |
| OAT | 14.81 \pm 1.35 | 14.55 \pm 1.10 | 7.935 \pm 0.95 | 8.317 \pm 1.05 | 86.28 \pm 3.57 |
| PDH | 14.77 \pm 1.01 | 15.90 \pm 1.21 | 2.732 \pm 0.10 | 7.231 \pm 1.03 | 41.51 \pm 0.05 |
| PO | 21.30 \pm 1.02 | 23.26 \pm 2.03 | 1.981 \pm 0.04 | 1.185 \pm 0.12 | 41.03 \pm 0.02 |
| BADH | 0.648 \pm 0.02 | 0.734 \pm 0.20 | 0.284 \pm 0.01 | 7.867 \pm 1.08 | 3.085 \pm 0.07 |
| SPS | 64.03 \pm 2.45 | 57.54 \pm 2.36 | 156.7 \pm 3.45 | 174.1 \pm 5.12 | 68.04 \pm 2.58 |
| SS | 20.17 \pm 1.54 | 21.53 \pm 1.54 | 92.48 \pm 3.14 | 97.37 \pm 3.14 | 98.39 \pm 3.45 |
| FK | 21.49 \pm 1.28 | 22.65 \pm 1.24 | 146.4 \pm 4.25 | 165.5 \pm 4.78 | 2.635 \pm 0.57 |
| FBPasa | 15.28 \pm 1.14 | 15.27 \pm 0.96 | 4.365 \pm 0.98 | 2.833 \pm 0.54 | 32.60 \pm 1.14 |
| NI | 27.96 \pm 2.47 | 26.70 \pm 1.84 | 9.155 \pm 1.05 | 10.51 \pm 1.12 | 18.90 \pm 1.59 |
| AI | 28.15 \pm 1.68 | 27.45 \pm 1.34 | 11.24 \pm 1.03 | 8.562 \pm 1.04 | 7.981 \pm 0.85 |
| TPS | 0.504 \pm 0.15 | 0.516 \pm 0.02 | 0.011 \pm 0.0001 | 0.031 \pm 0.001 | 6.212 \pm 1.05 |

Tabla 4.17. Log₂ de las actividades de las principales enzimas responsables de la síntesis y acumulación de los osmoprotectores nombrados anteriormente en la Tabla 4.16. Las actividades se normalizaron con respecto a sus controles antes del estrés (0h).

| | Log ₂ | | | | |
|---------------|------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 0h | 48h | | | |
| | Control | Control | Sal | T | Sal + T |
| P5CS | 0 | 0.180 \pm 0.02 | 1.262 \pm 0.09 | -1.283 \pm 0.10 | -0.484 \pm 0.05 |
| P5CR | 0 | 0.078 \pm 0.004 | 1.889 \pm 0.10 | -0.659 \pm 0.05 | -0.551 \pm 0.07 |
| OAT | 0 | -0.025 \pm 0.002 | -0.900 \pm 0.09 | -0.832 \pm 0.05 | 2.542 \pm 0.27 |
| PDH | 0 | 0.106 \pm 0.03 | -2.434 \pm 0.19 | -1.030 \pm 0.21 | 1.490 \pm 0.22 |
| PO | 0 | 0.126 \pm 0.04 | -3.427 \pm 0.25 | -4.168 \pm 0.21 | 0.945 \pm 0.04 |
| BADH | 0 | 0.179 \pm 0.05 | -1.190 \pm 0.12 | 3.601 \pm 0.27 | 2.251 \pm 0.38 |
| SPS | 0 | -0.154 \pm 0.03 | 1.291 \pm 0.10 | 1.442 \pm 0.14 | 0.087 \pm 0.005 |
| SS | 0 | 0.094 \pm 0.006 | 2.196 \pm 0.18 | 2.270 \pm 0.28 | 2.285 \pm 0.31 |
| FK | 0 | 0.075 \pm 0.006 | 2.768 \pm 0.19 | 2.945 \pm 0.27 | -3.028 \pm 0.35 |
| FBPase | 0 | -0.001 \pm 0.000 | -1.808 \pm 0.12 | -2.433 \pm 0.18 | 1.093 \pm 0.16 |
| NI | 0 | -0.066 \pm 0.005 | -1.611 \pm 0.11 | -1.410 \pm 0.18 | -0.565 \pm 0.03 |
| AI | 0 | -0.036 \pm 0.002 | -1.324 \pm 0.10 | -1.717 \pm 0.21 | -1.818 \pm 0.10 |
| TPS | 0 | 0.033 \pm 0.003 | -5.517 \pm 0.85 | -4.023 \pm 0.31 | 3.620 \pm 0.29 |

4.2.8. Determinación la expresión de los principales genes implicados

Se llevó a cabo un estudio del nivel de transcripción de los principales genes que codifican para las enzimas determinadas anteriormente, con el objetivo fundamental de conocer si la activación o la inhibición enzimática observada con la combinación de estreses eran reguladas a nivel transcripcional o postranscripcional (Figura 4.23, tabla 4.18). Después de 48h de estrés, la combinación de estreses dio lugar a una sobreexpresión significativa con respecto a las plantas control de la mayoría de los genes que codifican para la síntesis de prolina (*LeP5CR* y *LeOAT*) y para su degradación (*LePDH* y *LePO*), para la síntesis de GB (*LeBADH* y *LeCMO*), para la síntesis de sacarosa (*LeSUS3*, *LeFK2*, *LeFBPasa*) y para su degradación (*LeAI*) y para la síntesis de trehalosa (*LeT6PS*). La expresión de otros genes como fueron *LeP5CS* (síntesis de prolina), *LeSPS* (síntesis de sacarosa), y *LeNI* (degradación de sacarosa) no mostraron diferencias significativas con respecto a las plantas control.

Los tratamientos de salinidad y altas temperaturas aplicados conjuntamente compartieron algunas respuestas comunes con salinidad o altas temperaturas aplicadas de forma individual. Por ejemplo los niveles de expresión para *LeP5CR*, *LeSUS3*, *LeFK2* y *LeAI* fueron muy parecidos en ellos. Por otra parte, hubo otro conjunto de genes cuya expresión con el tratamiento Sal + T fue similar únicamente al tratamiento salino (como *LeOAT* y *LeNI*) o al tratamiento de altas temperaturas (como *LePDH*, *LeBADH*, *LeCMO*). En contraste con esto, algunos de los genes estudiados, como fueron *LeP5CS*, *LePO*, *LeSPS*, *LeFBPasa* y *LeT6PS*, mostraron un perfil de expresión específico bajo la combinación de salinidad y altas temperaturas y distinto al encontrado en plantas tratadas con estos dos estreses de manera individual.

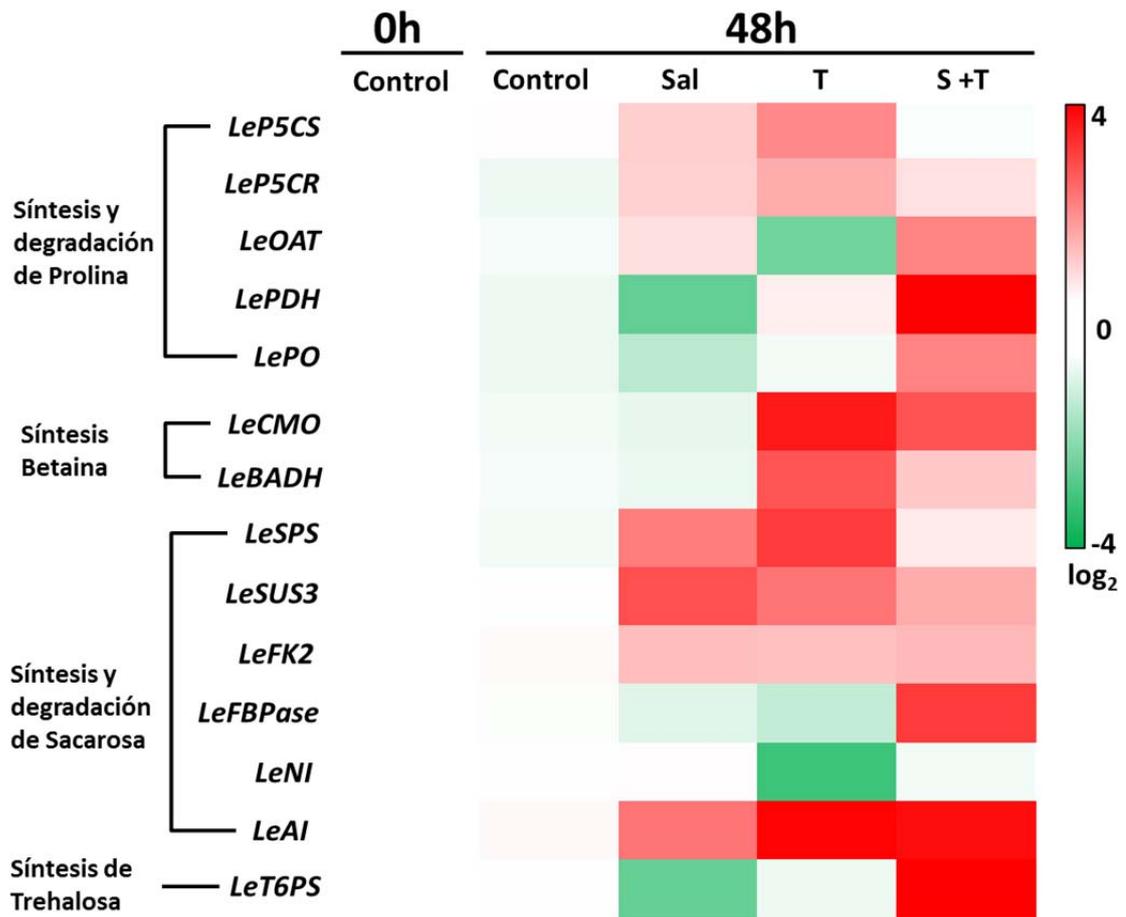


Figura 4.23. Mapa de calor de un grupo de genes relacionados con las diferentes rutas biosintéticas de osmoprotectores (síntesis y degradación). Los valores de expresión relativa se obtuvieron de hojas de tomate a las 48h siguientes de la aplicación de salinidad (Sal), altas temperaturas (T) y la combinación de salinidad con altas temperaturas (Sal + T). El color rojo representa la expresión relativa mayor y el color verde representa la expresión menor relativa cuando se comparan se comparan con las muestras control antes de iniciar el estrés (0h). La escala es el \log_2 de la media de los valores de concentración después de la normalización ($n=9$). La figura es representativa de dos experimentos independientes.

Tabla 4.18. \log_2 de la expresión de un grupo de genes relacionados con la acumulación de osmoprotectores nombrados anteriormente en las tablas 4.15 y 4.15. La expresión génica fue determinada con qPCR (Applied Biosystems, Lincoln, NE) utilizando los cebadores que se presentan en la Tabla 3.5. La extracción de ARN y la síntesis de cDNA fueron realizadas como se describe en el apartado de Material y métodos. La normalización de la expresión se hizo usando dos controles internos cuya expresión era constitutiva (LeACT and LeERF1) y la normalización de las muestras para el cálculo \log_2 se realizó con respecto a las plantas control antes del estrés ($n=9$).

| | 0h | 48h | | | |
|-----------------|---------|----------------|----------------|---------------|----------------|
| | Control | Control | Sal | T | Sal + T |
| LeP5CS | 0 | 0.045 ± 0.001 | 1.076 ± 0.08 | 1.871 ± 0.11 | -0.086 ± 0.001 |
| LeP5CR | 0 | -0.258 ± 0.02 | 1.073 ± 0.07 | 1.302 ± 0.08 | 0.474 ± 0.01 |
| LeOAT | 0 | -0.128 ± 0.01 | 0.498 ± 0.008 | -2.275 ± 0.21 | 1.933 ± 0.11 |
| LePDH | 0 | -0.263 ± 0.02 | -2.418 ± 0.09 | 4.277 ± 0.33 | 4.210 ± 0.22 |
| LePO | 0 | -0.254 ± 0.03 | -1.080 ± 0.06 | 3.184 ± 0.26 | 1.954 ± 0.10 |
| LeCMO | 0 | -0.186 ± 0.02 | -0.373 ± 0.005 | 3.630 ± 0.03 | 2.710 ± 0.001 |
| LeBADH | 0 | -0.129 ± 0.01 | -0.304 ± 0.006 | 2.689 ± 0.28 | 1.858 ± 0.18 |
| LeSPS | 0 | -0.192 ± 0.02 | 2.040 ± 0.09 | 3.096 ± 0.29 | 0.329 ± 0.21 |
| LeSUS3 | 0 | -0.030 ± 0.003 | 2.763 ± 0.10 | 2.180 ± 0.31 | 1.304 ± 0.01 |
| LeFK2 | 0 | 0.079 ± 0.002 | 2.745 ± 0.11 | 3.014 ± 0.34 | -1.107 ± 0.09 |
| LeFPBase | 0 | -0.046 ± 0.002 | -0.457 ± 0.03 | -0.943 ± 0.02 | 3.095 ± 0.20 |
| LeNI | 0 | -0.002 ± 0.000 | 0.034 ± 0.002 | -3.023 ± 0.33 | -1.190 ± 0.08 |
| LeAI | 0 | 0.125 ± 0.01 | 2.174 ± 0.11 | 3.973 ± 0.29 | 3.812 ± 0.18 |
| LeT6PS | 0 | 0.015 ± 0.001 | -2.411 ± 0.12 | -0.265 ± 0.01 | 5.286 ± 0.44 |

4.2.9. Estrés oxidativo y oxidación proteica

Con respecto al estrés oxidativo, como indicador principal de la incidencia de estrés en las plantas, se determinaron los niveles de H_2O_2 y peroxidación lipídica (MDA), así como oxidación proteica y la actividad proteolítica en las hojas de tomate durante las primeras 72h de estrés (Figura 4.24). La concentración de H_2O_2 fue diferente en función del tratamiento aplicado (Figura 4.24 A). De esta forma, las plantas cultivadas con salinidad mostraron los niveles más elevados de H_2O_2 , con incrementos de hasta 3 veces superiores con respecto a las plantas control tras 72 horas de exposición al estrés. Los tratamientos por altas temperaturas y Sal + T dieron lugar a concentraciones celulares de H_2O_2 similares, y aunque el aumento no fue tan pronunciado como para salinidad, fue del doble con respecto a los controles (Figura 4.24 A). Por otra parte, los niveles de MDA aumentaron con todos los estreses

aplicados, incrementando aproximadamente el doble del nivel observado en las plantas control (Figura 4.24 B).

La oxidación proteica y la actividad proteolítica mostraron un patrón similar con los diferentes tratamientos aplicados, siendo los tratamientos de salinidad y altas temperaturas los que presentaron los mayores valores para ambos parámetros (Figura 4.24 C, 4.24 D) con incrementos de hasta 2.3 veces con respecto a las plantas control. El tratamiento Sal + T mostró el menor incremento con respecto a las plantas control (sobre 1.5 veces).

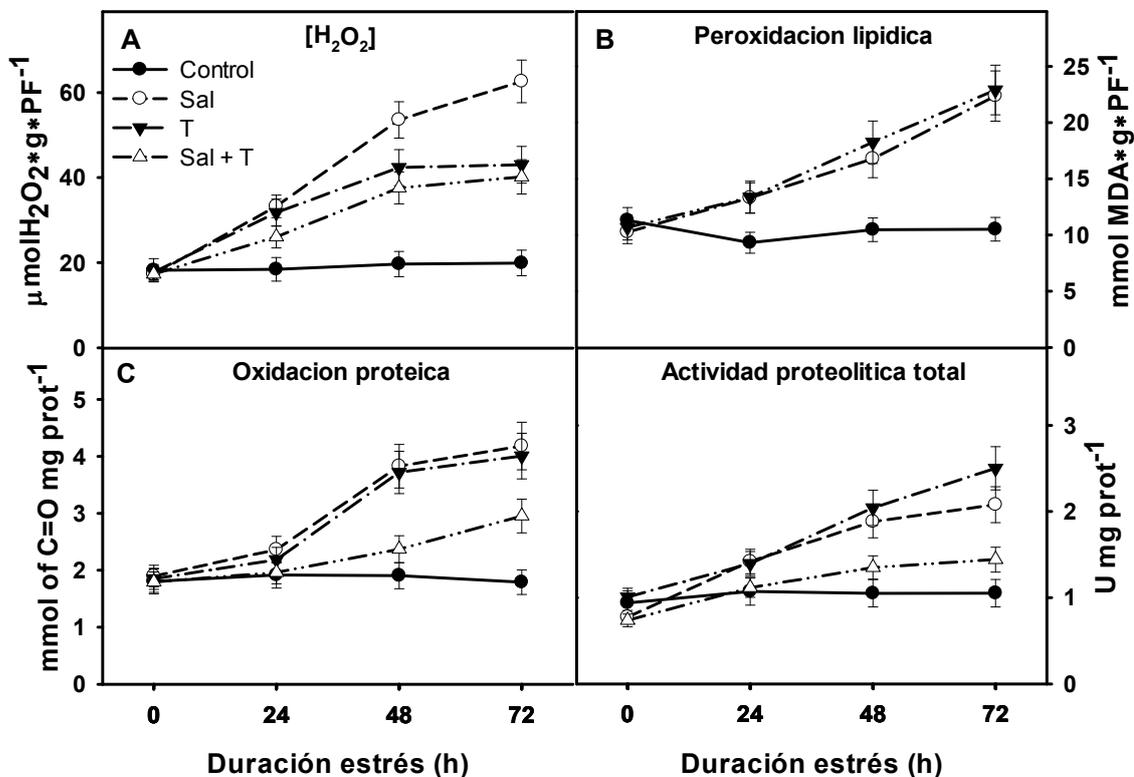


Figura 4.24. Estrés oxidativo observado en hojas de tomate cultivadas 72h con tratamientos control, salinidad (Sal), altas temperaturas (T) y la combinación de salinidad con altas temperaturas (Sal + T). (A) Concentración de peróxido de hidrógeno; (B) peroxidación lipídica medida como contenido de MDA; (C) oxidación proteica; (D) actividad proteolítica total. La figura es representativa de dos experimentos independientes. Los valores representan la media \pm EE (n=6).

4.2.10. Discusión

Este estudio fue diseñado para estudiar la respuesta primaria de las plantas de tomate a la combinación de salinidad y altas temperaturas, dos de los estreses ambientales más comunes que normalmente actúan conjuntamente en regiones áridas y semiáridas de todo el mundo. Ambos, salinidad y altas temperaturas, han sido ampliamente estudiados como estreses individuales y gracias a ello, el conocimiento básico hoy en día de los mecanismos fisiológicos y moleculares de la adaptación de las plantas a estos es enorme. Además, y como resultado de estos estudios, se han creado un gran número de cultivos genéticamente modificados (GMO, genetically modified organisms), los cuales han sido definidos como “tolerantes” debido al éxito de la experimentación llevada a cabo con ellos en el laboratorio. Sin embargo, sólo unos pocos de los muchos genes identificados como “tolerantes a un determinado estrés abiótico” en el laboratorio han sido probados en el campo, y los resultados de estos ensayos han sido generalmente decepcionantes, indicando a menudo que los resultados obtenidos dentro del laboratorio no son un indicador de confianza de lo que sucede en ambientes naturales (Mittler, 2006; Mittler y Blumwald, 2010).

