

**UNIVERSITAT JAUME I**

**Escuela Superior de Tecnología y Ciencias Experimentales**



**UNIVERSITAT  
JAUME•I**

**INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL  
MEDIO RURAL**

**Respuesta fisiológica y hormonal al estrés combinado  
de salinidad y calor en mutantes de tomate deficientes  
en ABA**

**Estudiante/a:** David Diago Almela

**Tutor/a:** María Fernanda López Climent

**Convocatoria:** Noviembre 2020

# ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
1.1 Cultivo del tomate .....	6
1.2 Estrés ambiental .....	7
1.2.1 Estrés salino.....	7
1.2.2 Estrés combinado .....	8
1.2.3 Ácido abscísico (ABA).....	8
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
3.1 Material vegetal, condiciones de cultivo y tratamiento del estrés .....	10
3.2 Crecimiento de las plantas.....	11
3.3 Parámetro de fluorescencia de clorofilas.....	11
3.4 Contenido de cloruros .....	11
3.5 MDA .....	12
3.6 Capacidad antioxidante total.....	12
3.7 Contenido hormonal .....	13
3.8 Análisis estadístico.....	14
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>14</b>
4.1 Crecimiento de plantas.....	14
4.2 Parámetro de fluorescencia de clorofilas (QY) .....	16
4.3 Contenido de cloruros .....	17
4.4 MDA .....	18
4.5 Capacidad antioxidante .....	19
4.6 Contenido Hormonal.....	21
4.6.1 Ácido abscísico (ABA) .....	21
4.6.2 Ácido salicílico (SA).....	22
4.6.3 Ácido jasmónico (JA) .....	23
4.7 Prolina .....	24
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>24</b>

<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>27</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>28</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Datos del crecimiento de las plantas en los diferentes grupos de ensayo (25°C CT, 25° C ST, 40° C CT, 40°C ST) del ecotipo silvestre (LK) y el mutante (*not*), tras 2 días de estrés (1) y tras 5 días de estrés (2).....**14**
- FIGURA 2.** Eficiencia cuántica del fotosistema II ( $\phi$ PSII) de las plantas respecto los diferentes tipos de estreses (25°C CT, 25° C ST, 40° C CT, 40°C ST) del ecotipo silvestre (LK) y el mutante (*not*), tras 2 días de estrés (1) y tras 5 días de estrés (2) .....**16**
- FIGURA 3.** Contenido de cloruros en las hojas de los distintos grupos de ensayo (25°C CT, 25° C ST, 40° C CT, 40°C ST) del ecotipo silvestre (LK) y su mutante (*not*) tras 5 días de estrés.....**17**
- FIGURA 4.** Contenido de malondialdehído (MDA) en las plantas de los distintos grupos de (25°C CT, 25° C ST, 40° C CT, 40°C ST) del ecotipo silvestre (LK) y el mutante (*not*), tras 2 días de estrés (1) y tras 5 días de estrés (2) .....**18**
- FIGURA 5.** Efecto de la concentración de los antioxidantes sobre la inhibición del ABTS en los distintos grupos de ensayo (25°C CT, 25° C ST, 40° C CT, 40°C ST) del ecotipo silvestre (LK) y el mutante (*not*), tras 2 días de estrés (1) y tras 5 días de estrés (2) .....**19**
- FIGURA 6.** Efecto de la concentración de los antioxidantes sobre la inhibición del ABTS a los dos minutos de la reacción en todos los grupos de ensayo (25°C CT, 25° C ST, 40° C CT, 40°C ST) del ecotipo silvestre (LK) y el mutante, tras 2 días de estrés (1) y tras 5 días de estrés (2).....**20**
- FIGURA 7.** Contenido foliar de ácido abscísico (ABA) de los distintos grupos de ensayo (25°C CT, 25° C ST, 40° C CT, 40°C ST) del ecotipo silvestre (LK) y el mutante (*not*), tras 2 días de estrés (1) y tras 5 días de estrés (2).....**21**
- FIGURA 8.** Contenido foliar de ácido salicílico (SA) en los grupos de ensayo (25°C CT, 25° C ST, 40° C CT, 40°C ST) del ecotipo silvestre (LK) y su mutante (*not*), tras 2 días de estrés (1) y tras 5 días de estrés (2).....**22**
- FIGURA 9.** Contenido foliar de ácido jasmónico (JA) en los diferentes grupos de ensayo (25°C CT, 25° C ST, 40° C CT, 40°C ST) del ecotipo silvestre (LK) y su mutante (*not*), tras 2 días de estrés (1) y tras 5 días de estrés (2).....**23**
- FIGURA 10.** Contenido foliar de prolina en los distintos grupos de ensayo (25°C CT, 25° C ST, 40° C CT, 40°C ST) del ecotipo silvestre (LK) y el mutante (*not*), tras dos días de estrés (1) y tras 5 días de estrés (2).....**24**

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS UTILIZADOS

<i>not</i>	Notabilis
LK	Lukullus
ST	Plantas estrés
CT	Plantas control
ABA	Ácido abscísico
JA	Ácido jasmónico
SA	Ácido salicílico
MDA	Malondialdehido
Rpm	Revoluciones por minuto
Min	Minutos
MeOH	Metanol
T1	Tiempo 1, tras 2 días
T2	Tiempo 2, tras 5 días
NaCl	Cloruro sódico (sal común)
mM	Mili molar
PSII	Fotosistema II

# 1. Introducción

## 1.1 Cultivo del tomate

El tomate es un cultivo de la familia *solanaceae*, del género *solanum*, sección *lycopersicon* y especie *solanum lycopersicum L.* Las primeras variedades silvestres se encontraban en Perú, Ecuador, Colombia y Chile, y cuyo centro de domesticación se considera México (Esquinas A. 2001)

Se caracterizan por poseer hojas alternas sobre el tallo, compuestas e imparipinnadas, con foliolos peciolados, lobulados, con borde dentado y recubiertos de vellosidades, produce inflorescencia en racimos y cada flor tiene 5 o más sépalos e igual número de pétalos amarillos y de estambres soldados, con un solo ovario bi o plurilocular, sus frutos son bayas bi o plurilocular carnosos y cuyas partes se dividen en epidermis, pericarpio placenta y semillas, los frutos pueden ser de color rojo, roja, amarillo, naranja, verde...(Sobrino Vesperinas E. 2010)

El ciclo biológico de la planta de tomate dura entre 4 y 6 meses, es una planta que se adapta a un amplísimo rango de condiciones ambientales aunque produce mayores cosechas en ambientes moderadamente cálidos sin exposiciones prolongadas a temperaturas menores de 10° C y con buena iluminación.

Uno de los problemas medioambientales más preocupantes actualmente son las consecuencias derivadas del cambio climático, los datos son alarmantes, ya que la temperatura mundial ha aumentado 1,1° C desde la época preindustrial y el nivel del mar asciende 5 mm anuales desde 2015-2019 (Organización meteorológica mundial (OMM)). Este incremento puede afectar de forma muy negativa a los cultivos. En el caso concreto del tomate se producen mayores cosechas con temperaturas moderadamente altas, sin embargo las consecuencias indirectas del cambio climático puede afectar muy negativamente a este tipo de cultivo ya que se propician sequías prolongadas producidas por el aumento de la temperatura mundial y la escasez de precipitaciones, y al ser un cultivo que necesita cantidades abundantes de agua para desarrollarse de forma óptima se puede ver gravemente afectado.

## 1.2 Estrés ambiental.

El estrés ambiental se puede definir como la presencia de un factor externo a la planta provocado por el medio ambiente que ejerce una influencia negativa sobre ella (Mano et al. 2002)

Este tipo de estrés se puede dividir dependiendo de su origen, puede tener un origen abiótico, es decir, estrés en el cual no intervienen los seres vivos, como puede ser la sequía, exceso de sales en el suelo, calor, frío, congelación, inundaciones... u origen biótico, el cual es un estrés provocado por la acción directa de los seres vivos como puede ser el ataque de animales, nematodos, bacterias, hongos o virus, otras plantas...

El estrés de origen abiótico es el que se ve enormemente acentuado por el cambio climático, ya que al subir la temperatura del planeta los problemas de sequía, calor... se ven acentuados, es por ello por lo que en esta investigación nos hemos querido centrar en la combinación de estos estreses.

### 1.2.1 Estrés salino.

El estrés salino se entiende como el exceso de sal (NaCl) en el suelo de plantación o el agua que se utiliza para el riego del cultivo que provoca reacciones negativas en la planta (Alexis Lamz Piedra, 2013). Dependiendo del cultivo sometido a este estrés los daños en la planta pueden ser más o menos acentuados, en el caso concreto del tomate (*solanum lycopersicum L.*), cabe destacar que es un cultivo que tolera moderadamente la salinidad.

Según el origen de las sales presentes en el suelo se pueden distinguir dos tipos de salinización, natural o antropogénica, natural es aquella en la que las sales presentes en la tierra o en las aguas subterráneas tienen un origen mineral por la acción de la atmósfera sobre los minerales que forman las rocas, sedimentos y los propios suelos (Tanji, 2002) y la antropogénica es la causada por acción directa del hombre, como la producida una práctica de riego inadecuada.

El exceso de salinidad en el suelo provoca un desajuste osmótico entre el suelo y las raíces de la planta, produciendo una reducción del crecimiento e incluso puede llegar a ser letal para la planta (Storey y Walker, 1999). La planta se ve afectada por la salinidad de estrés

debido al estrés osmótico, al desequilibrio nutricional y a la toxicidad de los iones que produce el estrés salino (Al Yassin, 2004).

Frente a este tipo de estrés las plantas han desarrollado distintos tipos de respuesta: mecanismos para evitar el estrés, procesos de adaptación o cierta tolerancia a estos estreses (Zhu, 2001)

### **1.2.2 Estrés combinado**

El estrés combinado se puede definir como la presencia de más de un factor ambiental, tanto de origen abiótico como de origen biótico, que provoca efectos negativos en una misma planta, las respuestas de la planta pueden ser iguales o totalmente distintas a las producidas por la planta cuando está sometida a un solo estrés. Por ejemplo, la combinación de estrés salino y estrés por calor provoca una respuesta en cítricos en la que la transpiración sigue activa para disminuir los efectos de las altas temperaturas y por tanto aumenta la acumulación de sal (NaCl) hasta alcanzar unos niveles letales para la planta aumentando así su efecto negativo en la planta comparado con ambos estreses por separado (Balfagón et al. 2019).

Por tanto, en este estudio se plantea someter a un grupo de plantas a un estrés combinado de calor y salinidad. Ambos estreses se aplicarán mediante el riego con una solución salina y mediante la subida de temperatura con un calefactor eléctrico.

### **1.2.3 Ácido abscísico (ABA)**

El ácido abscísico es una fitohormona cuya fórmula molecular es  $C_{15}H_{20}O_4$  , tiene funciones importantes dentro de la planta, sobretodo participando en las respuestas a estreses ya sean de tipo biótico o abiótico, además esta hormona interviene en el crecimiento y desarrollo de la planta.

La ruta de biosíntesis del ABA se inicia en los cloroplastos y finaliza en el citosol, se sintetiza a partir de la hidroxilación de carotenoides (C40). Durante este proceso de hidroxilación, el fitoteno se convierte en licopeno, este licopeno mediante reacciones de hidroxilación y ciclación forma la zeaxantina que se convertirá en violaxantina, esta reacción esta catalizada por una zeaxantina epoxidasa originando el compuesto 9'-cis-neoxantina que mediante la enzima 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa pasa a xantoxina



que en citosol cambia espontáneamente a ABA aldehído para oxidarse a ABA (Seo y Koshiba, 2002). Uno de los mutantes más usados para el estudio de la interacción hormonal relacionado con el ABA es *notabilis* que presenta reducida la actividad de la enzima 9-cis-epoxicarotenoide, por una mutación en uno de los genes que lo codifica.

El ABA es la hormona que se considera el principal regulador en condiciones de salinidad, provocando una reducción del crecimiento, aumento de la conductividad de las raíces y la inducción de algunos genes de tolerancia al estrés (Skriver et al. 2007, Zeevart et al. 2003, Peleg et al. 2011). Además, el ABA también es uno de los reguladores clave en condiciones de estrés combinado de salinidad y sequía (Danquah et al. 2014).

Dada la importancia del ABA en la respuesta a diversos estreses y en concreto al estrés por salinidad. En este proyecto de investigación se plantea evaluar la respuesta a la combinación de estrés salino y calor en el mutante *notabilis* deficiente en esta hormona.

## 2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es evaluar la respuesta fisiológica frente al estrese combinado de salinidad y calor en plantas de tomate del ecotipo silvestre lukullus (LK) y del mutante deficiente en ABA, *notabilis (not)*.

Para ello, como objetivos específicos se ha establecido:

- Determinar el papel del ABA en la respuesta fisiológica de la planta frente al estrés combinado
- Caracterizar el patrón de respuesta hormonal en el ecotipo silvestre LK en respuesta al estrés combinado estableciendo la posible relación con otras hormonas como el JA y el SA
- Estudiar el efecto de la deficiencia de ABA característica del mutante *notabilis* sobre el patrón hormonal de respuesta al estrés combinado

### 3. Material y métodos

#### 3.1 Material vegetal, condiciones de cultivo y tratamiento del estrés

El material vegetal utilizado para la realización de este trabajo de investigación fueron semillas del ecotipo silvestre *lukullus* y del mutante deficiente en ABA (*notabilis*). Dichas semillas se plantaron sobre vermiculita en semilleros de 13x8 alveolos (cada alveolo de 4x4x6 cm). Una vez germinadas las plantas se trasplantaron a macetas de 7x7x8 cm y, se mantuvieron en crecimiento controlado en invernadero hasta que alcanzaron entre 7 y 8 hojas por planta. Una vez obtenido el tamaño deseado se aclimataron una semana en los pequeños invernaderos que se emplearon para llevar a cabo los distintos experimentos. Dentro de cada invernadero las plantas se dividieron en 2 subgrupos (que contenían el mismo número de plantas LK y *not*) para poder inducir el estrés salino sobre uno de ellos y el otro mantenerlo en condiciones control. El grupo de plantas sometidas a salinidad se regaron con una solución salina de 120 mM de NaCl, mientras que el grupo control se regó con agua destilada. Estos riegos se realizaron 1 vez cada dos días, es decir, se proporcionó un riego para las plantas muestreadas en el tiempo 1 y dos riegos para las plantas muestreadas en el tiempo 2. Para aplicar el estrés combinado, a la vez que se impuso el estrés salino uno de los invernaderos se calentó con unos calefactores eléctricos (Ecoheat 135W, Hydrogarden), controlados con un termostato (Romberg, con rango de temperatura 0-50°C) con el que se estableció un ciclo de 8 horas a 40°C y 16 horas a 30°C. Los grupos de este invernadero se denominaron “plantas a 40°C con estrés salino” y “plantas a 40°C de control”. En el otro invernadero se aplicó el mismo estrés salino pero se dejó en ciclos de temperatura de 8 horas a 25°C y 16 horas a 17°C, simulando un día de campo, éstos serían los grupos denominados “plantas a 25°C con estrés salino” y “plantas a 25°C de control”.

Tras dos días de estrés se midió la fluorescencia, el crecimiento y se recogieron la mitad de las plantas, congelando el material vegetal con nitrógeno líquido. A continuación, se machacaron con el mortero todo el material vegetal recolectado previamente y se guardó en el congelador a -20°C para la realización de los análisis posteriores. Este grupo de plantas serían las denominadas “Tiempo 1”. Tras 5 días sometidos a los estreses realizamos el mismo proceso con las plantas restantes, siendo el grupo denominado “Tiempo 2”.

### 3.2 Crecimiento de las plantas

Uno de los parámetros evaluado en los distintos grupos de ensayo fue el crecimiento de las plantas. Para ello, se realizó la medida directa, con una regla, del tallo desde la zona basal hasta el ápice.

### 3.3 Parámetro de fluorescencia de clorofilas ( $\phi$ PSII)

Este parámetro sirve para cuantificar el valor de la fluorescencia de clorofilas, que es un fenómeno foto-físico de las moléculas de clorofila que permite estudiar la sensibilidad del fotosistema II al daño (Maxwell K, 2000) Este parámetro se midió mediante un fluorómetro digital portátil de la marca FluorPen FP 100 (Photon Systems Instruments, República Checa). En este caso se midieron 3 hojas diferentes de una misma planta y 3 veces cada hoja, obteniendo un total de 9 mediciones por planta y midiendo un total de 3 plantas por grupo.

### 3.4 Contenido de cloruros

Para la determinación del contenido de cloruros utilizamos el método de medición de cloruros descrito en Gómez- Cadenas et al. (1998), con algunas pequeñas modificaciones. Brevemente se pusieron 25 mL del tampón de extracción en matraces de cristal junto con 200 mg de peso fresco de la muestra, se agitó, y se dejó durante 24h a temperatura ambiente y tapado.

Una vez pasadas las 24h se determinaron los cloruros mediante el clorímetro (Modelo 626, Sherwood Scientific Ltd., Cambridge, UK) empleando 500 $\mu$ L de la muestra previamente filtrada. El aparato se calibró con una solución estándar de 200mg/L (Sherwood Scientific<sup>TM</sup>, Chloride Standard Solution).

### 3.5 MDA

Para este análisis se utilizó el método de Hodges et al. (1999).

Según este protocolo, en primer lugar se pesaron 200mg de peso fresco de las muestras en tubos de 15mL y se añadieron 2mL de etanol al 80%, todo ello en hielo. Después los tubos se pusieron al ultrasonidos durante 30 min y una vez terminado el ultrasonidos se centrifugaron a 4500 rpm durante 20 min a 4°C. Seguidamente se prepararon la misma cantidad de tubos a los que se les incorporó 800µL de una mezcla A que contenía ácido tricloroacético (TCA) al 20% y el mismo número de tubos donde se incorporaron 800µL de una mezcla B que contenía ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% + TCA 20%. Una vez centrifugada la mezcla de la extracción se pusieron 800µL del sobrenadante a cada uno de los tubos de la mezcla A y B y se llevaron al baño durante 1h a 90 °C. Al terminar se enfriaron las muestras en hielo durante 15 minutos y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min y a 4 °C. Finalmente, se procedió a la medida de las absorbancias mediante el espectrofotómetro Genesys™ 10 (Thermo Spectronic, E.E.U.U), la mezcla A 532 y 600nm y la mezcla B a 440, 532 y 600nm.