Como demuestran nuestros resultados, la respuesta fisiológica primaria de las plantas de tomate a la salinidad o altas temperaturas aplicadas individualmente es coherente con todos los trabajos publicados anteriormente (Romero Aranda y col., 2001; Camejo y col., 2005; Wahid y col., 2007; He y col., 2009). Sin embargo, cuando los dos estreses se aplicaron conjuntamente, la respuesta fisiológica que se observó no era en ningún caso deducible de los experimentos con un solo estrés. Las plantas sometidas al tratamiento de combinación Sal + T crecieron más que las del tratamiento de salinidad, siendo este crecimiento similar al de las plantas del tratamiento de altas temperaturas (Figura 4.15). Los datos de crecimiento fueron coherentes con los datos obtenidos para los diferentes parámetros fotosintéticos analizados (Figura 4.20).

Las alteraciones provocadas por un determinado tipo de estrés sobre los parámetros fotosintéticos son buenos indicadores del daño que dicho estrés provoca en las plantas, ya que crecimiento/producción y fotosíntesis están íntimamente interconectadas. Cualquier restricción en la fotosíntesis limita el crecimiento de la planta y, en definitiva, la producción (Kocal y col., 2008; Tomaz y col., 2010). No obstante, la salinidad y las altas temperaturas suelen afectar a los procesos

fotosintéticos de manera diferente. En las plantas tratadas con sal, las principales causas que inhiben la fotosíntesis son el cierre estomático causado por la reducción en el contenido de agua celular y la reducción del transporte de asimilados (Hare y col., 1998). Como consecuencia, la acumulación de glucosa, fructosa y principalmente sacarosa en las hojas podría verse drásticamente reducida (Poljakoff-Mayber y Lerner, 1994). Por otra parte, las altas temperaturas afectan principalmente a las reacciones bioquímicas de la fotosíntesis, y dependiendo de la duración y la intensidad, las altas temperaturas pueden dañar de manera irreversible a la RuBisCO, complejos de evolución del oxígeno, la ultraestructura de los cloroplastos, las membranas de los tilacoides y los centros de reacción de PSII (Havaux, 1993; Allakhverdiev y col., 2003; Wang y col., 2009; Chen y col., 2012). Tal y como se muestra en nuestros resultados, la salinidad dio lugar a una importante inhibición de la fotosíntesis en comparación con las altas temperaturas, debido a un cierre estomático y a una menor eficiencia del PSII (Figura 4.20). El mantenimiento de una tasa de transpiración elevada es importante para las plantas que crecen bajo estrés por altas temperaturas, ya que esto les ayuda a hacer frente al incremento de temperatura en la hoja y al mismo tiempo protege los fotosistemas (Ilan y col., 1995). Nuestros resultados sugieren que cuando salinidad se aplica junto a altas temperaturas, este último estrés puede conceder algunas ventajas sobre la salinidad en sí. Esto se logra mediante un incremento de la tasa de transpiración y una disminución del daño en la actividad fotoquímica de PSII y del aparato fotosintético, lo que repercute directamente en un incremento en la tasa de asimilación de CO₂, y por último, de la tasa de crecimiento con respecto a las plantas crecidas únicamente con salinidad (Figuras 4.15 y 4.20). Por otra parte, se ha postulado que la acumulación de Na⁺ en las hojas puede tener un efecto perjudicial para la fotosíntesis (Marler, 1996; Shaheen y col., 2013). El tratamiento de Sal + T mostró una mayor concentración de este catión en las raíces comparado con el tratamiento salino (Figura 4.16), lo que podría ser interpretado como un mecanismo para evitar la acumulación en las hojas para proteger el aparato fotosintético de los efectos tóxicos de dicho catión.

Finalmente, ha sido publicado que la GB protege el complejo D1/D2/Cytb 559 del fotosistema II contra la inactivación inducida por luz y las altas temperaturas (Allakhverdiev y col., 2003). Nuestros resultados mostraron que las plantas cultivadas con altas temperaturas o Sal + T acumularon preferencialmente GB sobre otros

osmoprotectores, mientras que las plantas crecidas con salinidad tendían a acumular más prolina (Figura 4.21). Por lo tanto, GB podría tener además un importante papel en la protección de algunas proteínas fotosintéticas, y su acumulación podría ser relevante para conferirle tolerancia a la combinación de estreses Sal + T.

Salinidad y altas temperaturas son dos estreses que pueden causar una importante reducción del agua celular (Hare y col., 1998), generando un estrés hídrico. Bajo condiciones salinas la planta respondería frente a este estrés mediante la realización de un ajuste osmótico, el cual consiste en la acumulación de iones y solutos compatibles en la vacuola, incrementando así el potencial de turgor. Estos resultados han sido ya observados y publicados por otros autores (Munns, 1993; Romero Aranda y col., 2001). Sin embargo, un incremento en el potencial de turgor no está siempre relacionado con un incremento en el contenido de agua celular, ya que el tamaño de las células podría verse reducido bajo condiciones salinas (Munns, 1993). Romero Aranda y col. (2001) observaron que la salinidad redujo la expansión celular en plantas de tomate, lo que estaba asociado a una reducción del potencial osmótico y del potencial hídrico y a un incremento del potencial de turgor. Estos resultados están de acuerdo con los observados en nuestros experimentos (Figura 4.19).

Analizando las concentraciones de Na^+ y K^+ encontramos que la concentración de Na^+ fue mayor en las raíces de las plantas cultivadas con Sal + T, mientras que las plantas crecidas solo con salinidad acumularon más Na^+ en tallos y hojas en comparación con el tratamiento de combinación de estreses (Figura 4.16). La reducción en la absorción de Na^+ observada con el tratamiento de Sal + T pudo ser debida a una retro-inhibición provocada por la acumulación masiva de Na^+ en la raíz (Schulze y col., 2012). Esta acumulación estaría provocada por la disminución del transporte de Na^+ hacia la parte aérea (Figura 4.18 A). Adicionalmente, el estrés salino dio lugar a una inhibición de la absorción de K^+ (Figura 4.18 C), siendo estas plantas las que menor concentración de K^+ presentaron, y por lo tanto, la mayor relación Na^+/K^+ observada entre los tratamientos estudiados (Figura 4.17). La relación Na^+/K^+ es comúnmente utilizada como indicador de la tolerancia de las plantas a la salinidad (Blumwald, 2000) y en nuestro caso, las plantas desarrolladas con la combinación de salinidad y altas temperaturas mostraron una menor relación Na^+/K^+ debido a una mayor concentración de K^+ y una menor absorción de Na^+ que aquellas tratadas únicamente con salinidad. Por otro lado, ha sido postulado que algunos

osmoprotectores tienen la capacidad de ejercer una función reguladora manteniendo una concentración citosólica de K^+ óptima y previniendo la salida neta de K^+ de las células inducida por el NaCl (Cuin y Shabala, 2005). Por ejemplo, plantas de cebada tratadas con una baja concentración de GB aplicada de forma exógena eran capaces de mantener una elevada concentración de K^+ en las hojas y además se prevenía la salida neta de K^+ desde las raíces inducida por la sal (Cuin y Shabala, 2005). Más aún, Zhang y col. (2011) demostraron que la tolerancia de las plantas de algodón a la salinidad mejoraba tras la transformación de las mismas con el gen *betA* responsable de la síntesis de GB. En contraste con las plantas del tratamiento salino, las cuales no mostraron acumulación alguna de GB y parece ser que sufrieron una salida neta de K^+ desde la raíz (Figuras 4.18 C, 4.18 D), las plantas desarrolladas con la combinación de Sal + T mostraron una gran acumulación de GB (Figura 4.21) y ningún flujo de K^+ desde sus células hacia el exterior (Figuras 4.18 C, 4.18 D). Estos resultados demuestran que la GB puede de hecho ejercer un papel regulador sobre los sistemas que controlan la salida neta de K^+ de las células en condiciones de salinidad y así contribuir positivamente al mantenimiento de una relación Na^+/K^+ óptima para las células.

La acumulación de osmoprotectores juega importantes funciones en la adaptación de las células a varios estreses medioambientales (Nuccio y col., 1999) y dependiendo de la especie de planta y del tipo de estrés estudiado, las plantas acumulan preferencialmente unos osmoprotectores frente a otros. En nuestros experimentos, la salinidad y las altas temperaturas aplicadas como estreses simples o en combinación mostraron un perfil de acumulación de los mismos diferente, siendo la acumulación de sacarosa común a todos ellos (Figura 4.21). Tras 48h de estrés, las plantas desarrolladas con salinidad acumulaban preferencialmente prolina, mientras que el tratamiento Sal + T permitió una acumulación preferencial de GB. Adicionalmente a esta acumulación de GB, las plantas desarrolladas con Sal + T acumularon trehalosa, lo cual no fue observado con ninguno de los estreses aplicado de manera individual, por lo que podríamos concluir que la combinación de salinidad y altas temperaturas provoca en plantas de tomate un perfil de acumulación de osmoprotectores particular que incluye la GB y la trehalosa.

Bajo condiciones de salinidad, la acumulación de prolina observada fue el resultado de la activación de la síntesis de dicho osmoprotector y de la inhibición de su

degradación, tanto a nivel transcripcional como post- transcripcional (Figura 4.22). Un incremento en la síntesis de prolina en este tratamiento fue llevado a cabo fundamentalmente gracias a las actividades de las enzimas P5CS y P5CR, ya que la OAT parece estar bloqueada a nivel post-transcripcional. La síntesis de GB fue inhibida por las condiciones salinas a nivel transcripcional, mientras que la acumulación de sacarosa puede ser explicada por el incremento observado en la expresión de la mayoría de los genes que codifican para las enzimas responsables de la síntesis de dicho compuesto y la consiguiente represión de los que codifican para su degradación (Figura 4.23). Bajo condiciones de altas temperaturas, la acumulación de prolina fue interrumpida a nivel post-transcripcional, ya que bajo estas condiciones los genes que codifican para las enzimas que participan en la síntesis de dicho compuesto mostraron una sobre-expresión (Figura 4.23), pero la actividad de las mismas fue inhibida por las condiciones de estrés reinantes (Figura 4.22). Las altas temperaturas favorecieron la acumulación de GB a través de la activación, tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional de las enzimas implicadas en su síntesis. Igualmente, la acumulación de sacarosa mostró una estricta regulación a ambos niveles, es decir, transcripcional y mediante la regulación de la funcionalidad enzimática (Figura 4.22 y 4.23).

Cuando la salinidad y las altas temperaturas eran aplicadas conjuntamente, se observó una significativa inducción de la transcripción de la mayoría de los genes aquí estudiados (excepto por *LeP5CS* y *LeNI* y sus enzimas asociadas) (Figura 4.23). Bajo estas condiciones, la síntesis de prolina fue llevada a cabo a través de la ruta de la ornitina y gracias a la actividad OAT, ya que bajo estas condiciones, las actividades P5CS y P5CR fueron inhibidas y con ellas la síntesis de prolina a partir de glutamato (Figura 4.22). Sin embargo, las actividades de las enzimas implicadas en la degradación de la prolina (PDH y PO) fueron también fuertemente inducidas por estas condiciones ambientales, lo que podría adicionalmente explicar el que la prolina no se acumulara a niveles importantes en el tratamiento Sal + T. Estas condiciones también favorecieron la acumulación de sacarosa a niveles no tan importantes como los observados con el tratamiento salino o de altas temperaturas aplicados individualmente. Esto puede ser explicado por el hecho de que, aunque la degradación de sacarosa fue inhibida en el tratamiento Sal + T, su síntesis a través de las enzimas SPS y FK fue igualmente inhibida debido a modificaciones post-transcripcionales de

estas enzimas, tal y como muestran nuestros resultados. Por lo tanto, la acumulación de sacarosa observada en dicho tratamiento fue únicamente gracias a la actividad SS, y de ahí que los niveles encontrados de dicho compuesto bajo la combinación de salinidad y altas temperaturas no sean tan importantes como la observada con la aplicación de ambos estreses de forma individual. Mucho más evidente es la acumulación de GB en este tratamiento, la cual fue positivamente regulada tanto a nivel de gen como de enzima (Figuras 4.22 y 4.23).

Como resultado remarcable y totalmente inesperado, el tratamiento Sal + T fue el único tratamiento donde se observó una fuerte inducción de la síntesis y acumulación de trehalosa, tanto a nivel trascricional como de actividad de la enzima a través de T6PS (Figuras 4.22 y 4.23). Finalmente, la actividad FBPasa fue también específicamente regulada en dicho tratamiento, con niveles muy superiores a los encontrados en los estreses aplicados individualmente. La implicación de esta enzima en la gluconeogénesis puede ser considerado como un paso limitante en la síntesis y acumulación de almidón y trehalosa (ambos acumulados bajo estas condiciones y no con los estreses aplicados individualmente), ya que la actividad FBPasa es importante en la regeneración celular de glucosa (principal compuesto del esqueleto carbonado del almidón y de la trehalosa).

Ya que los tratamientos de altas temperaturas y Sal + T dieron lugar a una mayor cantidad de biomasa con respecto al tratamiento salino, así como a un contenido hídrico similar al encontrado en plantas control y a un mejor funcionamiento del aparato fotosintético por la mayor asimilación de CO₂ y eficiencia del PSII, podemos hipotizar que la acumulación de GB y de trehalosa pueden tener un papel fundamental en la protección de enzimas y proteínas fotosintéticas de plantas que tienen que crecer en ambientes donde la salinidad y las altas temperaturas son los estreses abióticos dominantes. Se ha demostrado que la GB mejora la actividad del complejo de evolución del oxígeno del PSII, protegiéndolo de la disociación de proteínas reguladoras que forman parte del núcleo de dicho complejo (Papageorgiou y Murata, 1995) y estabilizando la eficiencia fotoquímica del PSII (Zhang y col., 2008). La protección de estructuras celulares tales como membranas plasmáticas y tilacoidales frente a su desestabilización frente a las altas temperaturas también ha sido atribuida a la GB (Jolivet y col., 1982; Zhao y Harris, 1992).

Tanto los niveles de sacarosa, los cuales aumentaban significativamente bajo condiciones de salinidad, altas temperaturas o con la combinación de ambos, como la regulación de los mecanismos moleculares mediante los cuales se favorece la acumulación de dicho compuesto, eran similares en todos los estreses estudiados, por lo que podríamos concluir que la sacarosa es un osmoprotector común que se acumula bajo aquellas condiciones que generan un estrés osmótico, pero que no es un factor determinante para la tolerancia a la combinación de salinidad y altas temperaturas.

La función de la trehalosa en las respuestas al estrés está aún por determinar y en muchas ocasiones es controvertida. Se ha mostrado que la trehalosa tiene la habilidad de estabilizar membranas y proteger proteínas en aquellos tejidos con un alto índice de desecación, sugiriéndose así como una molécula con función de chaperona molecular (Crowe, 2007). Sin embargo, los niveles de trehalosa en la naturaleza, o incluso en aquellas plantas que han sido genéticamente modificadas para la sobre producción de este compuesto, permanecen por debajo de 1 mg/g de peso fresco, lo que sugiere que la trehalosa no funciona como osmoprotector en las plantas sino que se le atribuye otra función más específica (Garg y col., 2002). Ponnu y col. (2011) revisaron la relevancia molecular y las funciones que hasta el momento habían sido propuestas y parcialmente demostradas para la trehalosa en las plantas. De esta manera, se propuso que la trehalosa-6 fosfato (T6P), el precursor de la trehalosa, es importante para la regulación del metabolismo del carbono, por participar en la inducción de la síntesis del almidón en los plastos (Wingler, 2002; Kolbe y col., 2005; Lunn y col., 2006; Lunn, 2007; Singh y Shah, 2012). Schluempmann y col. (2004) propusieron que la habilidad de las plantas para utilizar sacarosa aumentaba cuando las concentraciones de trehalosa eran elevadas. La trehalosa también ha sido asociada con la capacidad de inducción de la fotosíntesis, con el desarrollo de las plantas y con el crecimiento celular mediante una ruta reguladora, donde T6P, SnRK1 y bZIP 11 están interconectadas (Ponnu y col., 2011). De este modo, se ha propuesto que cuando el contenido en sacarosa y la concentración de T6P disminuyen, SnRK1 es activado, lo que conlleva a la inducción de genes involucrados en los procesos relacionados con la fotosíntesis, de esta manera una mayor cantidad de carbono estaría disponible para el crecimiento de las células (Delatte y col., 2011).

En plantas de tomate desarrolladas bajo condiciones control, la trehalosa está presente en unas cantidades muy bajas (0.5-0.7 $\mu\text{g/g}$ PF). Sin embargo, esas concentraciones aumentaban hasta en 18 veces las del control cuando la salinidad era combinada con altas temperaturas (Figura 4.21). Nuestros resultados muestran una mayor acumulación de almidón en plantas tratadas con ambos estreses abióticos combinados en comparación con los estreses simples o con el control, lo que estaría relacionado con la disminución en el contenido de sacarosa descrito anteriormente por Schluepmann y col. (2004). El incremento en la capacidad fotosintética y en la eficiencia del PSII podrían ser también explicadas por la función reguladora de la trehalosa sobre este proceso, como propuso Lunn (2007). Además, Garg y col. (2002) sugirieron que la reducción del daño foto-oxidativo observado en plantas con incrementos en sus niveles de trehalosa podría ser debido a modulaciones reguladoras del metabolismo del carbono, lo que apoyaría también nuestros resultados.