Los valores de MDA se obtuvieron mediante las fórmulas descritas en el mismo artículo:

(-TBA = Mezcla A; + TBA = Mezcla B)

$$((A_{532}+TBA) - (A_{600}+TBA)) - ((A_{532}-TBA) - (A_{600}-TBA)) = A$$
$$((A_{440}+TBA) - (A_{600}+TBA)) * 0.0571 = B$$
$$\text{MDA equivalentes (nmol} \cdot \text{mL}^{-1}) = ((A-B) / 157000 * 1000000)$$

### 3.6 Capacidad antioxidante total

Para realizar las medidas de la capacidad antioxidante se utilizó el método ABTS (Roberta Re et al.1999). Se pesaron 50mg de peso fresco de la muestra en eppendorf de 2mL y se añadió 1mL de MeOH. A continuación, se extrajo con el molinillo de bolas a una frecuencia de 18 rpm durante 5 minutos y al terminar se centrifugaron las muestras a 12500 rpm durante 12 minutos a 4 °C. Tras la centrifuga se recogió el sobrenadante en tubos de 15mL y se llevó a sequedad en una centrifuga de evaporación al vacío (Speed-vac, Jouan, Saint Herblain Cedex, Francia). Una vez seco se resuspendió con una solución de MeOH al 80% durante

10 min en el ultrasonido. Seguidamente, se ajustó la solución de ABTS +K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> preparada el día anterior a una absorbancia de 0,7 en la longitud de onda de 734 nm. En último lugar, tras añadir 10µL de extracto de la muestra a 1 ml de la solución de ABTS ajustada se midió con el espectrofotómetro a la misma longitud de onda al minuto 1, 2 y 3, repitiendo el proceso para cada muestra.

### 3.7 Contenido hormonal

Para la determinación del contenido de fitohormonas se utilizó el protocolo elaborado por Durgbanshi et al. (2005), con alguna pequeña modificación. Brevemente, se pesaron 200 mg de peso fresco para cada muestra en eppendorf de 2mL y se añadieron 25 µL de una mezcla de estándar interno que contenía 50 ng de [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]- ácido abscísico, [C<sub>13</sub>]- ácido salicílico y ácido dehidrojasmonico, 5 o 6 bolas de vidrio y 2 ml agua destilada. Seguidamente se extrajo con un molinillo de bolas a 15 rpm durante 10 minutos y se centrifugaron las muestras a 14000 rpm durante 10 min a 4°C. Una vez centrifugado se recogió el sobrenadante en tubos de 15mL y se ajustó el pH a 2,8-3,2 mediante la utilización de ácido acético al 30%, después se le añadieron 2mL de dietiléter y se centrifugaron las muestras a 2100 rpm durante 4 minutos a 4°C. A continuación, se recogió el sobrenadante en tubos de 15 nuevos y se repitió el proceso de añadir dietiléter y de centrifugar.

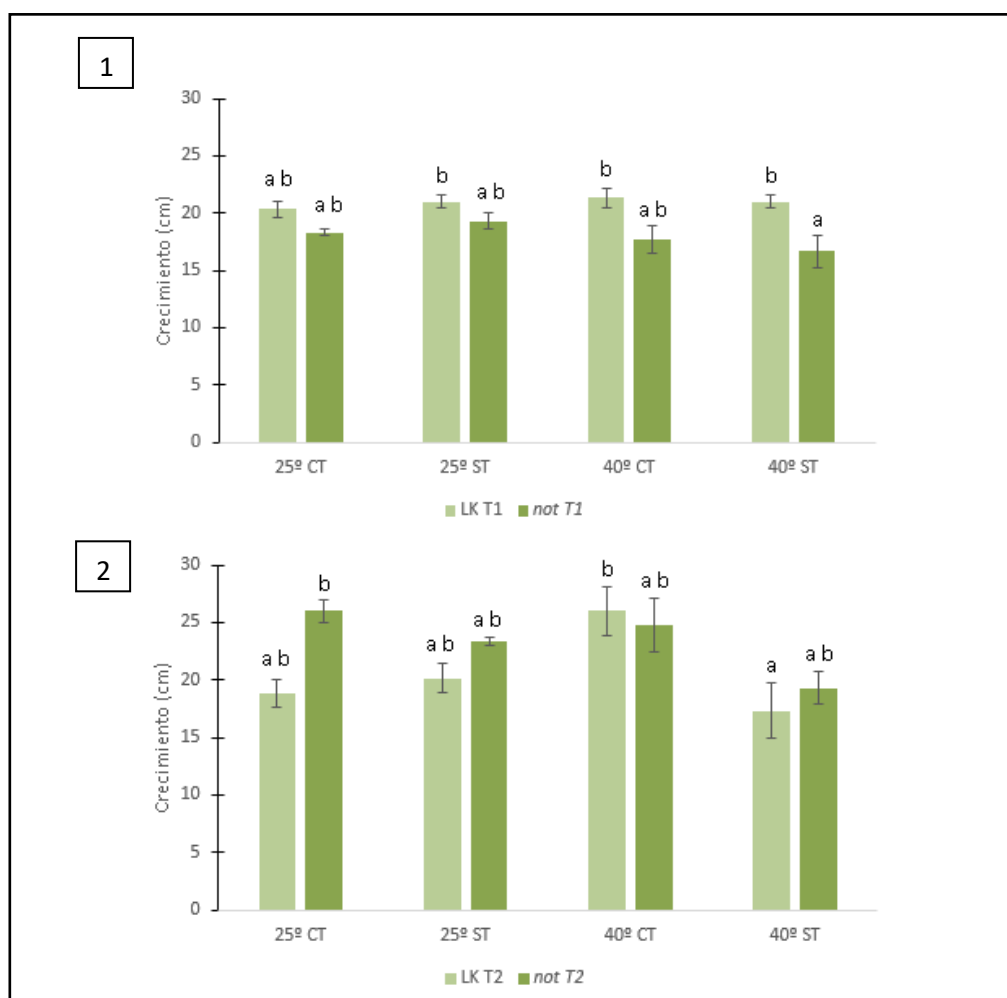
Finalmente se llevó a sequedad en la centrífuga de evaporación al vacío y el día de antes de inyectar las muestras se resuspendieron en 500µL de H<sub>2</sub>O:MeOH (90:10), 10 min de ultrasonidos y se filtraron a través de un filtro PTFE de 0,2 µm y se inyectaron en el equipo cromatográfico UPLC-MS (Acquity SDS, Waters Corp., Milford, MA, USA), la separación cromatográfica se realizó por medio de una columna de fase reversa C18 (Luna Omega, 50 x 2,1 mm tamaño de 1,68µm, Phenomenex, E.E.U.U.) y un gradiente de MeOH y H<sub>2</sub>O (ambas con 0,1% de ácido acético) a un flujo de 300 µL/min. La cuantificación de las distintas hormonas se realizó mediante la extrapolación de la respuesta a una curva estándar realizada para cada una de ellas.

### 3.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de todas las mediciones realizadas se ha utilizado el programa informático InfoStat (Di Rienzo et al. (2013)). Mediante este software se han realizado análisis ANOVA, seguidos de un test posthoc Turkey a todos aquellos datos en los cuales se detectaron diferencias significativas ( $p$ -valor < 0,05).

## 4. Resultados

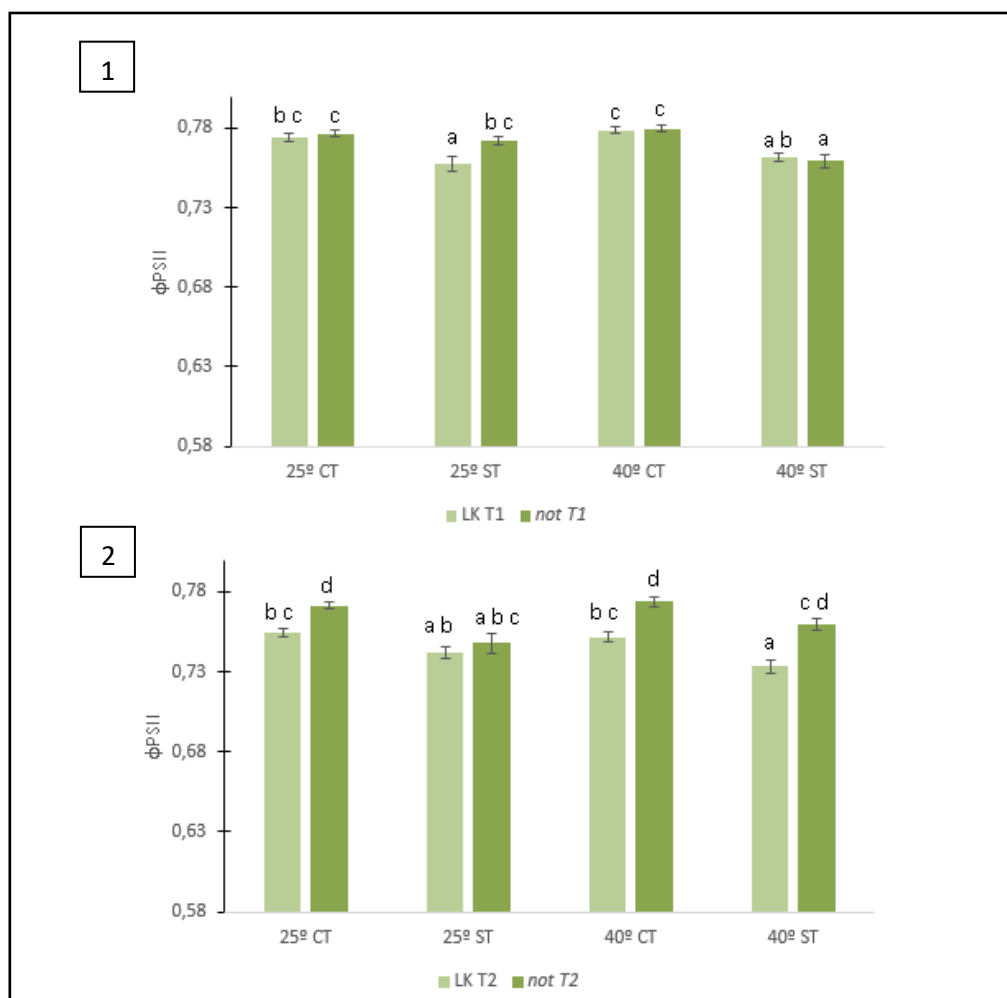
### 4.1 Crecimiento de plantas



**Figura 1.** Datos del crecimiento de las plantas en los diferentes grupos de ensayo (25°C CT, 25°C ST, 40°C CT, 40°C ST) del ecotipo silvestre (LK) y el mutante (*not*), tras 2 días de estrés (1) y tras 5 días de estrés (2). Las diferentes letras indican las diferencias significativas según el test de Turkey ( $p < 0,05$ ).

En cuanto a los datos obtenidos en el crecimiento de las plantas, se observa que tras 2 días de estrés (Figura 1-1) el crecimiento de las plantas fue similar en todos los grupos de ensayo para LK y *not* salvo en el estrés combinado de calor y salinidad. En dicho grupo el crecimiento fue ligeramente mayor en las plantas LK con respecto al mutante deficiente en ABA (*not*). Sin embargo, tras 5 días (Figura 1-2) a pesar de no observarse grandes diferencias entre LK y *not*, los datos muestran que las plantas del ecotipo silvestre LK sometidas a estrés combinado de salinidad y calor (40°C ST) crecieron menos que las plantas de LK sometidas solamente al estrés por temperatura (40°C CT) mientras que en los grupos de ensayo a 25°C no se observaron diferencias significativas. Por el contrario, en el caso de *not* los valores fueron similares en todos los grupos de ensayo salvo en el grupo 25°CCT que mostró un mayor crecimiento con respecto al resto.

## 4.2 Parámetro de fluorescencia de clorofilas ( $\phi$ PSII)



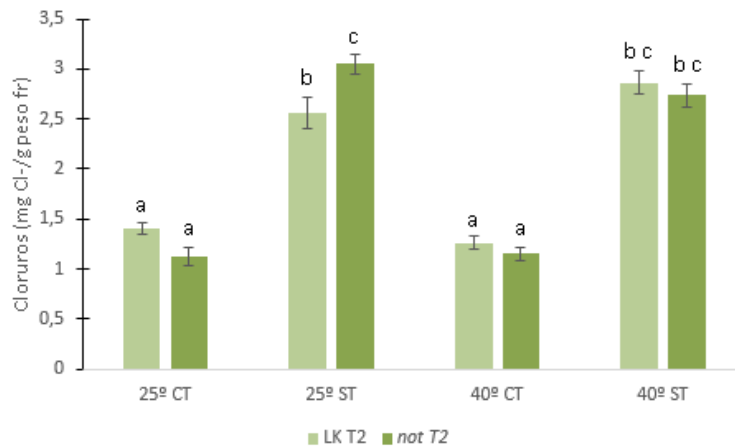
**Figura 2.** Eficiencia cuántica del fotosistema II ( $\phi$ PSII) de las plantas respecto los diferentes tipos de estreses (25°C CT, 25°C ST, 40°C CT, 40°C ST) del ecotipo silvestre (LK) y el mutante (*not*), tras 2 días de estrés (1) y tras 5 días de estrés (2). Las diferentes letras indican las diferencias significativas según el test de Turkey ( $p < 0,05$ ).

En la Figura 2 se muestran los valores de la eficiencia cuántica del fotosistema II en condiciones de luz. Tras 2 días en situación de estrés (Figura 2-1) los valores más altos se observaron en las plantas de LK y *not*, en condiciones 40°C CT mientras que en condiciones de 40°ST los valores descendieron en ambos cultivares. Además, los valores de  $\phi$ PSII obtenidos en las plantas del mutante *not* en los grupos de ensayo a 25° fueron similares a los observados en el grupo 40°C. Por el contrario, en las plantas LK si se observó un ligero descenso en el grupo 25°ST con respecto al grupo CT. A los 5 días de estrés (Figura 2-2) los valores más altos se observaron en los grupos CT del mutante *not*



para ambas condiciones de temperatura y el valor más bajo se observó en las plantas de LK sometidas a estrés combinado de salinidad y calor.

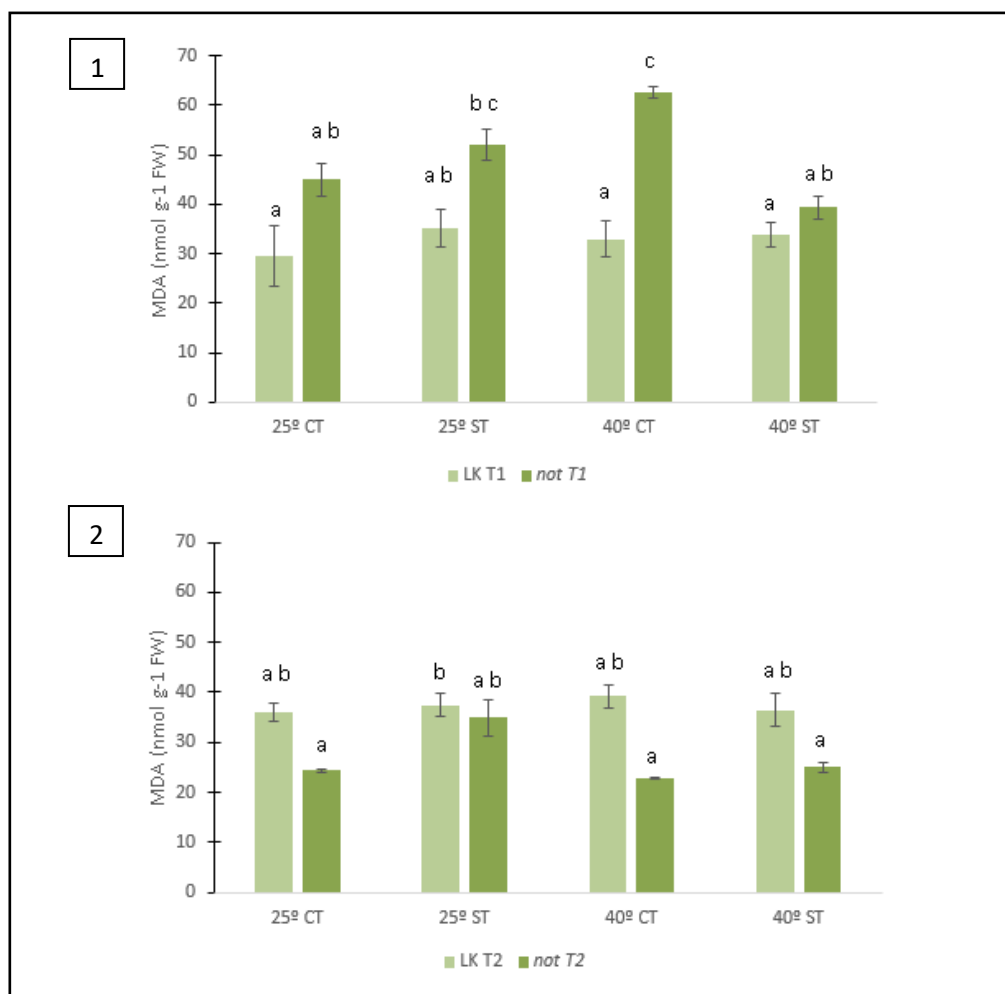
### 4.3 Contenido de cloruros



**Figura 3.** Contenido de cloruros en las hojas de los distintos grupos de ensayo (25°C CT, 25° C ST, 40°C CT, 40°C ST) del ecotipo silvestre (LK) y su mutante (*not*) tras 5 días de estrés. Las diferentes letras indican las diferencias significativas según el test de Turkey ( $p < 0,05$ ).

Para evaluar la intoxicación salina en la planta se determinó el contenido de cloruros a nivel foliar únicamente tras 5 días de estrés. Tal y como se observa en la Figura 3, los valores de cloruros en las plantas expuestas al estrés salino y al estrés combinado fueron casi el doble con relación a los observados en los grupos CT respectivamente. Sin embargo, la cantidad de cloruros fue ligeramente mayor en *not* que en LK en los grupos de ST a 25° mientras que en los grupos de ST a 40° de LK y *not* no se observaron diferencias significativas entre ellos.