Es bien conocido y ha sido ampliamente publicado que la acumulación de ROS es el resultado de la actuación de numerosos estreses abióticos sobre las plantas, como salinidad, altas temperaturas, sequía, etc (Mittler, 2002; Mittler y col., 2004; Rivero y col., 2004; Rivero y col., 2007; Gill y Tuteja, 2010; Miller y col., 2010; Mestre y col., 2012). Los compuestos osmoprotectores tienen la capacidad de detoxificar ROS directamente y además contribuyen a la protección de enzimas implicadas en el sistema antioxidante de las plantas. En este sentido, se ha sugerido a la prolina como un desactivador del oxígeno singlete (uno de los radicales oxidativos más dañinos para las células durante periodos de estrés osmótico), reduciendo así el daño de dichas moléculas, como puede ser una peroxidación lipídica de las membranas celulares (Smirnoff y Cumbes, 1989; Mehta y Gaur, 1999; Hong y col., 2000; Matysik y col., 2002; Siripornadulsil, 2002; Wang y col., 2009). Por ejemplo, remojando las yemas de tejidos en desarrollo en soluciones que contenían prolina y GB se reducía considerablemente la producción de H_2O_2 , se incrementaba la acumulación de azúcares y además se protegía a los tejidos de los efectos del estrés térmico (Rasheed y col., 2010). La protección del aparato fotosintético con GB durante el estrés puede reducir la acumulación de ROS y minimizar la peroxidación lipídica durante el estrés por salinidad (Demiral y Turkan, 2004; Chen y Murata, 2008). Por otra parte, también se ha demostrado que los ROS promueven la salida de K^+ desde

las células epidérmicas de la raíz, lo cual era significativamente reducido mediante la aplicación exógena de algunos osmoprotectores, como son la prolina, la GB, el manitol, el mio-inositol y la trehalosa (Cuin y Shabala, 2007). Nuestros experimentos muestran que las plantas que acumulaban GB (aquellas desarrolladas bajo altas temperaturas o con la combinación de salinidad y altas temperaturas) presentaron valores más bajos de acumulación de H_2O_2 tras 72h de exposición al estrés, aunque la peroxidación lipídica fue similar a aquellas que acumularon preferencialmente prolina (tratamientos salinos). Sin embargo, el tratamiento Sal + T mostró un nivel de oxidación proteica y una actividad proteolítica menor que la observada cuando dichos estreses eran aplicados de manera independiente y cercanos a plantas control (Figura 4.24). La diferencia más notable entre el tratamiento Sal + T y los estreses aplicados individualmente fue una acumulación combinada de GB y trehalosa. De esta manera, nuestro estudio resalta la importancia de la acumulación de GB y trehalosa en plantas que tengan que ser expuestas a la combinación de salinidad y altas temperaturas.

La absorción y transporte de Na^+ y K^+ , la acumulación de osmoprotectores y la expresión de genes y enzimas responsables de la acumulación observada con la combinación de estreses, fueron diferentes de las observadas cuando cada estrés fue aplicado de forma individual, y no podía ser deducido de las respuestas independientes de las plantas a cada estrés en particular. La acumulación de GB y su relación con el mantenimiento de una alta concentración de K^+ , y por tanto, de una baja relación Na^+/K^+ podría ser considerado para futuras investigaciones relacionadas a la tolerancia a la salinidad. Además, la trehalosa podría tener una función relevante en conferir tolerancia en la combinación de estreses, mediante la protección de las proteínas de los procesos oxidativos. Nuestro estudio abre una nueva puerta para la investigación en el desarrollo de plantas y cultivos con un incremento en la tolerancia a la combinación de estreses abióticos, con el objetivo común de minimizar las pérdidas de producción en cultivos en condiciones ambientales de campo.

4.3. Mecanismos responsables de la aparición de la podredumbre apical o blossom-end rot (BER) en frutos de tomate en plantas sometidas a deficiencia de calcio

Con el fin de profundizar en las causas que desencadenan la aparición de podredumbre apical (BER) se realizó un experimento en el que se crecieron plantas de tomate de la variedad Micro-Tom con tres concentraciones de Ca^{2+} , 1 mM (control), 0.5 mM y 0.1 mM. El objetivo de este experimento fue estudiar si el estrés oxidativo era el responsable de la aparición de BER y más concretamente si la ruptura en la homeostasis de glutatión podría ser el principal factor de inducción del estrés oxidativo. Este experimento se llevó a cabo en cámara de cultivo.

4.3.1. Biomasa y producción, incidencia de BER y concentración de Ca^{2+} en hojas y frutos

El peso fresco y seco de hojas, tallo y raíces de las plantas de Micro-Tom cultivadas con diferentes tratamientos de Ca^{2+} (0.1 mM, 0.5 mM y 1 mM) no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$ -ns), y el crecimiento vegetativo fue similar en todas las plantas independientemente del tratamiento aplicado (Figura 4.25).

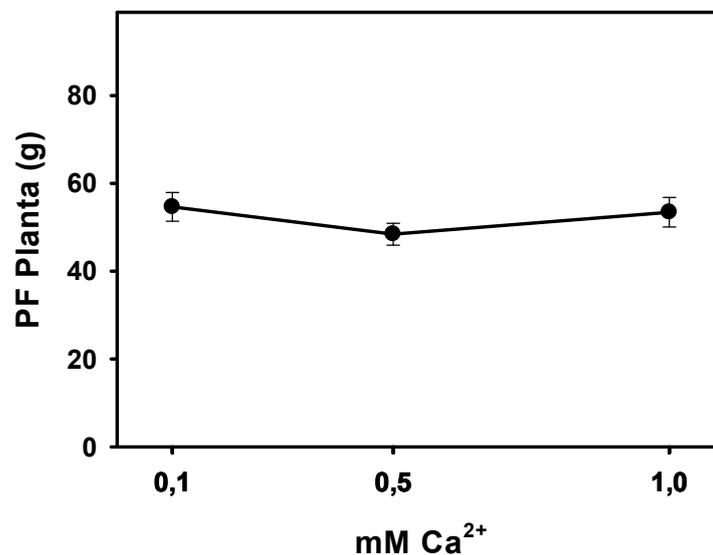


Figura 4.25. Desarrollo vegetativo de microtomate en función de la concentración de Ca^{2+} en la solución nutritiva. Los puntos representan el peso fresco de hoja, tallo y raíz. Los valores representan la media \pm EE ($n=15$).

Sin embargo, se observó una relación directa entre el incremento de la concentración de calcio y el rendimiento en gramos por planta. La mayor producción fue obtenida cuando se utilizó la concentración óptima de Ca^{2+} (1 mM), y con la aplicación de 0.5 y 0.1 mM de Ca^{2+} dicha producción se redujo significativamente ($p < 0.01^{**}$) en un 7% y 19% respectivamente con respecto a las plantas control (1 mM Ca^{2+}) (Figura 4.26).

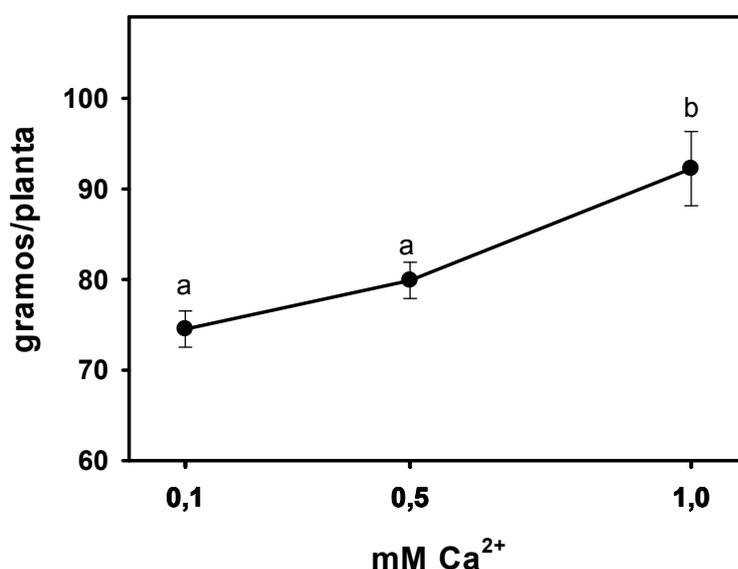


Figura 4.26. Producción en gramos de frutos totales por planta cultivada con diferente concentración de Ca^{2+} . Los valores representan la media \pm EE ($n=15$).

Entre los tratamientos aplicados de Ca^{2+} , sólo 0.1 mM produjo desarrollo de BER en los frutos, y de este tratamiento, sólo el 53% de los frutos desarrollaron este desorden fisiológico (Figura 4.27). El hecho de tener frutos con BER y sin BER en la misma planta y en el mismo tratamiento nos ofrecía una herramienta para investigar el desarrollo de BER en los frutos de tomate de la misma planta. Por ello, esos frutos fueron procesados por separado para los análisis realizados a continuación. Cabe destacar que los valores obtenidos de todos los parámetros analizados de frutos aparentemente sanos (sin BER) crecidos con 0.1 mM de Ca^{2+} fueron similares a los

cultivados en 0.5 mM de Ca^{2+} . Por lo tanto, cualquier referencia a los frutos sanos cultivados en 0.1 mM de Ca^{2+} se deduce del tratamiento 0.5 mM de Ca^{2+} .

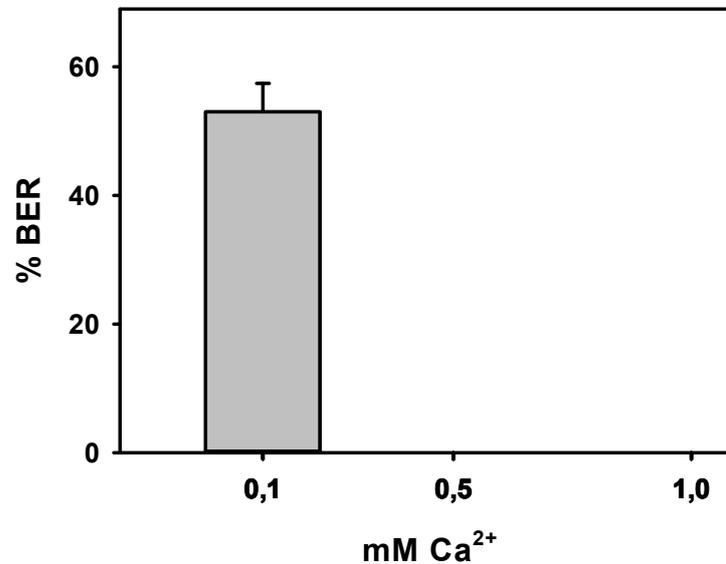


Figura 4.27. Porcentaje de frutos con BER en plantas cultivadas con diferente concentración de Ca^{2+} . Los valores representan la media \pm EE ($n=5$).

De manera similar a los resultados obtenidos para la producción, la concentración de Ca^{2+} en hojas y frutos estuvo directamente correlacionada con el tratamiento de Ca^{2+} aplicado. Específicamente, la mayor concentración de calcio se obtuvo en hojas (Figura 4.28 A) y frutos (Figura 4.28 B) de las plantas cultivadas con 1 mM de Ca^{2+} , y se redujo en 42% en hojas y en 26% en frutos (Figura 4.28 B) en las plantas cultivadas con 0.1 mM de Ca^{2+} con respecto a los controles (1 mM Ca^{2+}). Entre los frutos obtenidos en el tratamiento 0.1 mM, los que tenían BER tuvieron una concentración de Ca^{2+} un 30% menor que los aparentemente sanos (sin BER) del mismo tratamiento (Figura 4.28 B).

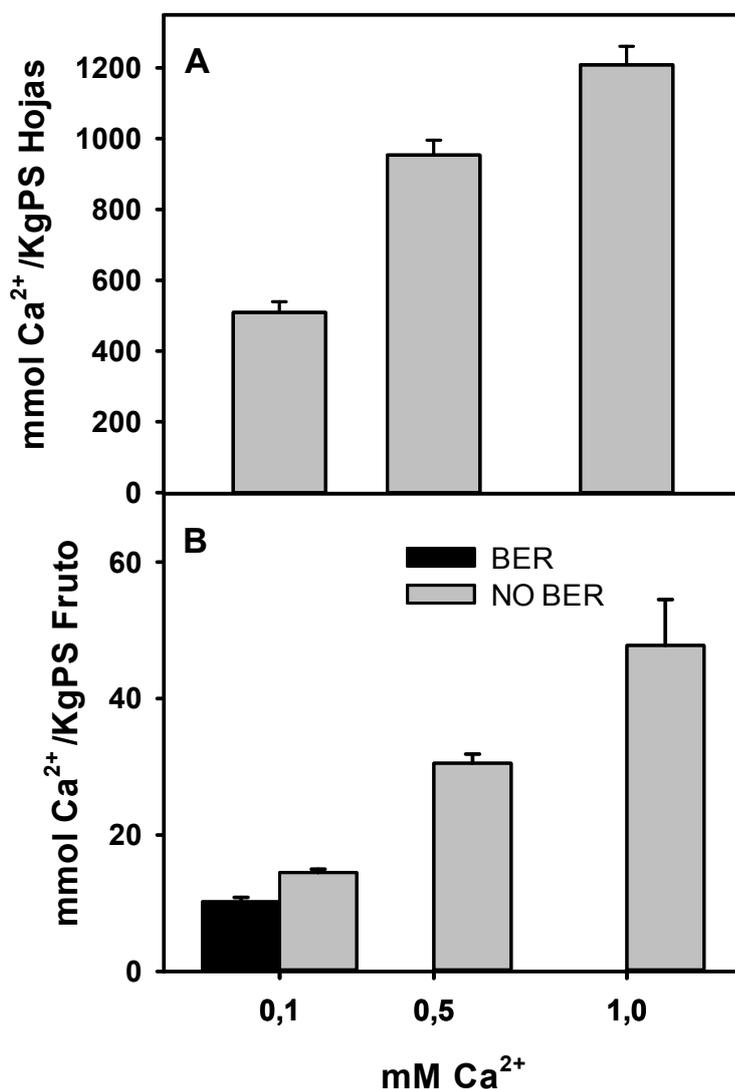


Figura 4.28. Concentración de Ca^{2+} en hojas (A) y frutos sanos (barras grises) o con síntomas de BER (barra negra) (B) de plantas de tomate cultivadas con diferente concentración de Ca^{2+} . Los valores representan la media \pm EE ($n=15$).

4.3.2. Concentración de peróxido de hidrógeno y peroxidación lipídica

Los niveles de H_2O_2 (Figura 4.29 A) y malonildialdehído (MDA), como producto de degradación resultante de la peroxidación lipídica de las membranas celulares (Figura 4.29 B), mostraron un comportamiento similar con la aplicación de los diferentes tratamientos. Las plantas cultivadas con 0.5 mM y 1 mM de Ca^{2+} mostraron

los niveles más bajos de estos compuestos, no habiendo diferencias significativas entre ellos. Los frutos recolectados de las plantas cultivadas con 0.1 mM de Ca^{2+} tuvieron la mayor acumulación de estos compuestos, incrementándose hasta 6 veces la concentración H_2O_2 (Figura 4.29 A) y 2 veces el MDA (Figura 4.29 B) comparado con el tratamiento control. De hecho, ambos compuestos mostraron una correlación positiva significativa (H_2O_2 -MDA: $r=0.991^{***}$), indicando la relación directa entre la acumulación de H_2O_2 y la peroxidación lipídica.

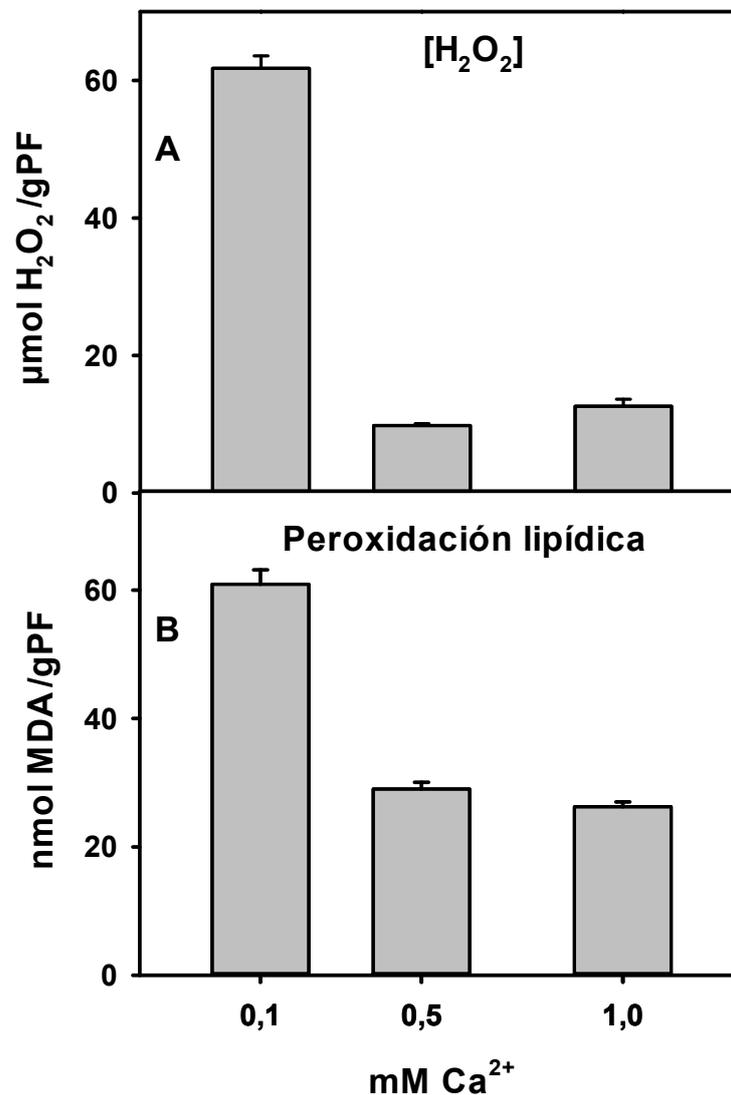


Figura 4.29. Concentración de H_2O_2 (A) y peroxidación lipídica (B) medida como contenido de MDA en frutos de plantas de Micro-Tom cultivadas con distintos tratamientos de Ca^{2+} . Los valores representan la media \pm EE ($n=15$).

La acumulación de ambos compuestos mostraron una correlación positiva y significativa con la incidencia de BER en el fruto (BER-H₂O₂: r=0.991***; BER-MDA: r=0.953***), lo que nos llevó a pensar el que un estrés oxidativo fuese el responsable (directo o indirecto) del desarrollo de BER.

4.3.3. CAT, SOD y enzimas antioxidantes de la ruta ascorbato-glutathión.

En el tratamiento de 0.1 mM la actividad CAT disminuyó drásticamente, con valores que fueron hasta un 75% más bajos que los obtenidos cuando la concentración de Ca²⁺ aplicada fue de 0.5 y 1 mM (Figura 4.30). Por el contrario, se observó una correlación negativa y significativa entre la actividad de CAT y la concentración de H₂O₂ (r=-0.950***), lo que nos permite deducir que una inhibición de CAT podría dar lugar a una acumulación de H₂O₂.

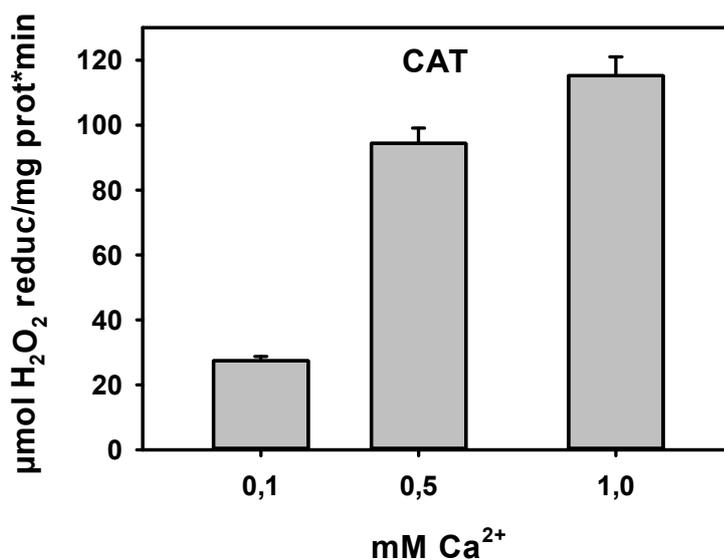


Figura 4.30. Actividad catalasa en frutos de *Micro-Tom* cultivados con diferentes tratamientos de Ca²⁺. Los valores representan la media ± EE (n=15).