## 4.4 MDA

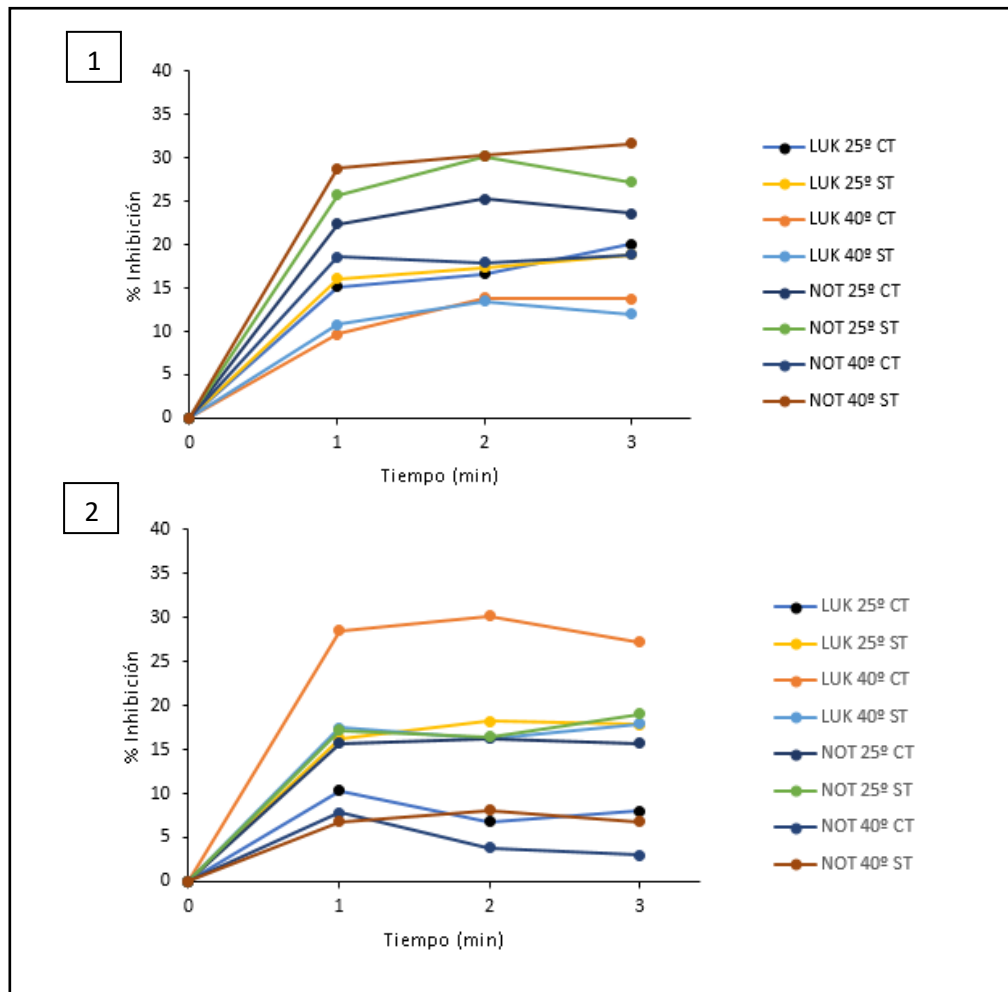


**Figura 4.** Contenido de malondialdehído (MDA) en las plantas de los distintos grupos de ensayo (25°C CT, 25°C ST, 40°C CT, 40°C ST) del ecotipo silvestre (LK) y el mutante (*not*), tras 2 días de estrés (1) y tras 5 días de estrés (2). Las diferentes letras indican las diferencias significativas según el test de Turkey ( $p < 0,05$ ).

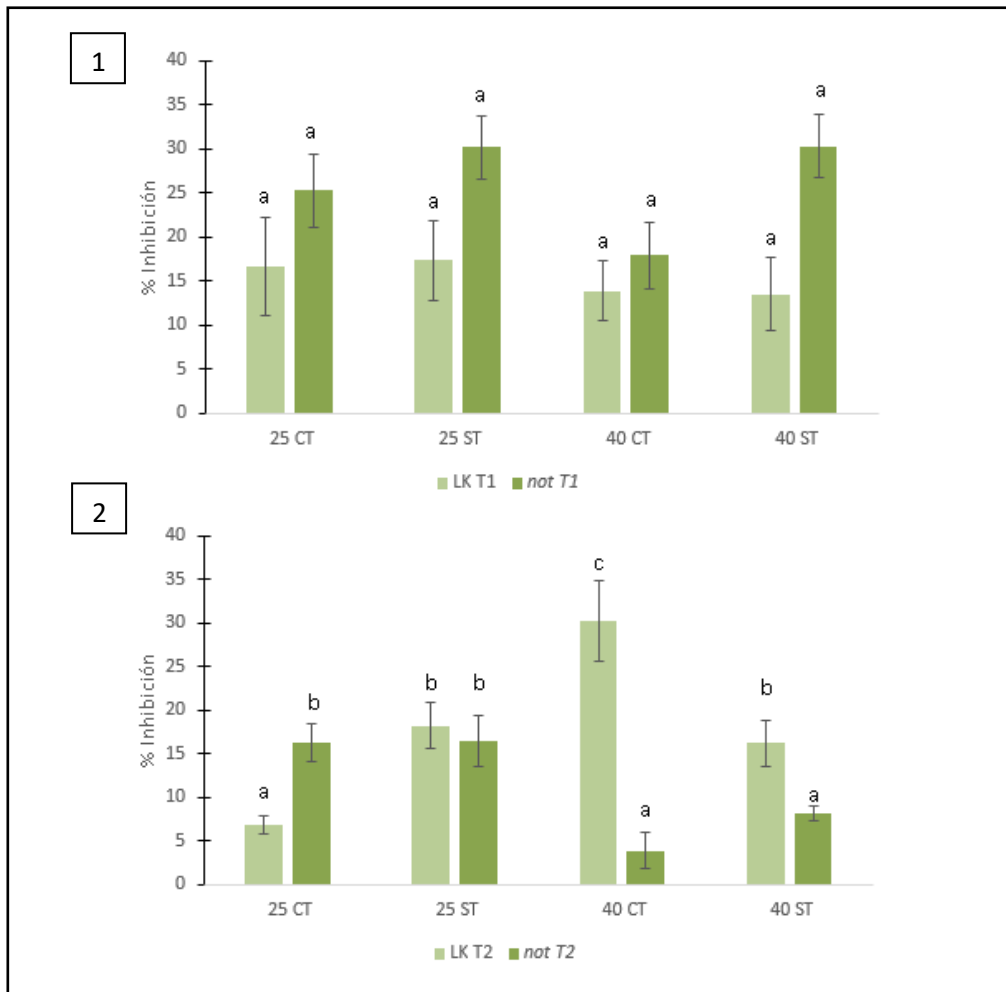
En los datos obtenidos en las plantas analizadas tras 2 días de estrés (Figura 4-1) se observa que en los grupos del mutante *not* los valores de MDA son más altos con respecto a LK en las plantas de 25°C ST y en las plantas de 40°C CT. Sin embargo, las plantas del ecotipo silvestre LK muestran valores de MDA similares en todos los grupos de ensayo.

En cambio en las plantas analizadas tras 5 días de estrés (Figura 4-2) se puede apreciar una disminución considerable del contenido de MDA en las plantas de *not* 25°C ST, 40°C CT y 40°C ST con respecto a los datos obtenidos tras 2 días de estrés, mientras que los valores de MDA en los grupos de LK son similares.

## 4.5 Capacidad antioxidante total



**Figura 5.** Efecto de la concentración de los antioxidantes sobre la inhibición del ABTS en los distintos grupos de ensayo (25°C CT, 25° C ST, 40°C CT, 40°C ST) del ecotipo silvestre (LK) y el mutante (*not*), tras 2 días de estrés (1) y tras 5 días de estrés (2).

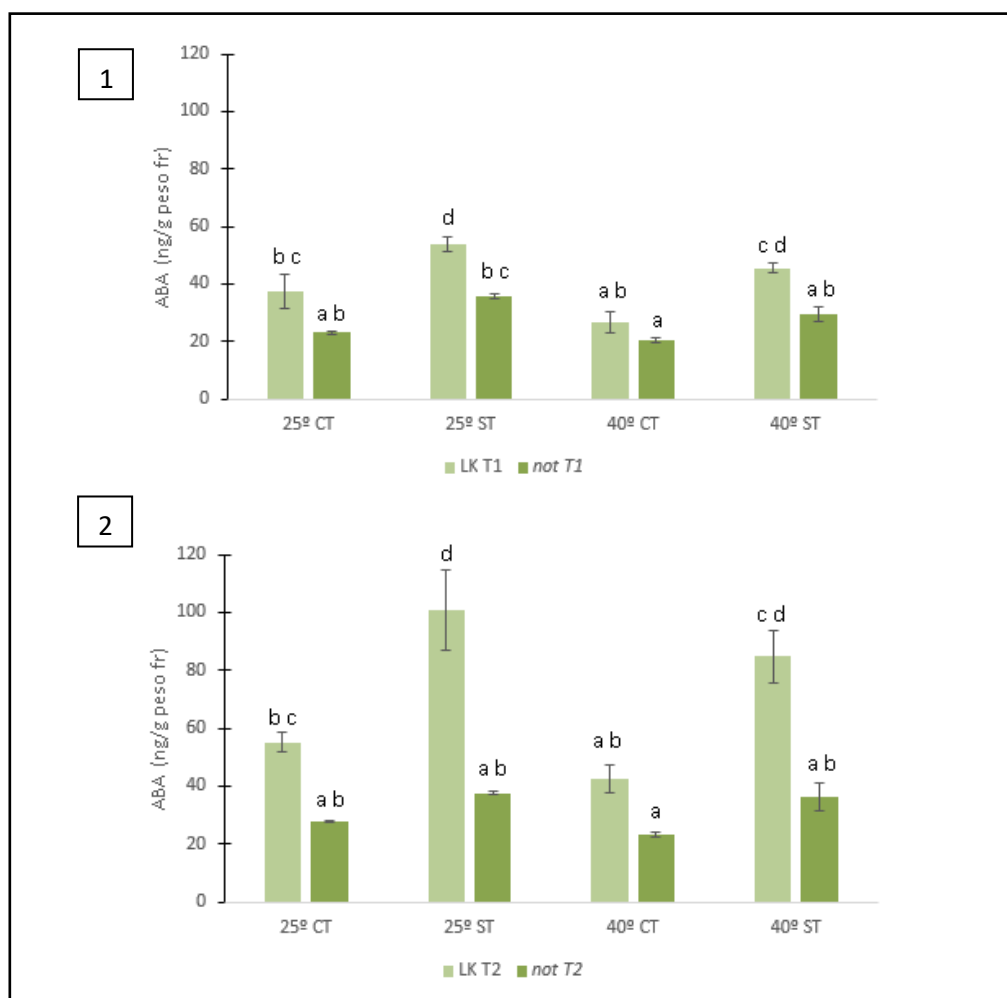


**Figura 6.** Efecto de la concentración de los antioxidantes sobre la inhibición del ABTS a los dos minutos de la reacción en todos los grupos de ensayo (25°C CT, 25°C ST, 40°C CT, 40°C ST) del ecotipo silvestre (LK) y el mutante, tras 2 días de estrés (1) y tras 5 días de estrés (2). Las diferentes letras indican las diferencias significativas según el test de Turkey ( $p < 0,05$ ).