La actividad SOD, como la primera barrera de defensa para la detoxificación de ROS, mostró un comportamiento inversamente proporcional al tratamiento de Ca^{2+} aplicado, obteniendo niveles normales y óptimos para esta enzima cuando se aplicó 1 mM de Ca^{2+} y con un incremento progresivo a medida que la concentración de Ca^{2+} de la solución nutritiva era menor (Figura 4.31 A). Sin embargo, la actividad SOD en los frutos recolectados de las plantas crecidas con 0.1 mM de Ca^{2+} se vio 5 veces incrementada con respecto a los frutos control (1 mM Ca^{2+}). Por otra parte, la actividad SOD mostró una correlación significativa y positiva con la concentración de H_2O_2 ($r=0.867^{**}$).

En cuanto a la actividad de las enzimas antioxidantes pertenecientes a la ruta ascorbato-glutación (APX, DHAR, GR y NADPH oxidasa), la aplicación de 0.5 y 1 mM de Ca^{2+} en la solución nutritiva mantuvo la actividad de todas estas enzimas en valores considerados normales para frutos de tomate recolectados de plantas cultivadas bajo condiciones óptimas (Figuras 4.31 B, C, y F). Sin embargo, la aplicación de 0.1 mM de Ca^{2+} provocó la activación o la inhibición de éstas dependiendo de la enzima estudiada. De esta manera, para APX y GR, la aplicación de 0.1 mM de Ca^{2+} produjo una inhibición de las mismas, con reducciones en sus actividades del 96% y 91%, respectivamente (Figuras 4.31 B y E). Por el contrario, la deficiencia de Ca^{2+} resultó en un incremento en la actividad de DHAR, MDHAR y NADPH oxidasa de hasta 8 veces, 24 veces y 10 veces, respectivamente (Figuras 4.31 C, D, y F).

Las actividades APX y GR estaban correlacionadas negativa y significativamente con los niveles de H_2O_2 (APX- H_2O_2 : $r=-0.958^{***}$; GR- H_2O_2 : $r=-0.977^{***}$), lo que indica el papel de estas enzimas en la detoxificación de H_2O_2 . Algo similar se observó entre las correlaciones establecidas entre estas enzimas y la incidencia de BER (APX-BER: $r=-0.973^{***}$; GR-BER: $r=-0.985^{***}$), lo que podría indicar la importancia de estas enzimas en el desarrollo de BER. Por otra parte, la correlación entre la enzima NADPH oxidasa y la concentración de H_2O_2 fue positiva y altamente significativa ($r= 0.982^{***}$), indicando su papel en la producción de ROS en los frutos.

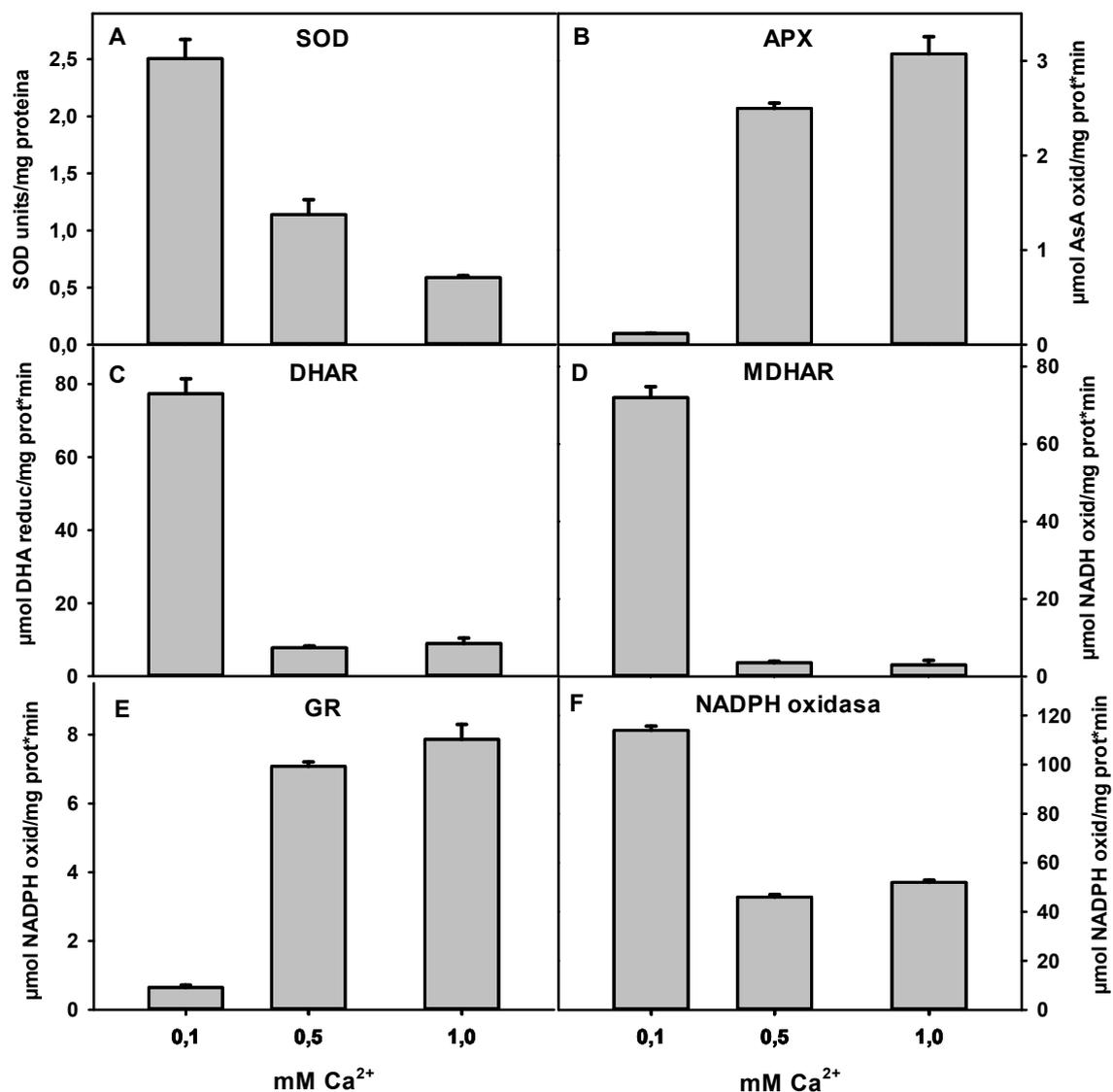


Figura 4.31. Actividad de las enzimas del ciclo ascorbato-glutati3n en frutos de *Micro-Tom* cultivados con diferentes tratamientos de Ca^{2+} . Se utiliz3 siempre tejido sano de los frutos con BER para realizar los an3lisis. Los valores representan la media \pm EE (n=15).

4.3.4. Formas de ascorbato y glutati3n

Las concentraciones de AsA y DHA fueron significativamente diferentes dependiendo del tratamiento de Ca^{2+} aplicado. Las concentraciones de estas dos formas de ascorbato fueron mayores cuando la concentraci3n de Ca^{2+} fue de 0.1 mM comparado con los tratamientos de 0.5 mM y 1 mM, mostrando un incremento de hasta 2 veces para el AsA y 2.5 veces para el DHA (Tabla 4.19). Sin embargo, el

estado redox del ascorbato no fue afectado por los tratamientos de Ca^{2+} aplicados, mostrando valores muy similares a los establecidos para condiciones control.

Por otra parte, las concentraciones para las dos formas de glutatión se vieron bastante modificadas cuando la concentración de Ca^{2+} en el medio fue de 0.1 mM, comparados con los otros tratamientos de Ca^{2+} . Para GSH, la deficiencia de Ca^{2+} en la solución nutritiva redujo su concentración en 92%, si lo comparamos con la concentración obtenida para los tratamientos de 0.5 y 1 mM de Ca^{2+} . Por el contrario, la concentración de GSSG se incrementó 10 veces con la aplicación de 0.1 mM de Ca^{2+} comparados con los otros dos tratamientos (Tabla 4.19). Estas diferencias también fueron observadas para los valores obtenidos sobre el estado redox del glutatión, el cual fue drásticamente reducido (93% comparado con los controles) en aquellos frutos desarrollados en un medio con deficiencia de Ca^{2+} .

Tabla 4.19. Formas de ascorbato y glutatión y su estado celular redox en frutos de plantas *Micro-Tom* cultivadas con diferentes tratamientos de Ca^{2+} . Los valores representan las medias \pm EE ($n=15$). Los niveles de significancia se presentan con * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ y ns con ANOVA $p>=0.05$.

| Tratamientos Ca^{+2} | AsA $\mu\text{mol g PF}^{-1}$ | DHA $\mu\text{mol g PF}^{-1}$ | Estado Redox Ascorbato (%) | GSH $\mu\text{mol g PF}^{-1}$ | GSSG $\mu\text{mol g PF}^{-1}$ | Estado Redox Glutatión (%) |
|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| 0.1 mM | 15.02 \pm 1.24 | 1.04 \pm 0.14 | 93.38 \pm 0.86 | 23.08 \pm 1.78 | 311.6 \pm 7.94 | 6.06 \pm 0.19 |
| 0.5 mM | 7.41 \pm 1.58 | 0.41 \pm 0.11 | 94.37 \pm 1.36 | 308.19 \pm 10.9 | 23.34 \pm 1.12 | 93.82 \pm 1.34 |
| 1 mM | 7.16 \pm 1.01 | 0.39 \pm 0.11 | 94.61 \pm 1.21 | 312.54 \pm 9.82 | 31.16 \pm 1.37 | 90.81 \pm 3.66 |
| <i>Signif</i> | * | ** | n.s. | *** | *** | *** |

4.3.5. Discusión

La deficiencia de calcio afecta a la producción, a la distribución del calcio en el fruto y conduce al desarrollo de BER

El Ca^{2+} es un macronutriente esencial y se transporta en las plantas gracias a la corriente de transpiración. Como el Ca^{2+} es un elemento poco móvil en la planta, cortos periodos de deficiencia de Ca^{2+} afectan rápidamente al crecimiento de tejidos y la producción de frutos en las plantas (Kleemann, 2000; Olle y Bender, 2009). Nuestros resultados demostraron que la deficiencia de Ca^{2+} afectó negativamente a la producción de frutos (Figura 4.26). Además y, acrecentando aún más este problema, los frutos son órganos de baja transpiración, lo que podría explicar la baja concentración de Ca^{2+} obtenida en frutos comparado con el de las hojas (Figura 4.28), ya que la mayor parte del Ca^{2+} en plantas de tomate es transportado a las hojas a través de la corriente de transpiración y permanece allí (Olle y Bender, 2009). Cabe resaltar que, aparte de la importancia de la reducción de la concentración de Ca^{2+} que existe en frutos cultivados con deficiencia de Ca^{2+} , también se detectó menos Ca^{2+} en frutos visualmente afectados por BER comparados con aquellos aparentemente sanos, pero que también fueron cultivados bajo deficiencia de Ca^{2+} (0.1 mM). Como reflejan nuestros datos, parece claro que la causa subyacente de la aparición de BER es una cantidad insuficiente de Ca^{2+} en la parte apical del fruto (Taylor y col., 2004; Casado-Vela y col., 2005). Sin embargo, nuestros datos demuestran que incluso bajo extrema deficiencia de Ca^{2+} (0.1 mM), sólo la mitad de los frutos mostraron síntomas visuales de BER (Figura 4.27). De esta manera, concluimos que deben existir otros factores relacionados con la deficiencia de Ca^{2+} que conducen al desarrollo de BER.

BER como síntoma visual de peroxidación lipídica

En los últimos años, el papel del Ca^{2+} como principal inductor de BER ha sido cuestionado. Esto es porque no se ha establecido un nivel de Ca^{2+} crítico para la aparición de BER en frutos (Nonami y col., 1994), porque BER puede ser inducido por otros estreses medioambientales independientemente de que en el medio haya una deficiencia de Ca^{2+} o no, y porque BER puede ser incluso inducido por cambios en las concentraciones de otros nutrientes (Nukaya y col., 1995; Ho y White, 2005). Además, la principal cuestión que queda sin aclarar aún es si el desarrollo de BER en frutos de

tomate se debe a un trastorno relacionado con el Ca^{2+} o es una causa aparente de un estrés ambiental. Saure (2001) concluyó que los factores adicionales a un estrés metabólico podrían estar relacionados con la aparición de BER. Sin embargo, estos factores aún no han sido identificados. Por ello, este trabajo fue diseñado para poder identificar otros mecanismos causantes de la aparición de BER.

El Ca^{2+} desempeña un papel muy importante en la resistencia al estrés abiótico y biótico, manteniendo la estabilidad e integridad de la membrana celular, regulando el metabolismo de las plantas, así como coordinando las diferentes respuestas de las plantas frente a los estreses ambientales (Bush, 1995; Braam y col., 1996; Webb y col., 1996). Las condiciones ambientales que pueden causar BER (altas temperaturas, alta intensidad lumínica, déficit hídrico, y alta salinidad) pueden también causar estrés oxidativo (Aktas y col., 2005). Se ha demostrado que la acumulación de radicales libres de oxígeno y H_2O_2 producen peroxidación lipídica (Rivero y col., 2002; Garcia y col., 2003; Rivero y col., 2004; Rivero y col., 2007), lo que puede aumentar la permeabilidad de la membrana y, con ello, facilitar la salida de solutos, agua, iones y otros compuestos celulares importantes, dando lugar a un deterioro del tejido (Moran y col., 1994; Aktas y col., 2005). Nuestros resultados muestran que la aplicación de 0.1 mM de Ca^{2+} produjo gran acumulación de H_2O_2 , lo que dio lugar a un incremento de la peroxidación lipídica (Figura 4.29). Esta peroxidación lipídica podría ser un síntoma visual de BER. De hecho, los frutos aparentemente sanos (sin BER) de las plantas cultivadas con 0.1 mM de Ca^{2+} mostraron valores de concentración de H_2O_2 y peroxidación lipídica similares a los cultivados en 0.5 mM de Ca^{2+} . Suzuki y col. (2003) han demostrado que el colapso celular en la epidermis y en áreas del parénquima subepidérmico aparentemente necróticas, fueron los primeros síntomas observados en frutos de tomate con BER. Por otra parte, Turhan y col. (2006) postularon que, aunque H_2O_2 pudiera estar relacionado con la incidencia de BER, no estaría involucrado en determinados cultivares sensibles al BER.

Alteración de las enzimas ascorbato-glutación por la acumulación de H₂O₂ bajo deficiencia de calcio

Las plantas han desarrollado un fuerte sistema antioxidante para prevenir los daños relacionados con ROS, compuesto por una serie de enzimas (SOD, CAT y las enzimas del ciclo ascorbato-glutación) y compuestos antioxidantes de bajo peso molecular, como el ácido ascórbico y el glutatión, entre otras (Noctor y Foyer, 1998; Foyer y Noctor, 2005). La actividad SOD, considerada como primera barrera enzimática celular que detoxifica radicales de oxígeno a H₂O₂, fue altamente inducida en frutos con BER (Figura 4.31 A). En este sentido, los niveles celulares de H₂O₂ deberían haberse mantenido bajos, siendo detoxificados de las células por las peroxidasas, CATs y las enzimas del ciclo ascorbato-glutación. Nuestros resultados mostraron un incremento en la actividad de SOD además de una fuerte inhibición de CAT, APX y GR en frutos afectados por BER comparados con frutos sanos, mientras que las actividades DHAR y MDHAR estaban altamente inducidas en esos frutos (Figuras 4.30 y 4.31). La inducción de SOD, junto con la inhibición de CAT y APX, podrían explicar los niveles altos de H₂O₂ en estos frutos. Otra evidencia de la implicación del metabolismo oxidativo en la aparición de BER se encontró al realizar el análisis de correlación entre las actividades de estas enzimas y el contenido de H₂O₂ con la aparición de BER. Más aún, los altos niveles de DHAR y MDHAR encontrados en estos frutos podría deberse a su implicación en la regeneración de AsA y DHA para poder mantener una pequeña reserva de AsA oxidado. Hernandez y col. (2001) demostraron que H₂O₂ y los radicales de oxígeno, así como los niveles de ácido ascórbico y la actividad SOD incrementaban en el apoplasto de hojas de guisantes bajo condiciones salinas, sugiriendo que podría ser parte de un mecanismo de tolerancia a dicho estrés. Finalmente, también observamos un incremento en la actividad de NADPH oxidasa (Figura 4.31 F), la cual podría explicar la acumulación incontrolada de ROS observada bajo estas condiciones. Sagi y Fluhr (2006) también demostraron el papel de NADPH oxidasa en la producción de ROS.

La homeostasis de Glutatión como posible responsable del desarrollo de BER

Es bien conocido el papel que tienen los principales antioxidantes manteniendo bajo control la concentración de ROS a niveles celulares. El ácido ascórbico y el glutatión son los compuestos antioxidantes celulares por excelencia. Ha sido

demostrado que el contenido de ácido ascórbico (AsA) disminuye en el apoplasto del fruto antes de que aparezcan los síntomas necróticos de BER (Turhan y col., 2006). Sin embargo, nuestros resultados mostraron un incremento significativo de AsA y DHA en los frutos con síntomas de BER en comparación con los sanos.

Para ver un efecto o una implicación fisiológica del ácido ascórbico sobre la capacidad antioxidante de las células, hay que aludir a un parámetro conocido como el estado redox del ascorbato, definido como los niveles de AsA/DHA. Nuestros resultados muestran que no hubo diferencias significativas de este parámetro entre los frutos con BER y sin BER, así que la implicación del ácido ascórbico en el desarrollo del BER sería dudosa en este caso. La inhibición de la actividad APX bajo deficiencia de Ca^{2+} seguida por una fuerte inducción de DHAR y MDHAR se podría explicar cómo actividades enzimáticas inducidas para proteger la poca reserva de AsA restante de la oxidación. Pallanca y Smirnoff (2000) encontraron algo similar en plántulas de guisantes y lo postularon de la misma forma, lo que apoyaría nuestros resultados.