Los resultados de capacidad antioxidante total vienen determinados por el porcentaje de inhibición del ABTS, de forma que una mayor inhibición responde a una mayor concentración de antioxidantes en planta. Dada la complejidad de este ensayo, se muestra la Figura 5 donde se ha representado la evolución cinética en la inhibición del ABTS para cada grupo experimental, pero para simplificar la explicación de los resultados se detallan los resultados a los dos minutos de dicha cinética (Figura 6). Por tanto, en cuanto a la capacidad antioxidante total a los dos minutos de la reacción cinética (figura 6) se observa como tras 2 días de estrés (Figura 6-1) no hay diferencias significativas en ningún grupo de ensayo. Sin embargo, a los 5 días de estrés (Figura 6-2) los niveles de capacidad antioxidante en el mutante *not* son menores con respecto al ecotipo silvestre LK en los grupos sometidos a estrés por calor (40°C CT y 40°C ST).

## 4.6 Contenido Hormonal

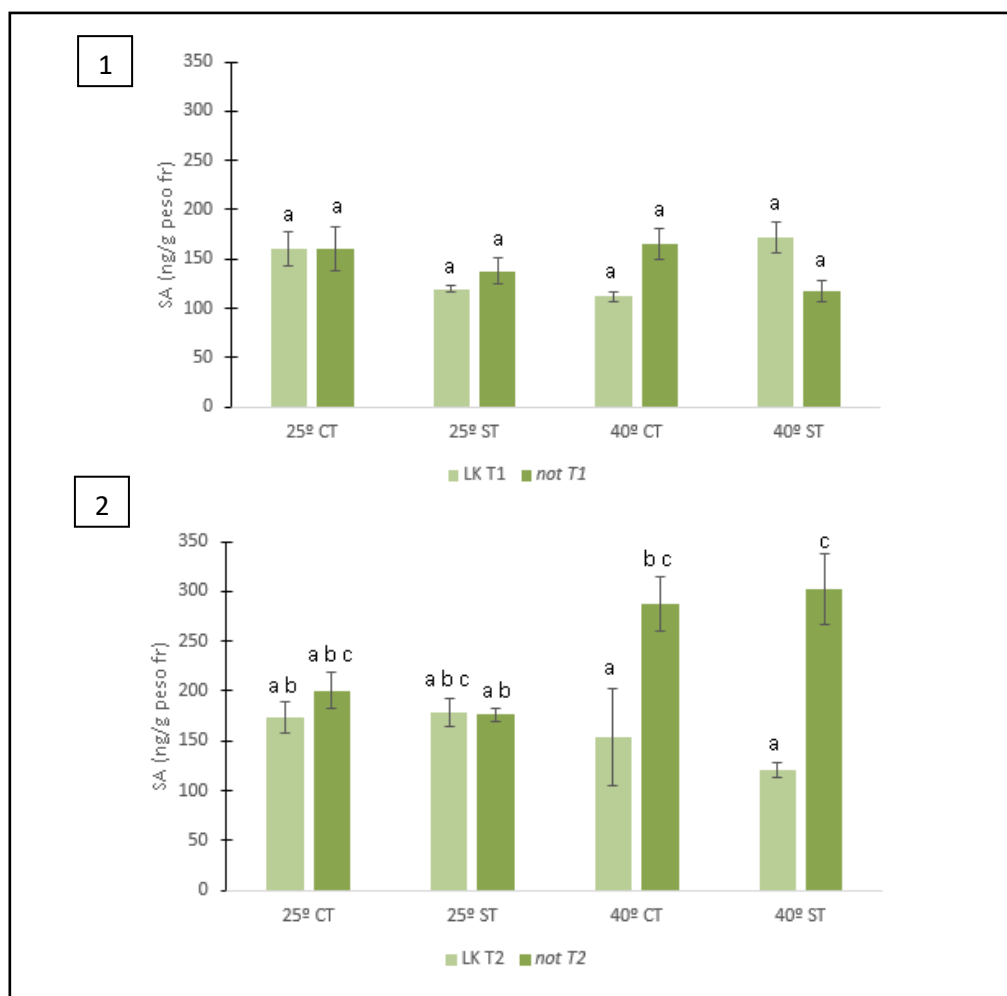
### 4.6.1 Ácido abscísico (ABA)



**Figura 7.** Contenido foliar de ácido abscísico (ABA) de los distintos grupos de ensayo (25°C CT, 25°C ST, 40°C CT, 40°C ST) del ecotipo silvestre (LK) y el mutante (*not*), tras 2 días de estrés (1) y tras 5 días de estrés (2). Las diferentes letras indican las diferencias significativas según el test de Turkey ( $p < 0,05$ ).

Los datos obtenidos, tras 2 días de estrés (Figura 7-1) de los niveles de ácido abscísico (ABA) a nivel foliar muestran que las plantas de *not* tienen niveles de ABA ligeramente inferiores que LK. En el caso del ecotipo silvestre LK el contenido de ABA en ambos grupos de ST (25°C y 40°C) es ligeramente superior a los grupos CT. Tras 5 días de estrés (Figura 7-2), la concentración de ABA endógeno en el mutante *not* permanece en niveles similares a los observados en el primer tiempo de muestreo. Nuevamente, los niveles más altos de esta hormona se observan en las plantas de LK estresadas a 25°C y a 40°C siendo casi el doble de la cantidad observada en T1.

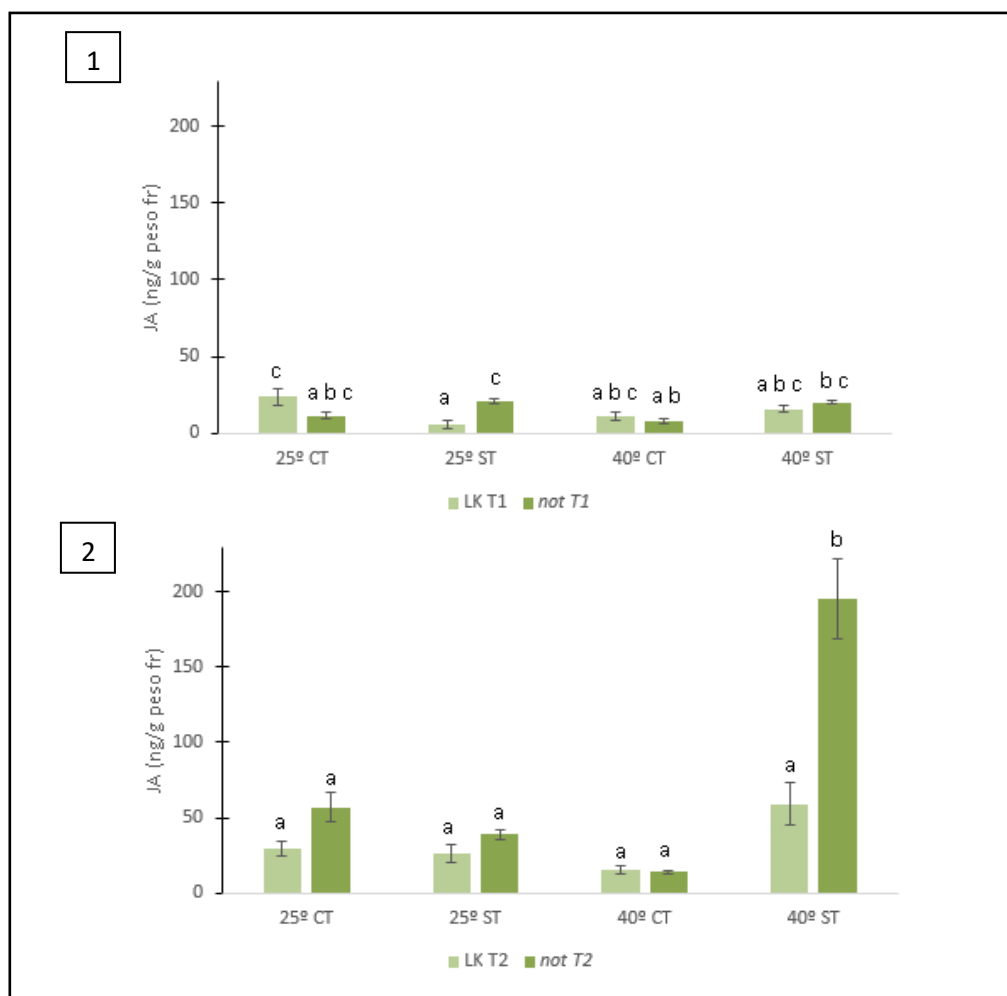
#### 4.6.2 Ácido salicílico (SA)



**Figura 8.** Contenido foliar de ácido salicílico (SA) en los grupos de ensayo (25°C CT, 25°C ST, 40°C CT, 40°C ST) del ecotipo silvestre (LK) y su mutante (*not*), tras 2 días de estrés (1) y tras 5 días de estrés (2). Las diferentes letras indican las diferencias significativas según el test de Turkey ( $p < 0,05$ ).

Los datos de los niveles de ácido salicílico (SA) tras 2 días de estrés (Figura 8-1) muestran valores similares en todos los grupos de ensayo tanto en *lukullus* como de *notabilis*. Sin embargo, tras 5 días de estrés (Figura 8-2) los niveles de SA se ven incrementados en las plantas del mutante *notabilis* en los grupos de ensayo expuestos a 40°C tanto en el grupo CT como en el grupo de estrés combinado.