Glutación es otro de los principales compuestos antioxidantes celulares (GSH). Se ha demostrado que GSH está implicado en varias e importantes funciones relacionadas con la protección celular frente a la mayoría de estreses ambientales, así como en la neutralización directa de radicales libres y compuestos reactivos de oxígeno, en la regulación del ciclo de óxido nítrico, en la síntesis y reparación del ADN, en la síntesis de proteínas, en el transporte de aminoácidos y en la activación directa de enzimas (Noctor y Foyer, 1998; Foyer y Noctor, 2005; Sharma y Dietz, 2009), entre otras. Glutación está también involucrado en la formación de fitoquelatinas y junto con su forma oxidada (GSSG) completa la pareja redox (GSH/GSSG) necesaria para el mantenimiento de la homeostasis celular y los sistemas de señalización de las plantas (Rauser, 1995; Ha y col., 1999; Clemens, 2006; Srivalli y Khanna-Chopra, 2009). Esto nos lleva a sugerir que la proporción GSH/GSSG, indicador del equilibrio redox de la célula, podría estar implicada en la percepción de los ROS (Shao y col., 2008). Nuestros datos demostraron que los niveles de GSH se redujeron drásticamente con 0.1 mM de Ca^{2+} , mientras que GSSG (en la forma oxidada) se incrementó 10 veces con respecto a los frutos control (Tabla 4.19). Esto se puede traducir que en los frutos que estaban afectados con BER, el estado redox del glutación fue drásticamente reducido. De hecho, los valores de la relación GSH/GSSG eran relativamente normales en los frutos aparentemente sanos de las plantas crecidas con 0.1 mM de

Ca^{2+} y fueron similares a los valores encontrados en los frutos cultivados a 0.5 mM de Ca^{2+} . De Freitas y col. (2011) mostraron mediante un análisis de transcriptómica de tejidos de frutos sanos que sobreexpresaban el gen sCAX1 (intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$) que se producía la sobreexpresión de otros genes que podrían estar implicados en la limitación de la expansión de los daños por BER, como fueron la glutatión-S transferasa, lo que apoyaría nuestros resultados. Por otra parte, la inhibición observada de la actividad GR en nuestros frutos con deficiencia de Ca^{2+} podría explicar el desequilibrio hallado en la forma GSH con respecto a los niveles de GSSG en estos tratamientos.

Todos nuestros resultados apuntan a que GSH juega un papel importante en el desarrollo de BER. La actividad GR, siendo dicha enzima la responsable de mantener la homeostasis de GSH y su concentración celular, debe estar debidamente regulada para evitar la aparición de BER. Por lo que concluimos que estos dos factores, tanto los niveles de GSH como la actividad GR, son críticos para la aparición o no de BER en frutos.

Existe mucha controversia en si el Ca^{2+} es el primer y principal factor que causa la incidencia de BER en los frutos de tomate. Está claro que la señalización del Ca^{2+} está implicada en el proceso, pero la ruta o el mecanismo o los mecanismos que la activan todavía no están claros. Existen numerosos estudios que se han centrado en el efecto del Ca^{2+} (Ho y White, 2005; Olle y Bender, 2009) y /o en el efecto de varios estreses ambientales (Saure, 2001; Aktas y col., 2005; Rodriguez-Serrano y col., 2009) en la incidencia del BER sin resultados claros. Análisis de transcriptómica o proteómica han apuntado a la regulación del metabolismo oxidativo como uno de los principales procesos que podrían ser los responsables de este desarrollo (Casado-Vela y col., 2005; De Freitas y col., 2011). Aquí no sólo hemos demostrado el importante papel del metabolismo oxidativo en la aparición de BER en frutos de tomate, sino que también hemos mostrado que la función de ciertas enzimas y compuestos son clave en el desarrollo de este trastorno fisiológico.

Nuestros resultados indican que la deficiencia de Ca^{2+} afectó a la actividad de las principales enzimas responsables de la detoxificación de ROS, produciéndose la acumulación de H_2O_2 . La acumulación de este compuesto podría haber llevado a un incremento de la peroxidación lipídica, así como a la inhibición de otras enzimas, con

el consecuente incremento en permeabilidad y rotura de las membranas y la aparición de síntomas visuales en el fruto conocido como BER. Más importante, la actividad GR, siendo dicha enzima la responsable de mantener la homeostasis de GSH y su concentración celular, debe estar debidamente regulada para evitar la aparición de BER. Por lo que concluimos que estos dos factores, tanto los niveles de GSH como la actividad GR, son críticos para la aparición o no de BER en frutos.

La figura 4.32 trata de simplificar la hipótesis de este estudio. El mecanismo propone a la homeostasis celular como la causa principal en el desarrollo de BER en frutos de Micro-Tom con deficiencia de Ca^{2+} . La deficiencia de Ca^{2+} puede causar la inhibición de la actividad GR, ocasionando un desajuste en la homeostasis de glutatión. Esto podría causar la inhibición de otras enzimas (CAT y APX) importantes para la detoxificación de H_2O_2 . Esto junto con la fuerte inducción observada en las actividades SOD y NADPH oxidasa en estas condiciones, conduciría a la sobreproducción de H_2O_2 y, además, al incremento masivo de la peroxidación lipídica. Al mismo tiempo, una gran acumulación de H_2O_2 podría causar también la inhibición de CAT, APX y GR. Finalmente, se podría interpretar que BER es el síntoma visual de la peroxidación lipídica masiva y la rotura de la membrana causada por el estrés oxidativo observado con deficiencia de Ca^{2+} .

Nuevos estudios centrados en la sobreexpresión de GR en plantas transgénicas de tomate o experimentos que incluyen inhibidores de GR podrían confirmar el papel del glutatión en la incidencia de BER.

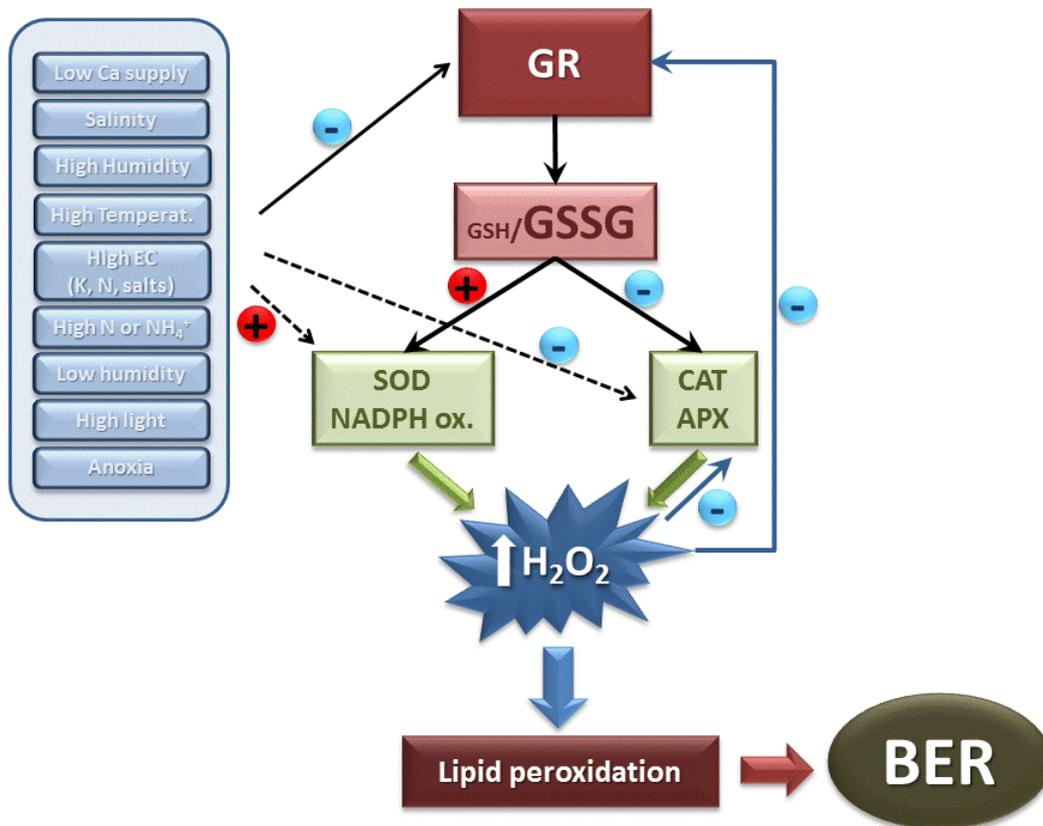


Figura 4.32. Mecanismo propuesto para la inducción de BER en frutos de Micro-Tom: (+) activación y (-) inhibición.

5. Conclusiones

5.1. Respuesta agronómica y fisiológica de tomate a la combinación de salinidad y altas temperaturas

- i. Tanto la salinidad como las altas temperaturas influyeron negativamente sobre el rendimiento comercial. La salinidad redujo tanto el tamaño como el número de frutos, mientras que las altas temperaturas redujeron el número de frutos. A salinidad baja la temperatura redujo la producción de tomate “extra”, mientras que a salinidades altas no se observó ningún efecto de la temperatura.
- ii. El efecto de la salinidad sobre el BER y el rajado fue diferente dependiendo de la temperatura aplicada. A 25°C, el aumento de la salinidad aumentó el BER y disminuyó el rajado, mientras que a 35°C, fue la alta temperatura el factor que más influyó sobre el desarrollo de estas fisiopatías.
- iii. El aumento de la salinidad dio lugar a tomates de mejor calidad. La alta temperatura redujo la mayoría de parámetros de calidad independientemente del nivel salino. A 25°C, un aumento de la salinidad incrementó la concentración de fenoles en los frutos, mientras que a 35°C el aumento de la salinidad produjo un descenso en la concentración de los mismos a partir de 30 mM NaCl. Por otro lado, la firmeza disminuyó tanto por el efecto de la salinidad como por un incremento de la temperatura.
- iv. Tanto un aumento de la salinidad como de la temperatura dieron lugar a una reducción de biomasa total. El aumento de la salinidad dio lugar a una reducción de la asimilación de CO₂, de la transpiración y de la conductancia estomática. Estos dos últimos parámetros aumentaron cuando la temperatura fue de 35°C para todos los tratamientos salinos, excepto a 90 mM NaCl, donde estos parámetros fueron similares a ambas temperaturas.
- v. Las altas temperaturas aumentaron la concentración de Na⁺ en tallos y la disminuyeron en raíz, independiente del nivel salino del que se trate.

5.2. Respuesta primaria de la planta de tomate a la combinación de salinidad y altas temperaturas. Aspectos fisiológicos, bioquímicos y moleculares.

- i. Después de 72 horas, se observó que la salinidad redujo el crecimiento más que cuando salinidad + alta temperatura eran aplicadas conjuntamente.
- ii. El tratamiento salinidad + alta temperatura presentó una concentración de Na^+ en la parte aérea menor que el tratamiento salino. Sin embargo, en raíz se observó justo lo contrario. Tanto el transporte de Na^+ desde la raíz hacia la parte aérea, como la absorción de este fue menor en el tratamiento donde se combinó la temperatura y salinidad, en comparación con el tratamiento solo con salinidad.
- iii. El tratamiento salino dio lugar a una menor concentración de K^+ en todos los órganos analizados con respecto al resto de tratamientos, posiblemente debido a una salida neta de K^+ a través de la raíz. Esto condujo a que las plantas crecidas únicamente con salinidad tuviesen un relación Na^+/K^+ mayor que el tratamiento de combinación de estreses.
- iv. Un aumento de la temperatura dio lugar a un incremento importante de la tasa de transpiración. Además, el tratamiento de salinidad produjo una reducción de la asimilación de CO_2 , así como una menor eficiencia cuántica de los fotosistemas, una menor eficiencia del fotosistema II y un menor contenido hídrico, que cuando la alta temperatura fue aplicada tanto como estrés individual, como en combinación con salinidad.
- v. Las plantas de tomate tras 48h sometidas a estrés, acumularon GB y trehalosa en el tratamiento de salinidad + alta temperatura, en relación a los otros tres tratamientos. También se observó una acumulación de prolina en el tratamiento de salinidad a 25°C.
- vi. Las enzimas P5CS y P5CR fueron las responsables de la síntesis de prolina en las plantas tratadas con salinidad, ya que la OAT parece estar bloqueada a nivel post-transcripcional. Las altas temperaturas favorecieron la acumulación de GB a través de la activación, tanto a nivel transcripcional como post-

transcripcional de la enzima BADH. Cuando la salinidad y las altas temperaturas fueron aplicadas conjuntamente, las actividades de PDH y PO (degradación de prolina) fueron fuertemente inducidas, además de una fuerte inducción de la síntesis y acumulación de trehalosa, tanto a nivel trascricional como de actividad de la enzima a través de T6PS.

- vii. La concentración de H_2O_2 alcanzó sus máximos valores en el tratamiento salino, mientras que los distintos tratamientos de estrés mostraron valores de peroxidación de lípidos de membrana muy similares. Por otro lado, tanto la actividad proteolítica como la oxidación proteica fueron mayores cuando salinidad y altas temperaturas fueron aplicadas individualmente, mientras que cuando estos estreses eran aplicados en combinación los valores de estos parámetros fueron más parecidos a los de las plantas control.

5.3. Mecanismos responsables de la aparición de la podredumbre apical o blossom-end rot (BER) en frutos de tomate en plantas sometidas a deficiencia de calcio

- i. Solamente en las plantas cultivadas con 0.1 mM Ca^{2+} se observaron frutos con BER, y de éstas sólo la mitad de la producción mostró esta fisiopatía. De éste tratamiento, los frutos afectados con BER tuvieron menos concentración de Ca^{2+} que los frutos aparentemente sanos (sin BER).
- ii. En los frutos con BER se incrementó la actividad de SOD, se inhibieron las actividades de CAT, APX y GR, además de un aumento en la actividad de MDHAR y DHAR, que junto con un incremento en la actividad de NADPH oxidasa, favorecieron la acumulación de H_2O_2 y el aumento de la peroxidación lipídica.
- iii. El estado redox del glutatión (GSH/GSSG) estaba reducido en los frutos afectados con BER, que junto con la inhibición observada de la actividad GR (enzima responsable de mantener la homeostasis de GSH y su concentración celular) y la acumulación de H_2O_2 , darían lugar a un desequilibrio de la homeostasis celular, a un aumento de la peroxidación lipídica, a un incremento de la permeabilidad y rotura de las membranas y a la aparición de los síntomas visuales de BER.

6. Bibliografía

- Abbas, M.A., Younis, M.E., Shukry, W.M.** (1991). Plant-growth, metabolism and adaptation in relation to stress conditions .14. Effect of salinity on the internal solute concentrations in phaseolus-vulgaris. *Journal of Plant Physiology* **138**: 722-727.
- Abdelmageed, A.H.A., Gruda, N.** (2009). Influence of high temperatures on gas exchange rate and growth of eight tomato cultivars under controlled heat stress conditions. *European Journal of Horticultural Science* **74**: 152-159.
- Adams, P., Davies, J.N., Winsor, G.W.** (1978). Effects of nitrogen, potassium and magnesium on quality and chemical composition of tomatoes grown in peat. *Journal of Horticultural Science* **53**: 115-122.
- Adams, P., Ho, L.C.** (1992). Effects of environment on the uptake and distribution of calcium in tomato and on the incidence of blossom-end rot. In 8th International Colloquium for the Optimization of Plant Nutrition, Lisbon, Portugal, pp 127-132.
- Adams, P., Ho, L.C.** (1992). The susceptibility of modern tomato cultivars to blossom-end rot in relation to salinity. *Journal of Horticultural Science* **67**: 827-839.
- Adams, P., Kloepper, J.** (2002). Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (gossypium hirsutum l.). *Plant and Soil* **240**: 181-189.
- Adams, S.R., Cockshull, K.E., Cave, C.R.J.** (2001). Effect of temperature on the growth and development of tomato fruits. *Annals of Botany* **88**: 869-877.
- Aebi, H.** (1984). Catalase invitro. *Methods in Enzymology* **105**: 121-126.
- Aguirre, R., May, J.M.** (2008). Inflammation in the vascular bed: Importance of vitamin c. *Pharmacology and Therapeutics* **119**: 96-103.
- Ahmad, R., Kim, M.D., Back, K.H., Kim, H.S., Lee, H.S., Kwon, S.Y., Murata, N., Chung, W.I., Kwak, S.S.** (2008). Stress-induced expression of choline oxidase in potato plant chloroplasts confers enhanced tolerance to oxidative, salt, and drought stresses. *Plant Cell Reports* **27**: 687-698.
- Ahmad, R., Kim, Y.H., Kim, M.D., Kwon, S.Y., Cho, K., Lee, H.S., Kwak, S.S.** (2010). Simultaneous expression of choline oxidase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in potato plant chloroplasts provides synergistically enhanced protection against various abiotic stresses. *Physiologia Plantarum* **138**: 520-533.
- Ahmad, R., Lim, C., Kwon, S.-Y.** (2013). Glycine betaine: A versatile compound with great potential for gene pyramiding to improve crop plant performance against environmental stresses. *Plant Biotechnology Reports* **7**: 49-57.
- Ahuja, I., De Vos, R.C., Bones, A.M., Hall, R.D.** (2010). Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science* **15**: 664-674.
- 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 annum) fruit, by manganese, zinc and calcium in relation to its sensitivity to blossom-end rot. *Physiologia Plantarum* **123**: 67-74.
- Allakhverdiev, S.I., Hayashi, H., Nishiyama, Y., Ivanov, A.G., Aliev, J.A., Klimov, V.V., Murata, N., Carpentier, R.** (2003). Glycinebetaine protects the d1/d2/cytb559 complex of photosystem ii against photo-induced and heat-induced inactivation. *Journal of Plant Physiology* **160**: 41-49.
- Amtmann, A., Sanders, D.** (1999). Mechanisms of na(+) uptake by plant cells. JA Callow, ed, *Advances in botanical research incorporating advances in plant pathology*, Vol **29**. 75-112.
- Apse, M.P., Blumwald, E.** (2007). Na⁺ transport in plants. *Febs Letters* **581**: 2247-2254.

- Asada, K.** (1994). Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. C Foyer, M PM, eds, *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. CRC Press Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo.
- Ashraf, M., Harris, P.J.C.** (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* **166**: 3-16.
- Atkinson, N.J., Dew, T.P., Orfila, C., Urwin, P.E.** (2011). Influence of combined biotic and abiotic stress on nutritional quality parameters in tomato (*solanum lycopersicum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**: 9673-9682.
- Auerswald, H., Schwarz, D., Kornelson, C., Krumbein, A., Bruckner, B., Brückner, B.** (1999). Sensory analysis, sugar and acid content of tomato at different ec values of the nutrient solution. *Scientia Horticulturae* **82**: 227-242.
- Bahaji, A., Li, J., Sánchez-López, Á.M., Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Ovecka, M., Almagro, G., Montero, M., Ezquer, I., Etxeberria, E., Pozueta-Romero, J.** (2013). Starch biosynthesis, its regulation and biotechnological approaches to improve crop yields. *Biotechnology Advances*
- 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**: 1085-1090.
- Bar-Tal, A., Aloni, B., Karni, L., Rosenberg, R.** (2001). Nitrogen nutrition of greenhouse pepper. II. Effects of nitrogen concentration and $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ ratio on growth, transpiration, and nutrient uptake. *Hortscience* **36**: 1252-1259.
- Barringer, S.** (2004). Vegetables: Tomato processing. JS Smith, Hui, Y. H., ed, *Food processing: Principles and applications*. Blackwell Publishing, Ltd., Oxford, UK.
- Bartels, D., Sunkar, R.** (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**: 23-58.
- Bassoli, B., Cassolla, P., Borba Murad, G., Constantin, J., Salgueiro Pagadigorria, C., Bazotte, R., de Souza, H.** (2008). Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: Effects on hepatic glucose release and glycaemia. *Cell Biochemistry and Function* **26**: 320-328.
- Belda, R.M., Fenlon, J.S., Ho, L.C.** (1996). Salinity effects on the xylem vessels in tomato fruit among cultivars with different susceptibilities to blossom-end rot. *Journal of Horticultural Science* **71**: 173-179.
- Belda, R.M., Ho, L.C.** (1993). Salinity effects on the network of vascular bundles during tomato fruit-development. *Journal of Horticultural Science* **68**: 557-564.
- Bernier, G., Havelange, A., Houssa, C., Petitjean, A., Lejeune, P.** (1993). Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell* **5**: 1147-1155.
- Bernstein, L., Hayward, H.E.** (1958). Physiology of salt tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **9**: 25-46.
- Bertin, N., Guichard, S., Leonardi, C., Longuenesse, J.J., Langlois, D.** (2000). Seasonal evolution of the quality of fresh glasshouse tomatoes under mediterranean conditions, as affected by air vapour pressure deficit and plant fruit load. *Annals of Botany* **85**: 741-750.
- Blasco, B., Leyva, R., Romero, L., Ruiz, J.M.** (2013). Iodine effects on phenolic metabolism in lettuce plants under salt stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**: 2591-2596.
- Blumwald, E.** (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology* **12**: 431-434.

- Blunden, C.A., Wilson, M.F.** (1985). A specific method for the determination extracts using enzymatic analysis and its application of soluble sugars in plant to the sugar content of developing pear fruit buds. *Analytica Biochemistry* **151**: 403-108.
- Blunden, C.A., Wilson, M.F., Wilson, M.F.** (1985). A specific method for the determination of soluble sugars in plant-extracts using enzymatic analysis and its application to the sugar content of developing pear fruit buds. *Analytical Biochemistry* **151**: 403-408.
- Bolarin, M.C., Perezalfocea, F., Cano, E.A., Estan, M.T., Caro, M.** (1993). Growth, fruit yield, and ion concentration in tomato genotypes after preemergence and postemergence salt treatments. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **118**: 655-660.
- Borghesi, E., González-Miret, M.L., Escudero-Gilete, M.L., Malorgio, F., Heredia, F., González Miret, M.L., Escudero Gilete, M.L., Meléndez Martínez, A.** (2011). Effects of salinity stress on carotenoids, anthocyanins, and color of diverse tomato genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**: 11676-11682.
- Borsani, J., Budde, C.O., Porrini, L., Lauxmann, M.A., Lombardo, V.A., Murray, R., Andreo, C.S., Drincovich, M.F., Lara, M.V.** (2009). Carbon metabolism of peach fruit after harvest: Changes in enzymes involved in organic acid and sugar level modifications. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1823-1837.
- Braam, J., Sistrunk, M.L., Polisensky, D.H., Xu, W., Purugganan, M.M., Antosiewicz, D.M., Campbell, P., Johnson, K.A.** (1996). Life in a changing world: Tch gene regulation of expression and responses to environmental signals. *Physiologia Plantarum* **98**: 909-916.
- Bradford, M.M.** (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Bramley, P.M.** (2000). Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry* **54**: 233-236.
- Brandriss, M.C., Magasanik, B.** (1979). Genetics and physiology of proline utilization in *saccharomyces cerevisiae*: Enzyme induction by proline. *Journal of Bacteriology* **140**: 498-503.
- Brennan, T., Frenkel, C.** (1977). Involvement of hydrogen-peroxide in regulation of senescence in pear. *Plant Physiology* **59**: 411-416.
- Buchanan, K.T., Engman, D.M.** (2002). Association of trypanosoma cruzi fcabp with the flagellar membrane is dependent on calcium binding. *Faseb Journal* **16**: A919-A919.
- Burrell, M.M.** (2003). Starch: The need for improved quality or quantity - an overview. *Journal of Experimental Botany* **54**: 451-456.
- Bush, D.S.** (1995). Calcium regulation in plant-cells and its role in signaling. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**: 95-122.
- Cabib, E., Leloir, L.F.** (1958). Biosynthesis of trehalose phosphate. *Journal of Biological Chemistry* **231**: 259-275.
- Cakmak, I.** (2005). Role of mineral nutrients in tolerance of crop plants to environmental stress factors. *Fertigation Proceedings: Selected Papers of the IPI-NATESC-CAU-CAAS International Symposium on Fertigation*: 35-48.
- Cakmak, I., Marschner, H.** (1988). Zinc-dependent changes in electron-spin-resonance signals, nadph oxidase and plasma-membrane permeability in cotton roots. *Physiologia Plantarum* **73**: 182-186.

- 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**: 281-289.
- Canene-Adams, K., Campbell, J.K., Zaripheh, S., Jeffery, E.H., Erdman, J.W., Jr.** (2005). The tomato as a functional food. *The Journal of Nutrition* **135**: 1226-1230.
- Carvajal, M., Martinez, V., Cerda, A.** (1999). Influence of magnesium and salinity on tomato plants grown in hydroponic culture. *Journal of Plant Nutrition* **22**: 177-190.
- Casado-Vela, J., Selles, S., Bru, R.** (2005). Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from tomato fruits (*lycopersicon esculentum* cv. Muchamiel). *Journal of Food Biochemistry* **29**: 381-401.
- Casado-Vela, J., Selles, S., Martinez, R.B.** (2004). Proteomic approach to blossom-end rot in tomato fruits (*lycopersicon esculentum* m.): Antioxidant enzymes and the pentose phosphate pathway. *In* 6th Siena Meeting on From Genome to Proteome, Siena, ITALY, pp 2488-2496.
- Clapham, D.E.** (2007). Calcium signaling. *Cell* **131**: 1047-1058.
- Clemens, S.** (2006). Evolution and function of phytochelatin synthases. *Journal of Plant Physiology* **163**: 319-332.
- Cliff, M., Li, J., Li, J.B., Ehret, D.** (2012). Effects of nutrient solution electrical conductivity on the compositional and sensory characteristics of greenhouse tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* **74**: 132-140.
- Conde, A., Silva, P., Agasse, A., Conde, C., Geros, H., Gerás, H.** (2011). Mannitol transport and mannitol dehydrogenase activities are coordinated in *olea europaea* under salt and osmotic stresses. *Plant & Cell Physiology* **52**: 1766-1775.
- Cramer, G.R., Epstein, E., Lauchli, A.** (1988). Kinetics of root elongation of maize in response to short-term exposure to nacl and elevated calcium-concentration. *Journal of Experimental Botany* **39**: 1513-1522.
- Creelman, R.A., Mullet, J.E.** (1997). Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: Nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *Plant Cell* **9**: 1211-1223.
- Crowe, J.** (2007). Trehalose as a "chemical chaperone": Fact and fantasy. *MOLECULAR ASPECTS OF THE STRESS RESPONSE: CHAPERONES, MEMBRANES AND NETWORKS* **594**: 143-158.
- Cuartero, J., Fernandez-Munoz, R.** (1999). Tomato and salinity. *Scientia Horticulturae* **78**: 83-125.
- Cuin, T.A., Shabala, S.** (2005). Exogenously supplied compatible solutes rapidly ameliorate nacl-induced potassium efflux from barley roots. *Plant & Cell Physiology* **46**: 1924-1933.
- Cuin, T.A., Shabala, S.** (2007). Amino acids regulate salinity-induced potassium efflux in barley root epidermis. *Planta* **225**: 753-761.
- Chamarro Lapuerta, J.** (1995). Anatomía y fisiología de la planta. *El cultivo del tomate*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 43-91.
- Chance, B., Maehly, A.C.** (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology* **2**: 764-775.
- Chaney, R.L., Chen, K.Y., Li, Y.M., Angle, J.S., Baker, A.J.M.** (2008). Effects of calcium on nickel tolerance and accumulation in alyssum species and cabbage grown in nutrient solution. *Plant and Soil* **311**: 131-140.

- Chao, L., Cao, W.Q., Yun, L., Hao, H., Liang, C., Liu, X.Q., Hong, F.S.** (2009). Cerium under calcium deficiency-influence on the antioxidative defense system in spinach plants. *Plant and Soil* **323**: 285-294.
- Charest, C., Phan, C.T.** (1990). Cold-acclimation of wheat (triticum-aestivum) - properties of enzymes involved in proline metabolism. *Physiologia Plantarum* **80**: 159-168.
- Chen, L., Jia, H., Tian, Q., Du, L., Gao, Y., Miao, X., Liu, Y.** (2012). Protecting effect of phosphorylation on oxidative damage of d1 protein by down-regulating the production of superoxide anion in photosystem ii membranes under high light. *Photosynthesis Research* **112**: 141-148.
- Chen, T.H., Murata, N.** (2008). Glycinebetaine: An effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends in Plant Science* **13**: 499-505.
- Chen, T.H., Murata, N.** (2011). Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: Mechanisms and biotechnological applications. *Plant Cell Environment* **34**: 1-20.
- Cheng, L., Sun, R.-R., Wang, F.-Y., Kong, F.-L., Wu, J., Cao, J.-S., Lu, G.** (2012). Spermidine affects the transcriptome responses to high temperature stress in ripening tomato fruit. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)* **13**: 283-297.
- Chew, Y.H., Halliday, K.J.** (2011). A stress-free walk from arabidopsis to crops. *Current Opinion in Biotechnology* **22**: 281-286.
- Dane, F., Hunter, A.G., Chambliss, O.L.** (1991). Fruit-set, pollen fertility, and combining ability of selected tomato genotypes under high-temperature field conditions. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **116**: 906-910.
- Darawsheh, M.K., Bouranis, D.L.** (2006). Season vs. Nutrition-dependent fruit loading: Effects on pigment dynamics of tomato leaves. *Journal of Plant Nutrition* **29**: 699-715.
- Davies, J.N., Hobson, G.E.** (1981). The constituents of tomato fruit--the influence of environment, nutrition, and genotype. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **15**: 205-280.
- Davies, J.N., Winsor, G.W.** (1967). Effect of nitrogen, phosphorus, potassium, magnesium and liming on the composition of tomato fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **18**: 459-466.
- Davies, W.J., Bacon, M.A., Thompson, D.S., Sobeih, W., Rodriguez, L.G.** (2000). Regulation of leaf and fruit growth in plants growing in drying soil: Exploitation of the plants' chemical signalling system and hydraulic architecture to increase the efficiency of water use in agriculture (vol 51, pg 1617 2000). *Journal of Experimental Botany* **51**: 1949-1949.
- 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**: 95-108.
- De Freitas, S.T., do Amarante, C.V.T., Labavitch, J.M., Mitcham, E.J.** (2010). Cellular approach to understand bitter pit development in apple fruit. *Postharvest Biology and Technology* **57**: 6-13.
- De Freitas, S.T., Mitcham, E.J.** (2012). Factors involved in fruit calcium. Deficiency disorders. J Janick, ed, *Horticultural reviews*, Ed First edition Vol **40**. John Wiley and Sons. 107-145.

- De Freitas, S.T., Padda, M., Wu, Q.Y., Park, S., Mitcham, E.J.** (2011). Dynamic alternations in cellular and molecular components during blossom-end rot development in tomatoes expressing scax1, a constitutively active ca²⁺/h⁺ antiporter from arabidopsis. *Plant Physiology* **156**: 844-855.
- De Freitas, S.T., Shackel, K.A., Mitcham, E.J.** (2011). Abscisic acid triggers whole-plant and fruit-specific mechanisms to increase fruit calcium uptake and prevent blossom end rot development in tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* **62**: 2645-2656.
- Debruyn, J.W., Kooistra, E.** (1971). Variation in taste and chemical composition of tomato (*lycopersicon-esculentum* mill). *Euphytica* **20**: 214-&.
- Dekock, P.C., Inkson, R.H.E., Hall, A.** (1982). Blossom-end rot of tomato as influenced by truss size. *Journal of Plant Nutrition* **5**: 57-62.
- Delatte, T., Sedijani, P., Kondou, Y., Matsui, M., de Jong, G., Somsen, G., Wiese Klinkenberg, A., Primavesi, L., Paul, M., Schluepmann, H.** (2011). Growth arrest by trehalose-6-phosphate: An astonishing case of primary metabolite control over growth by way of the snrk1 signaling pathway. *Plant Physiology* **157**: 160-174.
- Delauney, A.J., Verma, D.P.S.** (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal* **4**: 215-223.
- Demarty, M., Morvan, C., Thellier, M.** (1984). Calcium and the cell-wall. *Plant, Cell and Environment* **7**: 441-448.
- Demiral, T., Turkan, I.** (2004). Does exogenous glycinebetaine affect antioxidative system of rice seedlings under nacl treatment? *Journal of Plant Physiology* **161**: 1089-1100.
- Di Matteo, A., Sacco, A., Anacleria, M., Pezzotti, M., Delledonne, M., Ferrarini, A., Frusciante, L., Barone, A.** (2010). The ascorbic acid content of tomato fruits is associated with the expression of genes involved in pectin degradation. *Bmc Plant Biology* **10**
- Dicko, M., van Berkel, W.J.H., Gruppen, H., Barro, C., Traore, A.** (2005). Impact of phenolic compounds and related enzymes in sorghum varieties for resistance and susceptibility to biotic and abiotic stresses. *Journal of Chemical Ecology* **31**: 2671-2688.
- Dijkwel, P.P., Huijser, C., Weisbeek, P.J., Chua, N.H., Smeekens, S.C.M.** (1997). Sucrose control of phytochrome a signaling in arabidopsis. *Plant Cell* **9**: 583-595.
- Distefano, S., Palma, J.M., Gomez, M., del Rio, L.A.** (1997). Characterization of endoproteases from plant peroxisomes. *Biochemical Journal* **327**: 399-405.
- Dorais, M., Demers, D.-A., Papadopoulos, A.P., Van Ieperen, W.** (2004). Greenhouse tomato fruit cuticle cracking. *Horticultural reviews*. John Wiley & Sons, Inc. 163-184.
- Dorais, M., Papadopoulos, A.P., Gosselin, A.** (2001). Influence of electric conductivity management on greenhouse tomato yield and fruit quality. *Agronomie* **21**: 367-383.
- Dorji, K., Behboudian, M.H., Zegbe-Dominguez, J.A.** (2005). Water relations, growth, yield, and fruit quality of hot pepper under deficit irrigation and partial rootzone drying. *Scientia Horticulturae* **104**: 137-149.
- Dris, R., Niskanen, R., Fallahi, E.** (1998). Nitrogen and calcium nutrition and fruit quality of commercial apple cultivars grown in finland. *Journal of Plant Nutrition* **21**: 2389-2402.

- Dumas, Y., Dadomo, M., Di Lucca, G., Grolier, P.** (2003). Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**: 369-382.
- Eaton, F.M.** (1941). Water uptake and root growth as influenced by inequalities in the concentration of the substrate. *Plant Physiology* **16**: 545-564.
- Ehret, D.L., Ho, L.C.** (1986). Translocation of calcium in relation to tomato fruit-growth. *Annals of Botany* **58**: 679-688.
- Einset, J., Nielsen, E., Connolly, E.L., Bones, A., Sparstad, T., Winge, P., Zhu, J.-K.** (2007). Membrane-trafficking raba4c involved in the effect of glycine betaine on recovery from chilling stress in arabidopsis. *Physiologia Plantarum* **130**: 511-518.
- Einset, J., Winge, P., Bones, A.M., Connolly, E.L.** (2008). The fro2 ferric reductase is required for glycine betaine's effect on chilling tolerance in arabidopsis roots. *Physiologia Plantarum* **134**: 334-341.
- Elumalai, R.P., Nagpal, P., Reed, J.W.** (2002). A mutation in the arabidopsis kt2/kup2 potassium transporter gene affects shoot cell expansion. *Plant Cell* **14**: 119-131.
- EnglishLoeb, G., English Loeb, G., Stout, M., Duffey, S.** (1997). Drought stress in tomatoes: Changes in plant chemistry and potential nonlinear consequences for insect herbivores. *Oikos* **79**: 456-468.
- Esquinas-Alcázar, J., Nuez Viñals, F.** (1995). Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. *El cultivo del tomate*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 13-42.
- Evers, D., Lefevre, I., Legay, S., Lamoureux, D., Hausman, J.F., Rosales, R.O., Marca, L.R., Hoffmann, L., Bonierbale, M., Schafleitner, R.** (2010). Identification of drought-responsive compounds in potato through a combined transcriptomic and targeted metabolite approach. *Journal of Experimental Botany* **61**: 2327-2343.
- Fabre, R., Duval, M., Jeannequin, B.** (2011). Effect of the salinity on the organoleptic quality and yield of early-grown soilless grafted tomatoes under heated glasshouses in the south of france. *Cahiers Agricultures* **20**: 266-273.
- Fam, S.S., Morrow, J.D.** (2003). The isoprostanes: Unique products of arachidonic acid oxidation - a review. *Current Medicinal Chemistry* **10**: 1723-1740.
- FAO** (2000). Statistics division of the food and agriculture organization of the united nations. <http://faostat.fao.org/>.
- FAO** (2011). Statistics division of the food and agriculture organization of the united nations. <http://faostat.fao.org/>.
- 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-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* **167**: 616-622.
- Fernandez-Panchon, M.S., Villano, D., Troncoso, A.M., Garcia-Parrilla, M.C.** (2008). Antioxidant activity of phenolic compounds: From in vitro results to in vivo evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **48**: 649-671.
- Flores, P., del Amor, F.M., Carvajal, M., Navarro, J.M., Cerda, A., Martinez, V.** (2001). Vegetative growth, nutritional status and yield of tomato plants growing under salinity conditions and different no₃⁻: Nh₄⁺ ratios. JA Fernandez, PF Martinez, N Castilla, eds, *Proceedings of the fifth international symposium on protected cultivation in mild winter climates: Current trends for sustainable technologies, vols i and ii*. 359-364.

- Flores, P., Navarro, J.M., Carvajal, M., Cerda, A., Martinez, V.** (2003). Tomato yield and quality as affected by nitrogen source and salinity. *Agronomie* **23**: 249-256.
- Foolad, M.R.** (2004). Recent advances in genetics of salt tolerance in tomato. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **76**: 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**: 1866-1875.
- Frazier, W.A., Bowers, J.L.** (1947). A final report on studies of tomato fruit cracking in maryland. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* **49**: 241-255.
- Fu, J., Huang, B.** (2001). Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany* **45**: 105-114.
- Garcia, P.C., Rivero, R.M., Ruiz, J.M., Romero, L.** (2003). The role of fungicides in the physiology of higher plants: Implications for defense responses. *Botanical Review* **69**: 162-172.
- Garg, A.K., Kim, J.K., Owens, T.G., Ranwala, A.P., Choi, Y.D., Kochian, L.V., Wu, R.J.** (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 15898-15903.
- Geladopoulos, T.P., Sotiroudis, T.G., Evangelopoulos, A.E.** (1991). A malachite green calorimetric assay for protein phosphatase activity. *Analytical Biochemistry* **192**: 112-116.
- Genc, Y., McDonald, G.K., Tester, M.** (2007). Reassessment of tissue na(+) concentration as a criterion for salinity tolerance in bread wheat. *Plant, Cell and Environment* **30**: 1486-1498.
- Gent, M.P.N., Ma, Y.Z.** (2000). Mineral nutrition of tomato under diurnal temperature variation of root and shoot. *Crop Science* **40**: 1629-1636.
- Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R.** (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* **990**: 87-92.
- Gill, S.S., Tuteja, N.** (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 909-930.
- Gorham, J., Jones, R.G.W., Bristol, A.** (1990). Partial characterization of the trait for enhanced k+-na+ discrimination in the d-genome of wheat. *Planta* **180**: 590-597.
- Greenway, H., Munns, R.** (1980). Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **31**: 149-190.
- Grieve, C.M., Grattan, S.R.** (1983). Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and Soil* **70**: 303-307.
- Griffith, O.W.** (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione-reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry* **106**: 207-212.
- Gruda, N.** (2005). Impact of environmental factors on product quality of greenhouse vegetables for fresh consumption. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**: 227-247.