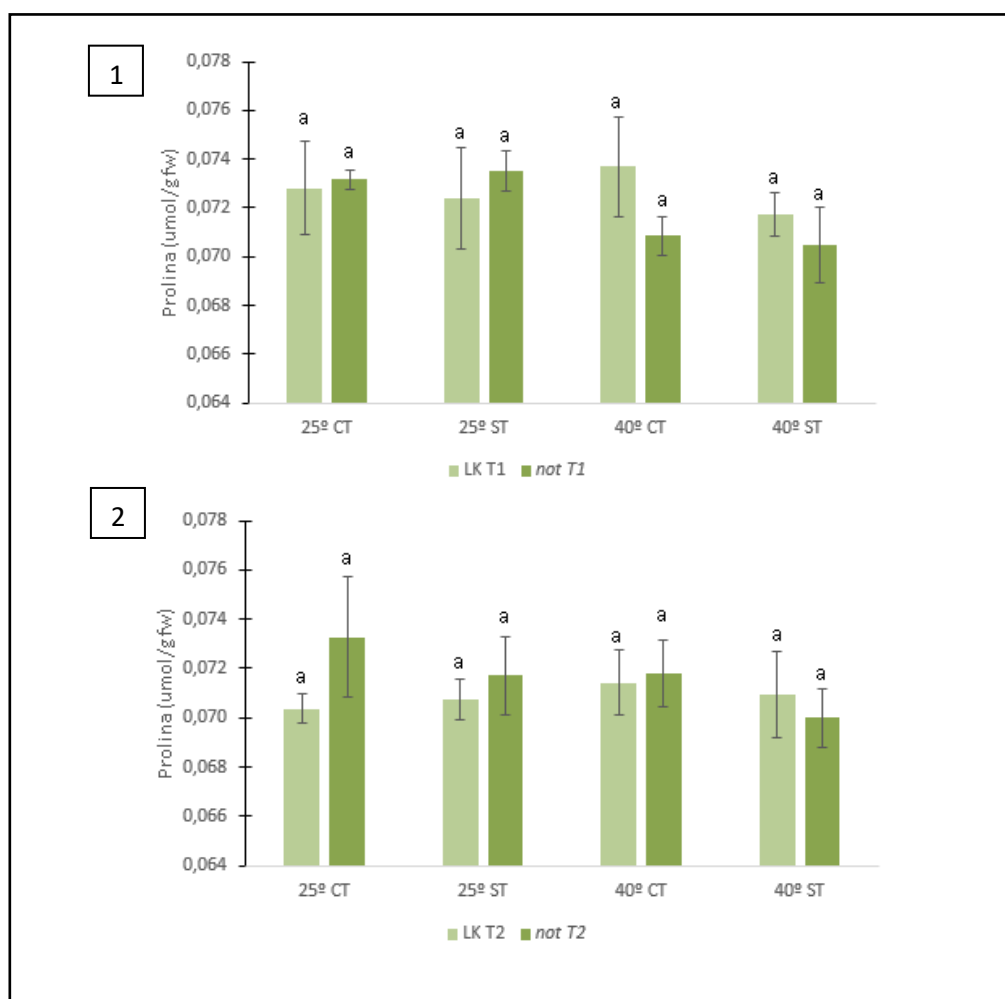
### 4.6.3 Ácido jasmónico (JA)



**Figura 9.** Contenido foliar de ácido jasmónico (JA) en los diferentes grupos de ensayo (25°C CT, 25°C ST, 40°C CT, 40°C ST) del ecotipo silvestre (LK) y su mutante (*not*), tras 2 días de estrés (1) y tras 5 días de estrés (2). Las diferentes letras indican las diferencias significativas según el test de Turkey ( $p < 0,05$ ).

En los resultados obtenidos para los niveles de ácido jasmónico (JA) tras 2 días de estrés (Figura 9-1) no se observan diferencias significativas en ninguno de los grupos de ensayo ni en los dos grupos de plantas (LK y *not*), permaneciendo en niveles inferiores a 50 ng/g peso fr. Dicho comportamiento es similar al observado tras 5 días de estrés (Figura 9-2) salvo que en este caso se produce un incremento marcado de los niveles de JA en las plantas de *notabilis* sometidas a estrés combinado (40°C ST).

## 4.7 Prolina



**Figura 10.** Contenido foliar de prolina en los distintos grupos de ensayo (25°C CT, 25° C ST, 40°C CT, 40°C ST) del ecotipo silvestre (LK) y su mutante (*not*), tras 2 días de estrés ( 1) y tras 5 días de estrés (2). Las diferentes letras indican las diferencias significativas según el test de Turkey ( $p < 0,05$ ).

En cuanto a la concentración de prolina, los resultados obtenidos en los dos tiempos analizados (T1 y T2) no muestran diferencias significativas en ninguno de los cultivares ni en ninguno de los grupos experimentales.

## 5. Discusión

La respuesta fisiológica de la planta a los estreses abióticos intenta minimizar los daños que estos estreses pueden producir en la propia planta. Durante mucho tiempo la mayoría de las investigaciones se han centrado en abordar la respuesta de diferentes especies a un solo estrés (Hichri et al. 2017; Abouelsaad, 2018). Sin embargo, la respuesta a estreses



combinados es ampliamente desconocida aunque es una condición extremadamente común en el entorno de la planta. El incremento de 1°C desde la época preindustrial (Grupo intergubernamental de expertos sobre el cambio climático, IPCC, 2014) en la temperatura mundial ha provocado que los cultivos se vean afectados por unas subidas de temperaturas a las que no están adaptados pudiéndose ver afectada gravemente su producción. Unido a la subida de temperatura, en zonas cercanas al mar o zonas con niveles altos de salinidad en el suelo, se puede producir una bajada de los niveles de agua dulce, originando situaciones de sequía o del aumento de salinidad en el suelo y en el agua utilizable para el riego por fenómenos como la intrusión marina.

El ABA es una fitohormona que participa en la en la señalización de muchos procesos en las plantas. Se ha estudiado que promueve la floración en algunas variedades de plantas como *litchi chinensis* pero en otras como *Arabidopsis* es un represor floral (Gómez-Cadenas, 2015).

La exposición de las plantas a salinidad induce un aumento proporcional de ABA. Los niveles aumentados de ABA inducen la expresión de genes que codifican transportadores de iones, mejorando la absorción selectiva de iones y contribuyendo a la transferencia de  $\text{Na}^+$  del citoplasma a la vacuola o descargándolo de la planta (Gómez-Cadenas, 2015)

Por estos motivos se han elegido el estrés por calor y el estrés por salinidad para el estudio de sus efectos en las plantas de tomate del ecotipo silvestre *lukullus* y su mutante deficiente en ABA, *notabilis*.

Los resultados obtenidos muestran que las plantas de *notabilis* no se ven más afectadas que las plantas de LK por el estrés combinado. En ambos grupos se observa un menor crecimiento y mayor acumulación de cloruros con respecto al grupo CT en condiciones de estrés combinado. Si bien es cierto, la acumulación de cloruros en el mutante *not* es ligeramente superior que en el ecotipo silvestre LK en el estrés salino a 25°.

En cuanto al parámetro de fluorescencia de clorofilas, se puede observar un menor eficiencia en el PSII en el ecotipo silvestre LK y en el mutante *not* en todas las condiciones de estrés, datos que concuerdan con los observados también en tomate en Rivero et al. 2014. Además, los valores de  $\phi\text{PSII}$  fueron ligeramente más altos en el mutante deficiente en ABA, *not*, a 40°C tanto en condiciones CT como ST indicando que la deficiencia de ABA no influye en el correcto funcionamiento del PSII. Esto podría deberse al aumento en los niveles de SA observado en respuesta al calor en las plantas de

*not*, que no en las plantas del ecotipo silvestre LK, ya que se ha descrito que esta hormona es capaz de proteger el fotosistema II y la membrana frente a estreses por calor (Balfagón et al 2019).

Diversos estudios han identificado hormonas como el ABA, JA y SA como elementos clave en la tolerancia de las plantas a condiciones adversas y en los procesos de aclimatación al estrés combinado (Brossa et al. 2011; Singh and Gautam. 2013; Zandalinas et al. 2018). Este estudio pone de manifiesto la implicación del ABA en los estreses combinados acumulándose dicha hormona en el ecotipo silvestre LK.

Diversos estudios han demostrado que el JA es una hormona importante en las respuestas frente a estreses abióticos principalmente por su implicación en la apertura de los estomas (Clarke et al. 2004, Wang et al. 2010, 2014).

Los datos obtenidos en este estudio muestran aumento más pronunciado en el mutante *not* en el estrés combinado que no se observa en el ecotipo silvestre. Estos datos podrían indicar la participación de esta hormona en la respuesta al estrés combinado como se ha descrito previamente en cítricos (Balfagón et al. 2019).

En cuanto a la prolina no se observó ningún aumento de sus niveles en ninguno de los grupos de ensayo, estos datos podrían deberse a que dependiendo del cultivar puede acumularse o no prolina. Por ejemplo, un estudio en patrones de cítricos muestra diferencias entre *Citrange carrizo* y *Citrus macrophylla* en la acumulación de éste aminoácido en respuesta al estrés salino y al estrés por calor (Vives-Peris, 2017).