- Ha, S.B., Smith, A.P., Howden, R., Dietrich, W.M., Bugg, S., O'Connell, M.J., Goldsbrough, P.B., Cobbett, C.S. (1999). Phytochelatin synthase genes from arabidopsis and the yeast schizosaccharomyces pombe. *Plant Cell* **11**: 1153-1163.
- Hajrasuliha, S. (1980). Accumulation and toxicity of chloride in bean-plants. *Plant and Soil* **55**: 133-138.
- Halliwell, B., Foyer, C.H. (1976). Ascorbic-acid, metal-ions and superoxide radical. *Biochemical Journal* **155**: 697-700.
- Hammerschmidt, R., Nicholson, R.L. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **30**: 369-389.
- Hao, X.M., Papadopoulos, A.P. (2004). Effects of calcium and magnesium on plant growth, biomass partitioning, and fruit yield of winter greenhouse tomato. *HortScience* **39**: 512-515.
- Harbaugh, B.K., Scott, J.W. (1999). 'Florida pink' and 'florida light blue' - semi-dwarf heat-tolerant cultivars of lisianthus. *Hortscience* **34**: 364-365.
- Hare, P.D., Cress, W.A., Van Staden, J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment* **21**: 535-553.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 463-499.
- Havaux, M. (1993). Characterization of thermal damage to the photosynthetic electron transport system in potato leaves. *Plant Science* **94**: 19-33.
- Havaux, M. (1993). Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperatures. *Plant, Cell and Environment* **16**: 461-467.
- Hayward, H.E., Spurr, W.B. (1944). Effects of isosmotic concentrations of inorganic and organic substrates on entry of water into corn roots. *Botanical Gazette* **106**: 131-139.
- Hazra, P., Ansary, S.H. (2008). Genetics of heat tolerance for floral and fruit set to high temperature stress in tomato (*lycopersicon esculentum* mill.). *SABRAO Journal of Breeding and Genetics* **40**: 117-125.
- He, Y., Zhu, Z., Yang, J., Ni, X., Zhu, B. (2009). Grafting increases the salt tolerance of tomato by improvement of photosynthesis and enhancement of antioxidant enzymes activity. *Environmental and Experimental Botany* **66**: 270-278.
- Hernandez, J.A., Ferrer, M.A., Jimenez, A., Barcelo, A.R., Sevilla, F. (2001). Antioxidant systems and o-2(-)/h2o2 production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology* **127**: 817-831.
- Hertog, M.G., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Kromhout, D., Katan, M.B. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study. *The Lancet* **342**: 1007-1011.
- Hirayama, T., Shinozaki, K. (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: Past, present and future. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* **61**: 1041-1052.
- Ho, L. (1996). Tomato. E Zamki, A Schaer, eds, *Photoassimilate distribution in plant and crop*. Marcel Dekker Inc., New York. 709-728.
- Ho, L.C. (1999). The physiological basis for improving tomato fruit quality. BJ Bieche, ed, *Sixth international ishs symposium on the processing tomato - workshop on irrigation and fertigation of processing tomato*. 33-40.

- Ho, L.C., Adams, P.** (1994). The physiological-basis for high fruit yield and susceptibility to calcium deficiency in tomato and cucumber. *Journal of Horticultural Science* **69**: 367-376.
- Ho, L.C., Belda, R., Brown, M., Andrews, J., Adams, P.** (1993). Uptake and transport of calcium and the possible causes of blossom-end rot in tomato. *Journal of Experimental Botany* **44**: 509-518.
- Ho, L.C., White, P.J.** (2005). A cellular hypothesis for the induction of blossom-end rot in tomato fruit. *Annals of Botany* **95**: 571-581.
- Hong, C.Y., Chao, Y.Y., Yang, M.Y., Cho, S.C., Kao, C.H.** (2009). Na⁺ but not cl⁻ or osmotic stress is involved in nacl-induced expression of glutathione reductase in roots of rice seedlings. *Journal of Plant Physiology* **166**: 1598-1606.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., Verma, D.P.S.** (2000). Removal of feedback inhibition of d1-pyrroline-5- arboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology* **122**: 1129-1136.
- Hoque, M.A., Banu, M.N., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., Murata, Y.** (2008). Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce nacl-induced damage in cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology* **165**: 813-824.
- Hu, Y., Schmidhalter, U.** (1997). Interactive effects of salinity and macronutrient level on wheat .2. Composition. *Journal of Plant Nutrition* **20**: 1169-1182.
- Hu, Y.C., Schmidhalter, U.** (2005). Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **168**: 541-549.
- Huang, J.S., Snapp, S.S.** (2004). The effect of boron, calcium, and surface moisture on shoulder check, a quality defect in fresh-market tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **129**: 599-607.
- Huber, S.C., Huber, J.L.** (1996). Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 431-444.
- Ikeda, H., Osawa, T.** (1988). Effects of no₃/nh₄ ratios and temperature of the nutrient solution on growth, yields, and blossom-end rot incidence of tomato. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **57**: 62-69.
- Ilan, N., Moran, N., Schwartz, A.** (1995). The role of potassium channels in the temperature control of stomatal aperture. *Plant Physiology* **108**: 1161-1170.
- Ill-Hwan, C., Young-Hoe, W., Eung-Ho, L., Hyung-Jun, K.** (1997). Changes in cuticular transpiration and calcium content of tomato fruits and prevention of blossom-end rot through environmental control. *Journal of the Korean Society for Horticultural Sciences* **38**: 98-102.
- Incharoensakdi, A., Takabe, T., Akazawa, T.** (1986). Effect of betaine on enzyme activity and subunit interaction of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from aphanothece halophytica. *Plant Physiology* **81**: 1044-1049.
- Irigoyen, J.J., Emerich, D.W., Sanchezdiaz, M.** (1992). Water-stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (medicago-sativa) plants. *Physiologia Plantarum* **84**: 55-60.
- Islam, M.M., Hoque, M.A., Okuma, E., Banu, M.N., Shimoishi, Y., Nakamura, Y., Murata, Y.** (2009). Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology* **166**: 1587-1597.

- Jack, D.B.** (1995). Keep taking the tomatoes--the exciting world of nutraceuticals. *Molecular Medicine Today* **1**: 118-121.
- Jang, J.C., Leon, P., Zhou, L., Sheen, J.** (1997). Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* **9**: 5-19.
- Janicka-Russak, M., Kabala, K., KabaÅ,a, K.** (2012). Abscisic acid and hydrogen peroxide induce modification of plasma membrane h(+)-atpase from cucumis sativus l. Roots under heat shock. *Journal of Plant Physiology* **169**: 1607-1614.
- Johnson, R.W., Dixon, M.A., Lee, D.R.** (1992). Water relations of the tomato during fruit growth. *Plant, Cell and Environment* **15**: 947-953.
- Jolivet, Y., Larher, F.R., Hamelin, J.** (1982). Osmoregulation in halophytic higher plants: The protective effect of glycine betaine against the heat destabilization of membranes. *Plant Science Letters* **25**: 193-201.
- Juan, M., Rivero, R.M., Romero, L., Ruiz, J.M.** (2005). Evaluation of some nutritional and biochemical indicators in selecting salt-resistant tomato cultivars. *Environmental and Experimental Botany* **54**: 193-201.
- Kingsbury, R.W., Epstein, E.** (1986). Salt sensitivity in wheat - a case for specific ion toxicity. *Plant Physiology* **80**: 651-654.
- Klee, H.J., Tieman, D.M.** (2013). Genetic challenges of flavor improvement in tomato. *Trends in Genetics* **29**: 257-262.
- Kleemann, M.** (2000). Effects of salinity, nutrients and spraying with cacl2 solution on the development of calcium deficiency in chervil (*anthriscus cerefolium* (l.) hoffm.) and curled parsley (*petroselinum crispum* (mill.) nym. Convar. Crispum),
- Kleinhenz, V., Katroschan, K., Schutt, F., Stutzel, H.** (2006). Biomass accumulation and partitioning of tomato under protected cultivation in the humid tropics. *European Journal of Horticultural Science* **71**: 173-182.
- 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**: 1523-1536.
- Koch, K.E.** (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 509-540.
- Kolbe, A., Tiessen, A., Schluempmann, H., Paul, M., Ulrich, S., Geigenberger, P.** (2005). Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of adp-glucose pyrophosphorylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 11118-11123.
- Kuznestov, V.V., Shevyakova, N.I.** (1997). Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. *Physiologia Plantarum* **100**: 320-326.
- Kuznetsov, V.V., Shevyakova, N.I.** (1997). Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. *Physiologia Plantarum* **100**: 320-326.
- 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**: 2053-2068.
- Lang, A., Doring, H.** (1990). Grape berry splitting and some mechanical-properties of the skin. *Vitis* **29**: 61-70.

- Lichter, A., Dvir, O., Fallik, E., Cohen, S., Golan, R., Shemer, Z., Sagi, M.** (2002). Cracking of cherry tomatoes in solution. *Postharvest Biology and Technology* **26**: 305-312.
- Lin, C.C., Kao, C.H.** (2001). Relative importance of na⁺, cl⁻, and abscisic acid in nacl induced inhibition of root growth of rice seedlings. *Plant and Soil* **237**: 165-171.
- Lin, W.C., Block, G.S.** (1998). The effects of culture practice and storage temperature on quality and flavor volatiles of greenhouse tomatoes. R Bielecki, WA Laing, CJ Clark, eds, *Postharvest '96 - proceedings of the international postharvest science conference*, Vol **464**. 213-218.
- Liu, X.Z., Huang, B.R.** (2000). Carbohydrate accumulation in relation to heat stress tolerance in two creeping bentgrass cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **125**: 442-447.
- LoaizaVelarde, J.G., TomasBarbera, F.A., Saltveit, M.E.** (1997). Effect of intensity and duration of heat-shock treatments on wound-induced phenolic metabolism in iceberg lettuce. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **122**: 873-877.
- Loggini, B., Scartazza, A., Brugnoli, E., Navari-Izzo, F.** (1999). Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiology* **119**: 1091-1099.
- Lugan, R., Niogret, M.F., Lepout, L., Guegan, J.P., Larher, F.R., Savoure, A., Kopka, J., Bouchereau, A.** (2010). Metabolome and water homeostasis analysis of the *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* **64**: 215-229.
- Lunn, J.** (2007). Gene families and evolution of trehalose metabolism in plants. *Functional Plant Biology* **34**: 550-563.
- Lunn, J., Hendriks, J.H.M., Feil, R., Carillo, P., Gibon, Y., Morcuende, R., Osuna, D., Scheible, W.-R., Hajirezaei, M.-R., Stitt, M.** (2006). Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of adp-glucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal* **397**: 139-148.
- Lynch, J., Lauchli, A.** (1984). Potassium-transport in salt-stressed barley roots. *Planta* **161**: 295-301.
- Macnish, A.J., Joyce, D.C., Hetherington, S.E.** (1997). Packaging to reduce water loss can delay ripening of mango (*Mangifera indica* L. Cv. 'Kensington pride') fruit. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **37**: 463-467.
- Maestri, E., Klueva, N., Perrotta, C., Gulli, M., Nguyen, H.T., Marmioli, N.** (2002). Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. *Plant Molecular Biology* **48**: 667-681.
- MAGRAMA** (2011). Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente. <http://www.magrama.gob.es/>.
- Marangoni, A., Jackman, R., Stanley, D.** (1995). Chilling-associated softening of tomato fruit is related to increased pectinmethylesterase activity. *Journal of Food Science* **60**: 1277-1281.
- Marin, A., Rubio, J.S., Martinez, V., Gil, M.I.** (2009). Antioxidant compounds in green and red peppers as affected by irrigation frequency, salinity and nutrient solution composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **89**: 1352-1359.

- Marler, T.E.** (1996). Salinity influences photosynthetic characteristics, water relations, and foliar mineral composition of *annona squamosa* L. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **121**: 243-248.
- Marti, E., Gisbert, C., Bishop, G.J., Dixon, M.S., Garcia-Martinez, J.L.** (2006). Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-tom. *Journal of Experimental Botany* **57**: 2037-2047.
- Martinez, V., Cerda, A., Fernandez, F.G.** (1987). Salt tolerance of 4 tomato hybrids. *Plant and Soil* **97**: 233-241.
- Matysik, J., Alia, Bhalu, B., Mohanty, P.** (2002). Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science* **82**: 525-532.
- Matysik, J., Alia, H.H., Bhalu, B., Mohanty, P.** (2002). Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science* **82**: 525-532.
- Max, J.F.J., Horst, W.J., Mutwiwa, U.N., Tantau, H.J.** (2009). Effects of greenhouse cooling method on growth, fruit yield and quality of tomato (*solanum lycopersicum* L.) in a tropical climate. *Scientia Horticulturae* **122**: 179-186.
- McCord, J.M., Fridovic, I.** (1969). Utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions .2. Radicals generated by interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *Journal of Biological Chemistry* **244**: 6056-&.
- McNevin, W.M., Uron, P.F.** (1953). Separation of hydrogen peroxide from organic hydroperoxides. *Analytical Chemistry* **25**: 1760-1761.
- Mehta, S.K., Gaur, J.P.** (1999). Heavy metal-induced proline accumulation and its role on ameliorating metal toxicity in *chlorella vulgaris*. *New Phytologist* **143**: 253-259.
- Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., Elkind, Y., Levy, A.** (1997). A new model system for tomato genetics. *Plant Journal* **12**: 1465-1472.
- 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. *Journal of Plant Physiology* **169**: 1719-1727.
- Miller, A.R., Dalmaso, J.P., Kretchman, D.W.** (1987). Mechanical-stress, storage time, and temperature influence cell wall-degrading enzymes, firmness, and ethylene production by cucumbers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **112**: 666-671.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R.** (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment* **33**: 453-467.
- Miron, D., Schaffer, A.A.** (1991). Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase, and invertase activities in developing fruit of *lycopersicon esculentum* mill. And the sucrose accumulating *lycopersicon hirsutum* Humb. And Bonpl. *Plant Physiology* **95**: 623-627.
- Mitchell, J.P., Shennan, C., Grattan, S.R., May, D.M.** (1991). Tomato fruit yields and quality under water deficit and salinity. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **116**: 215-221.
- Mittler, R.** (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**: 405-410.
- Mittler, R.** (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* **11**: 15-19.

- Mittler, R., Blumwald, E.** (2010). Genetic engineering for modern agriculture: Challenges and perspectives. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 443-462.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F.** (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**: 490-498.
- Miyake, C., Asada, K.** (1992). Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach-chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation-product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant and Cell Physiology* **33**: 541-553.
- Mooney, B.P.** (2009). The second green revolution? Production of plant-based biodegradable plastics. *Biochemical Journal* **418**: 219-232.
- Morales, D., Rodríguez, P., Dell'Amico, J., Nicolás, E., Torrecillas, A., Sánchez-Blanco, M.J.** (2003). High-temperature preconditioning and thermal shock imposition affects water relations, gas exchange and root hydraulic conductivity in tomato. *Biologia Plantarum* **47**: 203-208.
- Moran, J.F., Becana, M., Iturbeormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R.V., Aparicotejo, P.** (1994). Drought induces oxidative stress in pea-plants. *Planta* **194**: 346-352.
- Morant-Manceau, A., Pradier, E., Tremblin, G.** (2004). Osmotic adjustment, gas exchanges and chlorophyll fluorescence of a hexaploid triticale and its parental species under salt stress. *Journal of Plant Physiology* **161**: 25-33.
- Morell, M., Copeland, L.** (1984). Enzymes of sucrose breakdown in soybean nodules. *Plant Physiology* **74**: 1030-1034.
- Morgan, J.A.** (1984). Interaction of water supply and n in wheat. *Plant Physiology* **76**: 112-117.
- Munns, R.** (1993). Physiological processes limiting plant-growth in saline soils - some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell and Environment* **16**: 15-24.
- Munns, R.** (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* **25**: 239-250.
- Munns, R., Tester, M.** (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual review of plant biology*, Vol **59**. 651-681.
- Nakano, Y., Asada, K.** (1987). Purification of ascorbate peroxidase in spinach-chloroplasts - its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology* **28**: 131-140.
- Nedjimi, B.** (2011). Is salinity tolerance related to osmolytes accumulation in lygeum spartum l. Seedlings? *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* **10**: 81-87.
- Nie, Y., He, J.L., Hsia, S.L.** (1993). A microenzymic method for determination of choline-containing phospholipids in serum and high-density-lipoproteins. *Lipids* **28**: 949-951.
- Nielsen, S.** (1998). Food analysis, Ed 2nd ed. *Aspen Publishers*, Gaithersburg, MD,
- Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., van Norren, K., van Leeuwen, P.A.M.** (1996). Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* **74**: 418-425.
- Noctor, G., Foyer, C.H.** (1998). Simultaneous measurement of foliar glutathione, gamma-glutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography: Comparison with two other assay methods for glutathione. *Analytical Biochemistry* **264**: 98-110.

- Nonami, H., Fukuyama, T., Yamamoto, M., Yang, L., Hashimoto, Y. (1994).** Blossom-end rot of tomato plants may not be directly caused by calcium deficiency. *In* T Ito, F Tognoni, T Namiki, A Nukaya, T Maruo, eds, Symposium on Hydroponics and Transplant Production, at the XXIVth International Horticultural Congress, Kyoto, Japan, pp 107-114.
- Nonami, H., Tanimoto, K., Tabuchi, A., Fukuyama, T., Hashimoto, Y. (1994).** Salt stress under hydroponic conditions causes changes in cell wall extension during growth. *In* T Ito, F Tognoni, T Namiki, A Nukaya, T Maruo, eds, Symposium on Hydroponics and Transplant Production, at the XXIVth International Horticultural Congress, Kyoto, Japan, pp 91-98.
- Nuccio, M.L., Rhodes, D., McNeil, S.D., Hanson, A.D. (1999).** Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 128-134.
- Nuccio, M.L., Russell, B.L., Nolte, K.D., Rathinasabapathi, B., Gage, D.A., Hanson, A.D. (1998).** The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. *Plant Journal* **16**: 487-496.
- Nuez, F. (1995).** Desarrollo de nuevos cultivares. *El cultivo del tomate*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 625-670.
- Nukaya, A., Goto, K., Jang, H., Kano, A., Ohkawa, K. (1995).** Effect of k/ca ratio in the nutrient solution on incidence of blossom-end rot and gold specks of tomato fruit grown in rockwool. T Ito, F Tognoni, T Namiki, A Nukaya, T Maruo, eds, *Hydroponics and transplant production*. 123-130.
- Ohto, M., Onai, K., Furukawa, Y., Aoki, E., Araki, T., Nakamura, K. (2001).** Effects of sugar on vegetative development and floral transition in arabidopsis. *Plant Physiology* **127**: 252-261.
- Olle, M., Bender, I. (2009).** Causes and control of calcium deficiency disorders in vegetables: A review. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **84**: 577-584.
- Pallanca, J.E., Smirnoff, N. (2000).** The control of ascorbic acid synthesis and turnover in pea seedlings. *Journal of Experimental Botany* **51**: 669-674.
- Papageorgiou, G.C., Murata, N. (1995).** The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem ii complex. *Photosynthesis Research* **44**: 243-252.
- Parida, A., Das, A. (2005).** Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **60**: 324-349.
- Park, E.J., Jeknic, Z., Sakamoto, A., DeNoma, J., Yuwansiri, R., Murata, N., Chen, T.H. (2004).** Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants, and flowers from chilling damage. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* **40**: 474-487.
- Park, S., Cheng, N.H., Pittman, J.K., Yoo, K.S., Park, J., Smith, R.H., Hirschi, K.D. (2005).** Increased calcium levels and prolonged shelf life in tomatoes expressing arabidopsis h⁺/ca⁻² transporters. *Plant Physiology* **139**: 1194-1206.
- Peet, M. (1992).** Fruit cracking in tomato. *HortTechnology* **2**: 216-223.
- Peet, M.M., Willits, D.H., Gardner, R. (1997).** Response of ovule development and post-pollen production processes in male-sterile tomatoes to chronic, sub-acute high temperature stress. *Journal of Experimental Botany* **48**: 101-111.
- 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.

- Penefsky, H.S.** (1977). Reversible binding of pi by beef-heart mitochondrial adenosine-triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry* **252**: 2891-2899.
- Penfield, S.** (2008). Temperature perception and signal transduction in plants. *The New Phytologist* **179**: 615-628.
- Pill, W.G., Lambeth, V.N.** (1980). Effects of soil-water regime and nitrogen form on blossom-end rot, yield, water relations, and elemental composition of tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **105**: 730-734.
- Plieth, C.** (1999). Temperature sensing by plants: Calcium-permeable channels as primary sensors--a model. *The Journal of Membrane Biology* **172**: 121-127.
- Pnueli, L., Carmel-Goren, L., Hareven, D., Gutfinger, T., Alvarez, J., Ganai, M., Zamir, D., Lifschitz, E.** (1998). The self-pruning gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of cen and tfl1. *Development* **125**: 1979-1989.
- Poljakoff-Mayber, A., Lerner, H.** (1994). Plants in saline environments. M Pessarakli, ed, *Handbook of plant and crop stress*. Marcel Dekker, New York. 65-96.
- Pollard, A., Wyn Jones, R.G.** (1979). Enzyme activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes. *Planta* **144**: 291-298.
- Ponnu, J., Wahl, V., Schmid, M.** (2011). Trehalose-6-phosphate: Connecting plant metabolism and development. *Frontiers in Plant Science* **2**: 70.
- Rao, A.V., Agarwal, S.** (2000). Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *Journal of the American College of Nutrition* **19**: 563-569.
- Rasheed, R., Wahid, A., Ashraf, M.** (2010). Role of proline and glycinebetaine in improving chilling stress tolerance in sugarcane buds at sprouting. *International Journal of Agriculture and Biology* **12**: 1-8.
- Rasmussen, S., Barah, P., Suarez-Rodriguez, M.C., Bressendorff, S., Friis, P., Costantino, P., Bones, A.M., Nielsen, H.B., Mundy, J.** (2013). Transcriptome responses to combinations of stresses in arabidopsis thaliana. *Plant Physiology*
- Rasmussen, T.S., Henry, R.J.** (1990). Starch determination in horticultural plant material by an enzymic-colorimetric procedure. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **52**: 159-170.
- Rauser, W.E.** (1995). Phytochelatin and related peptides - structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiology* **109**: 1141-1149.
- Reznick, A.Z., Packer, L.** (1994). Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *OXYGEN RADICALS IN BIOLOGICAL SYSTEMS, PT C* **233**: 357-363.
- Rick, C.** (1982). Genetic-relationships between self-incompatibility and floral traits in the tomato species, Vol 101. *Biologisches Zentralblatt* 185-198.
- Rivero, R.M., Garcia, P.C., Lopez Lefebvre, L.R., Sanchez, E., Ruiz, J., García, P., López Lefebvre, L., Sánchez, E., Romero, L.** (2001). Resistance to cold and heat stress: Accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science* **160**: 315-321.
- 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**: 19631-19636.
- Rivero, R.M., Ruiz, J.M., Garcia, P.C., Lopez-Lefebvre, L.R., Sanchez, E., Romero, L.** (2002). Response of oxidative metabolism in watermelon plants subjected to cold stress. *Functional Plant Biology* **29**: 643-648.

- Rivero, R.M., Ruiz, J.M., Romero, L.M. (2004). Importance of n source on heat stress tolerance due to the accumulation of proline and quaternary ammonium compounds in tomato plants. *Plant Biology* **6**: 702-707.
- Rivero, R.M., Sanchez, E., Ruiz, J.M., Romero, L. (2003). Influence of temperature on biomass, iron metabolism and some related bioindicators in tomato and watermelon plants. *Journal of Plant Physiology* **160**: 1065-1071.
- Rizhsky, L., Liang, H., Mittler, R. (2002). The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology* **130**: 1143-1151.
- Rizhsky, L., Liang, H.J., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., Mittler, R. (2004). When defense pathways collide. The response of arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* **134**: 1683-1696.
- Rodriguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Pazmino, D.M., Testillano, P.S., Risueno, M.C., del Rio, L.A., Sandalio, L.M. (2009). Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: Cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiology* **150**: 229-243.
- Romero Aranda, R., Soria, T., Cuartero, J. (2001). Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Science* **160**: 265-272.
- Ruan, Y.L., Jin, Y., Yang, Y.J., Li, G.J., Boyer, J.S. (2010). Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: Roles in development, yield potential, and response to drought and heat. *Molecular Plant* **3**: 942-955.
- Sagi, M., Fluhr, R. (2006). Production of reactive oxygen species by plant nadph oxidases. *Plant Physiology* **141**: 336-340.
- Saltveit, M. (2005). Fruit ripening and fruit quality. E Heuvelink, ed, *Tomatoes*. CAB International, Cambridge, MA. 145-170.
- Salunkhe, D.K., Jadhav, S.J., Yu, M.H. (1974). Quality and nutritional composition of tomato fruit as influenced by certain biochemical and physiological changes. *Plant Foods for Human Nutrition* **24**: 85-113.
- Saradhi, P.P., Alia, Arora, S., Prasad, K. (1995). Proline accumulates in plants exposed to uv-radiation and protects them against uv induced peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **209**: 1-5.
- 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**: 719-726.
- Saure, M.C. (2001). Blossom-end rot of tomato (*lycopersicon esculentum* mill.) - a calcium- or a stress-related disorder? *Scientia Horticulturae* **90**: 193-208.
- Sawa, T., Nakao, M., Akaike, T., Ono, K., Maeda, H. (1999). Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: Implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 397-402.
- Schluepmann, H., van Dijken, A., Aghdasi, M., Wobbes, B., Paul, M., Smeekens, S. (2004). Trehalose mediated growth inhibition of arabidopsis seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiology* **135**: 879-890.
- Scholander, P.F., Hammel, H.T., Bradstreet, E.D., Hemmingsen, E.A. (1965). Sap pressure in vascular plants. *Science* **148**: 339-346.
- Schonher, J., Bukovac, M.J. (1973). Ion-exchange properties of isolated tomato fruit cuticular membrane - exchange capacity, nature of fixed charges and cation selectivity. *Planta* **109**: 73-93.

- Schulze, L.M., Britto, D.T., Li, M., Kronzucker, H.J.** (2012). A pharmacological analysis of high-affinity sodium transport in barley (*hordeum vulgare* L.): A $24\text{Na}^+/\text{42K}^+$ study. *Journal of Experimental Botany* **63**: 2479-2489.
- Schulze, U., Larsen, M.E., Villadsen, J.** (1995). Determination of intracellular trehalose and glycogen in *saccharomyces cerevisiae*. *Analytical Biochemistry* **228**: 143-149.
- Selby, A.** (1986). Investigations of plant diseases in forcing house and garden. *Ohio Agricultural Experimental Bulletin* **73**: 146-221.
- Shaheen, S., Naseer, S., Ashraf, M., Akram, N.** (2013). Salt stress affects water relations, photosynthesis, and oxidative defense mechanisms in *solanum melongena* L. *Journal of Plant Interactions* **8**: 85-96.
- Shao, H.B., Chu, L.Y., Lu, Z.H., Kang, C.M.** (2008). Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences* **4**: 8-14.
- Sharma, S.S., Dietz, K.J.** (2009). The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science* **14**: 43-50.
- Shen, Y.-C., Chen, S.-L., Wang, C.-K.** (2007). Contribution of tomato phenolics to antioxidation and down-regulation of blood lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 6475-6481.
- Shi, J., Le Maguer, M.** (2000). Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **40**: 1-42.
- Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G., Mittler, R.** (2008). Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum* **132**: 199-208.
- Singh, V., Shah, J.** (2012). Tomato responds to green peach aphid infestation with the activation of trehalose metabolism and starch accumulation. *Plant Signaling & Behavior* **7**: 605-607.
- Siripornadulsil, S.** (2002). Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *The Plant Cell Online* **14**: 2837-2847.
- Sithtisarn, S., Harinasut, P., Pornbunlualap, S., Cha-um, S.** (2009). Accumulation of glycinebetaine and betaine aldehyde dehydrogenase activity in *eucalyptus camaldulensis* clone t5 under in vitro salt stress. *Kasetsart Journal : Natural Science* **43**
- Slattery, C.J., Kavakli, I.H., Okita, T.W.** (2000). Engineering starch for increased quantity and quality. *Trends in Plant Science* **5**: 291-298.
- Smirnoff, N., Cumbes, Q.J.** (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**: 1057-1060.
- Srivalli, S., Khanna-Chopra, R.** (2009). Delayed wheat flag leaf senescence due to removal of spikelets is associated with increased activities of leaf antioxidant enzymes, reduced glutathione/oxidized glutathione ratio and oxidative damage to mitochondrial proteins. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 663-670.
- Stevens, M.A.** (1986). Inheritance of tomato fruit quality components. *Plant Breeding Reviews* **4**: 273-311.
- 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**: 139-144.
- Suhayda, C.G., Giannini, J.L., Briskin, D.P., Shannon, M.C.** (1990). Electrostatic changes in *lycopersicon-esculentum* root plasma-membrane resulting from salt stress. *Plant Physiology* **93**: 471-478.

- Suzuki, K., Shono, M., Egawa, Y.** (2003). Localization of calcium in the pericarp cells of tomato fruits during the development of blossom-end rot. *Protoplasma* **222**: 149-156.
- Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M.A., Mittler, R.** (2011). Respiratory burst oxidases: The engines of ros signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 691-699.
- Szabados, L., Savoure, A.** (2010). Proline: A multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* **15**: 89-97.
- Szalai, G., Kellos, T., Galiba, G., Kocsy, G.** (2009). Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation* **28**: 66-80.
- Tausz, M., Dreyer, E., De Kok, L.J.** (2009). Plant functioning in a changing global environment. *Plant Biology* **11**: 1-3.
- Taylor, I.** (1986). The tomato crop. *Springer Netherlands* 1-34.
- Taylor, M.D., Locascio, S.J.** (2004). Blossom-end rot: A calcium deficiency. *Journal of Plant Nutrition* **27**: 123-139.
- Taylor, M.D., Locascio, S.J., Alligood, M.R.** (2004). Blossom-end rot incidence of tomato as affected by irrigation quantity, calcium source, and reduced potassium. *Hortscience* **39**: 1110-1115.
- Tester, M., Davenport, R.** (2003). Na⁺ tolerance and na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* **91**: 503-527.
- Thybo, A.K., Bechmann, I.E., Brandt, K.** (2005). Integration of sensory and objective measurements of tomato quality: Quantitative assessment of the effect of harvest date as compared with growth medium (soil versus rockwool), electrical conductivity, variety and maturity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**: 2289-2296.
- 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**: 108-116.
- Tomaz, T., Bagard, M., Pracharoenwattana, I., Linden, P., Lee, C., Lindáon, P., Carroll, A., Stráher, E., Smith, S., Gardestráim, P., Millar, A.H.** (2010). Mitochondrial malate dehydrogenase lowers leaf respiration and alters photorespiration and plant growth in arabidopsis. *Plant Physiology* **154**: 1143-1157.
- Treutter, D.** (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: A review. *Environmental Chemistry Letters* **4**: 147-157.
- Tsai, Y.C., Hong, C.Y., Liu, L.F., Kao, C.H.** (2004). Relative importance of na⁺ and cl⁻ in nacl-induced antioxidant systems in roots of rice seedlings. *Physiologia Plantarum* **122**: 86-94.
- Turhan, E., Aktas, H., Deventurero, G., Karni, L., Bar-Tal, A., Aloni, B.** (2006). Blossom-end rot is associated with impairment of sugar metabolism and growth of pepper (*capsicum annum* l.) fruits. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **81**: 921-927.
- Turhan, E., Karni, L., Aktas, H., Deventurero, G., Chang, D.C., Bar-Tal, A., Aloni, B.** (2006). Apoplastic anti-oxidants in pepper (*capsicum annum* l.) fruit and their relationship to blossom-end rot. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **81**: 661-667.
- van Schaftingen, E., Hers, H.-G.** (1981). Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences* **78**: 2861-2863.

- Vargas, W.A., Pontis, H.G., Salerno, G.L.** (2007). Differential expression of alkaline and neutral invertases in response to environmental stresses: Characterization of an alkaline isoform as a stress-response enzyme in wheat leaves. *Planta* **226**: 1535-1545.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M.R.** (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany* **61**: 199-223.
- Wang, W., Pan, Z., Pan, Q.** (2009). Studying progress in salttolerant characters of crops. *Acta Agriculturae Jiangxi* **21**: 30-33.
- Wang, Y., Yu, Q., Tang, X., Wang, L.** (2009). Calcium pretreatment increases thermotolerance of laminaria japonica sporophytes. *Progress in Natural Science* **19**: 435-442.
- Waterman, P.G., Mole, S.** (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. *Oxford* 83-91.
- Webb, A.A.R., McAinsh, M.R., Taylor, J.E., Hetherington, A.M.** (1996). Calcium ions as intracellular second messengers in higher plants. *Advances in Botanical Research* **22**: 45-96.
- White, P.J.** (2001). The pathways of calcium movement to the xylem. *Journal of Experimental Botany* **52**: 891-899.
- White, P.J., Broadley, M.R.** (2001). Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: A review. *Annals of Botany* **88**: 967-988.
- White, P.J., Broadley, M.R.** (2003). Calcium in plants. *Annals of Botany* **92**: 487-511.
- Wingler, A.** (2002). The function of trehalose biosynthesis in plants. *Phytochemistry* **60**: 437-440.
- 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**: 717-724.
- Wu, M., Kubota, C.** (2008). Effects of high electrical conductivity of nutrient solution and its application timing on lycopene, chlorophyll and sugar concentrations of hydroponic tomatoes during ripening. *Scientia Horticulturae* **116**: 122-129.
- Xu, G.H., Magen, H., Tarchitzky, J., Kafkafi, U.** (2000). Advances in chloride nutrition of plants. DL Sparks, ed, *Advances in agronomy*, Vol **68**. Elsevier Academic Press Inc, San Diego. 97-150.
- Yamaguchi, T., Blumwald, E.** (2005). Developing salt-tolerant crop plants: Challenges and opportunities. *Trends in Plant Science* **10**: 615-620.
- Yancey, P.** (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology* **208**: 2819-2830.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., Somero, G.N.** (1982). Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222.
- Yermiyahu, U., Nir, S., Benhayyim, G., Kafkafi, U.** (1994). Quantitative competition of calcium with sodium or magnesium for sorption sites on plasma-membrane vesicles of melon (cucumis-melo l) root-cells. *Journal of Membrane Biology* **138**: 55-63.
- 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⁺/h⁺ antiporters in the salt stress response. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* **30**: 529-539.
- Yoon, H.-S., Kim, S.-Y., Kim, I.-S.** (2013). Stress response of plant h⁺-ppase-expressing transgenic escherichia coli and saccharomyces cerevisiae: A potentially useful mechanism for the development of stress-tolerant organisms. *Journal of Applied Genetics* **54**: 129-133.

-
- Zhang, C.S., Lu, Q., Verma, D.P.S.** (1995). Removal of feedback inhibition of delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first 2 steps of proline biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 20491-20496.
- Zhang, J.-H., Liu, Y.-P., Pan, Q.-H., Zhan, J.-C., Wang, X.-Q., Huang, W.-D.** (2006). Changes in membrane-associated h⁺-atpase activities and amounts in young grape plants during the cross adaptation to temperature stresses. *Plant Science* **170**: 768-777.
- Zhang, K.W., Guo, N., Lian, L.J., Wang, J., Lv, S.L., Zhang, J.R.** (2011). Improved salt tolerance and seed cotton yield in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by transformation with beta gene for glycinebetaine synthesis. *Euphytica* **181**: 1-16.
- Zhang, Y., Andralojc, P.J., Hey, S.J., Primavesi, L.F., Specht, M., Koehler, J., Parry, M.A.J., Halford, N.G.** (2008). Arabidopsis sucrose non-fermenting-1-related protein kinase-1 and calcium-dependent protein kinase phosphorylate conserved target sites in aba response element binding proteins. *Annals of Applied Biology* **153**: 401-409.
- Zhang, Y., Andralojc, P.J., Hey, S.J., Primavesi, L.F., Specht, M., Koehler, J., Parry, M.A.J., Halford, N.G.** (2008). Arabidopsis sucrose non-fermenting-1-related protein kinase-1 and calcium-dependent protein kinase phosphorylate conserved target sites in aba response element binding proteins. *Annals of Applied Biology* **153**: 401-409.
- Zhao, K.-F., Harris, P.J.C.** (1992). The effects of iso-osmotic salt and water stresses on the growth of halophytes and non-halophytes. *Journal of Plant Physiology* **139**: 761-763.
- Zushi, K., Matsuzoe, N.** (2011). Utilization of correlation network analysis to identify differences in sensory attributes and organoleptic compositions of tomato cultivars grown under salt stress. *Scientia Horticulturae* **129**: 18-26.