El estrés oxidativo es un efecto directo que se desencadena frente a estreses abióticos y bióticos por un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden desencadenar daño en la planta. Por ello, las plantas han desarrollado un sistema de reducción de ROS formado por enzimas y compuestos tóxicos para la planta (Halliwell, 2006; Delaplace et al. 2009). Una consecuencia directa de su aumento es la peroxidación lipídica a nivel de membrana que da origen al MDA que es un metabolito que generalmente se ve aumentado debido a daños en la membrana celular producidos por agentes externos, esto se debe a que es el resultado de la peroxidación lipídica de las especies reactivas del oxígeno (ROS), por tanto si no hay nada que elimine estas especies ROS del medio celular, el MDA aumenta debido a que se generan daños en la membrana. En este sentido, los datos obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto que las plantas de LK son capaces de mantener en equilibrio las ROS durante los distintos estreses,

puesto que no se observan diferencias significativas en los niveles de MDA en ningún grupo de ensayo ni en ningún tiempo. Sin embargo, el comportamiento observado en las plantas del mutante *not* es distinto para ambos tiempos. Inicialmente sus niveles de MDA son más altos en 25°C ST y en 40°C tanto ST como CT que en el ecotipo silvestre LK. Estos datos podrían correlacionarse con una modificación del sistema antioxidante en estos mutantes (Ntatsi et al. 2014). Sin embargo, en el caso de los grupos de ensayo sometidos a 40°C también podría relacionarse con el incremento de SA, ya que estudios previos han visto que esta hormona es capaz de generar descensos en MDA en diversas especies (Yuan y Lin, 2008; Marcinska et al. 2013)

En relación a la respuesta antioxidante en este trabajo se evaluó la capacidad antioxidante total que engloba tanto enzimas como metabolitos antioxidantes. Los resultados obtenidos muestran que el ecotipo silvestre LK es capaz de activar su capacidad antioxidante en ambas situaciones de ST pero que además el calor por si solo también induce su activación. Por el contrario, las plantas del mutante *not* muestran niveles más altos que LK en condiciones CT y menores en condiciones de calor y estrés combinado. Estos datos podrían indicar un mayor consumo de productos antioxidantes ante la incapacidad de sintetizar ABA y protegerse (Ntatsi et al. 2014).

## 6. Conclusiones

- La deficiencia en ABA no produce una mayor intoxicación de cloruros a nivel foliar en estrés combinado
- El estrés combinado induce la acumulación de ABA en plantas de *lukullus* pero no aumenta los niveles de SA y JA, aunque la carencia de ABA si induce su acumulación
- El calor induce niveles más altos de SA en las plantas de *notabilis* que protegen el PSII.
- El calor y el estrés combinado reducen la capacidad antioxidante total en el mutante *notabilis*

## 7. Bibliografía

- **Abouelsaad I, Renault S. 2018.** “Enhanced oxidative stress in the jasmonic acid-deficient tomato mutant *def-1* exposed to NaCl stress”. *Journal of Plant Physiology* 226:136-144.
- **Al-Yassin A. 2004.** “Influence of salinity on *citrus*: a review paper.” *J Cent Eur Agr.* 5: 263-272.
- **Balfagón D, Zandalinas S.I, Gómez-Cadenas A. 2019.** “High temperatures change the perspective: Integrating hormonal responses in citrus plants under co-occurring abiotic stress conditions”. *Physiologia Plantarum* 165: 183-197.
- **Brossa R, López-Carbonell M, Jubany-Marí T, Alegre L. 2011.** “Interplay between abscisic acid and jasmonic acid and its role in water-oxidative stress in wild-type, ABA-deficient, JA-deficient, and Ascorbate-deficient Arabidopsis plants”. *J Plant Growth Regul* 30: 322-333
- **Clarke SM, Mur LAJ, Wood JE, Scott IM. 2014.** “Salicylic acid dependent signalling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*”. *Plant J* 38: 432-447
- **Delaplace P., Frettinger P., Ghanem M. E., Blondiaux A., Bauwens J., Cotton S., De Clerck C., Dewalque A., Guy J., Heuze F., Massoz A., Tassignon T., Van Aubel G., Du Jardin P., Fauconnier M. L. 2009.** “Lipoxygenase pathway and antioxidant system in salt stressed tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* Mill.)”. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 13(4): 529-536
- **Esquinas A. J y F. V. Nuez. 2001.** “Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate” En: *El cultivo del tomate* 13-42 pp.
- **Gómez-Cadenas A, Vives V, Zandalinas S.I, Manzi M, Sánchez-Pérez Ana M., Pérez-Clemente Rosa M., Arbona V. 2015.** “Abscisic acid: A versatile

- phytohormone in plant signaling and beyond”. *Current Protein and Peptide Science* 16:413-434
- **Halliwell B. 2006.** “Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life”. *Plant Physiology*, 141: 312–322.
  - **Hichri I, Muhovski Y, Zizková E, I. Dovrev P.I, Gharbi E, Franco-Zorrilla J. M., Lopez-Vidriero I, Solano S, Clippe A, Errachid A, Motyka V, Lutts S. 2017.** “The *Solanum lycopersicum* WRKY3 Transcription Factor SIWEKY3 Is Involved in Salt Stress Tolerance in Tomato”. *Plant Sci.* 8: 1343
  - **IPCC. 2014.** Climate Change 2014.
  - **Lamz Piedra A, Gonzalez Cepero M. C. 2013.** “Salinity as a problem in agriculture: plant breeding an immediate solution” *Cultrop* 34: 4
  - **Mano, J. 2002.** “Early events in environmental stresses in plants: induction mechanisms of oxidative stress”. *Oxidative stress in plants*. pp. 217-246.
  - **Marcińska I, Czyczyło-Mysza I, Skrzypek E., Grzesiak M. T., Janowiak F., Filek M., Dziurka M., Dziurka K., Waligórski P., Juzon K., Cyganek K., Grzesiak S. 2013.** “Alleviation of osmotic stress effects by exogenous application of salicylic or abscisic Acid on wheat seedlings”. *International Journal of Molecular Sciences* 14(7): 13171–13193.
  - **Maxwell K, Johnson G N. 2000.** “Chlorophyll fluorescence- a practical guide” *J. Exp. Bot.* 51: 659-668
  - **Ntatsi G, Savvas D, Huntenburg K, Druège U, Hinch D. K, Zuther E, Shwarz D. 2014.** “A study on ABA involvement in the response of tomato to suboptimal root temperature using reciprocal grafts with *notabilis*, a null mutant in the ABA-biosynthesis gene *LeNCED1*”. *Environmental and Experimental Botany* 97: 11-21
  - **Organización meteorológica mundial (OMM). 2020**

- **Peleg, Zvi, Blumwald E. 2011.** “Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants.” *Current Opinion in Plant Biology* 14(3):290–95.
- **Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999.** “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay” *Free Radical Biology and Medicine* 26(9-10):1231-7.
- **Rivero R.M, Mestre T. C, Mittler R, Rubio F, Garcia-Sanchez F, Martinez V. 2014.** “The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in Tomato plants” *Plant, Cell & Environment* 37: 1059-1073
- **Seo M., Koshiba T. 2002.** “Complex regulation of ABA biosynthesis in plants”. *Trends in Plant Science* 7(1): 41-48.
- **Singh, P. K., Gautam, S. 2013.** “Role of salicylic acid on physiological and biochemical mechanism of salinity stress tolerance in plants”. *Acta Physiologiae Plantarum* 35(8): 2345–2353.
- **Skriver, Karen and Mundy J. 2007.** “Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress”. *The Plant Cell*.
- **Sobrinho Vesperinas E. & Sanz Elorza M. 2010.** “*Solanum*” Flora Ibérica, RJB/CSIC, Madrid
- **Storey R., Walker R.R. 1999.** “Citrus and salinity”. *Sci Hort.* 78: 39-81
- **Suzuki N, Bassil E, Hamilton J. S, Inupakutika M. A, Zandalinas S. I, Tripathy D, Luo Y, Dion E, Fukui G, Kumazaki A, Nakano R, Rivero R. M, Verbeck G. F, Azad R. K, Blumwald E, Mittler R. 2016.** “ABA is required for plant acclimation to a combination of salt and heat stress” *PLoS ONE* 11(1):1-21.

- **Tanji K.K. 2002.** “Salinity in the soil environment”. *Salinity: environment-plants molecules* pp. 21-52.
- **Vives-Peris V, Gómez-Cadenas A, Pérez-Clemente R.M. 2017.** “Citrus plants exude proline and phytohormones under abiotic stress conditions”. *Plant Cell Rep* 36: 1971-1984
- **Wang L-J, Fan L, Loescher W, Duan W, Liu G-J, Cheng J-S, Luo H-B, Li S-H. 2010.** “Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under heat stress and accelerates recovery in grapevine leaves”. *BMC Plant Biol* 10:34
- **Wang Y, Zhang H, Hou P, Su X, Zhao P, Zhao H, Liu S. 2014.** “Foliar-applied salicylic acid alleviates heat and high light stress induced photoinhibition in wheat (*Triticum aestivium*) during the grain filling stage by modulating the psbA gene transcription and antioxidant defense”. *Plant Growth Regul* 73: 289-297
- **Yuan S., Lin H-H. 2008.** “Role of salicylic acid in plant abiotic stress”. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 63(5-6): 313–320.
- **Zandalinas S. I, Balfagón D, Arbona V, Gómez-Cadenas A. 2018.** “Regulation of citrus responses to the combined action of drought and high temperatures depends on the severity of water deprivation”. *Physiologia Plantarum* 162: 427–438.
- **Zeervant J. A. D., R. A. Creelman. 2003.** “Metabolism and physiology of abscisic acid.” *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*.
- **Zhu J.K. 2001.** “Plant salt tolerance”. *Trends Plant Sci.* 6: 66–71.