



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Efecto de un bioestimulante comercial (Balox®) sobre las
respuestas a estrés salino del rábano (*Raphanus sativus*)

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Cuñat Cursá, Cristina

Tutor/a: Vicente Meana, Óscar

Director/a Experimental: RUIZ GONZALEZ, MARIO JAVIER

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

Título: Efecto de un bioestimulante comercial (Balox[®]) sobre las respuestas a estrés salino del rábano (*Raphanus sativus*).

Autor: Dña. Cristina Cuñat Cursa

Tutor: D. Oscar Vicente Meana

Director experimental: D. Mario Javier Ruíz González

Localidad y fecha: Valencia, septiembre de 2022

Resumen:

El rábano (*Raphanus sativus*) es una especie perteneciente a la familia Brassicaceae, cuyo interés agrícola reside en la obtención de su raíz engrosada, carnosa y pivotante, por tratarse de la parte comestible. Debido a su elevado contenido en micronutrientes esenciales como minerales, vitaminas y antioxidantes, presenta un valor dietético excelente por sus beneficios para la salud. Además, dichas propiedades le proporcionan un alto interés comercial, por lo que es de vital importancia la mejora del rendimiento de este cultivo.

El estrés salino afecta de manera sustancial al crecimiento y desarrollo de los cultivos, provocando grandes pérdidas económicas en el sector agrícola, un problema agravado por los efectos del cambio climático. Estudios previos han demostrado que *Raphanus sativus* presenta una baja tolerancia a este tipo de estrés, observándose cambios en su metabolismo y morfología. Por lo tanto, el desarrollo de estrategias para aumentar la tolerancia del rábano al estrés salino es importante para mejorar su cultivo y rendimiento.

En este trabajo se llevará a cabo un estudio de las respuestas de plantas de *Raphanus sativus* a tratamientos de estrés salino, en condiciones controladas de invernadero, y el posible efecto protector de un bioestimulante comercial (Balox[®]), aplicado simultáneamente. Este producto contiene polifenoles y glicina betaína como ingredientes bioactivos; su mecanismo de acción parece estar mediado por la activación de vías metabólicas de la planta que aumentan su tolerancia a sal. Las plantas se crecerán en presencia de cuatro concentraciones distintas de NaCl: 0 (control), 50, 100 y 150 mM; para cada tratamiento salino se aplicará el bioestimulante a la mitad de las plantas, a tres dosis de 3 L/ha, utilizándose cinco réplicas por tratamiento (40 plantas en total). Tras los tratamientos, se evaluarán parámetros de crecimiento de las plantas, para establecer el efecto del bioestimulante sobre las plantas control y estresadas. Asimismo, se cuantificarán una serie de marcadores de estrés abiótico (niveles de pigmentos fotosintéticos, iones, osmolitos, marcadores de estrés oxidativo y compuestos antioxidantes), para determinar los posibles mecanismos de acción del bioestimulante.

Palabras clave: *Raphanus sativus*; cambio climático; estrés abiótico; salinidad; bioestimulantes; biomarcadores de estrés.

Abstract:

Radish (*Raphanus sativus*) is a species belonging to the Brassicaceae family, whose agricultural interest lies in obtaining its thickened, fleshy and pivoting root, as it is the edible part. Due to its high content of essential micronutrients such as minerals, vitamins and antioxidants, it has an excellent dietary value for its health benefits. In addition, these properties give it a high commercial interest, so it is of vital importance to improve the yield of this crop.

Salt stress substantially affects crop growth and development, causing great economic losses in the agricultural sector, a problem aggravated by the effects of climate change. Previous studies have shown that *Raphanus sativus* has a low tolerance to this type of stress, with changes in its metabolism and morphology. Therefore, the development of strategies to increase radish tolerance to salt stress is important to improve its cultivation and yield.

In this work, a study of the responses of *Raphanus sativus* plants to salt stress treatments, under controlled greenhouse conditions, and the possible protective effect of a commercial biostimulant (Balox®), applied simultaneously, will be carried out. This product contains polyphenols and glycine betaine as bioactive ingredients; its mechanism of action seems to be mediated by the activation of plant metabolic pathways that increase its salt tolerance. Plants will be grown in the presence of four different concentrations of NaCl: 0 (control), 50, 100 and 150 mM; for each salt treatment, the biostimulant will be applied to half of the plants, at three doses of 3 L/ha, using five replicates per treatment (40 plants in total). After the treatments, plant growth parameters will be evaluated to establish the effect of the biostimulant on control and stressed plants. A series of abiotic stress markers (levels of photosynthetic pigments, ions, osmolytes, oxidative stress markers and antioxidant compounds) will also be quantified to determine the possible mechanisms of action of the biostimulant.

Key words: *Raphanus sativus*; climate change; abiotic stress; salinity; biostimulants; stress biomarkers.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 ESTRÉS SALINO	1
1.2 LOS BIOESTIMULANTES COMO SOLUCIÓN AL ESTRÉS SALINO	3
1.3 <i>RAPHANUS SATIVUS</i>	5
1.4 TOLERANCIA A LA SALINIDAD DE <i>RAPHANUS SATIVUS</i>	7
1.5 EL EXPERIMENTO.....	8
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS	9
3.1. MATERIAL VEGETAL	9
3.2. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CRECIMIENTO	10
3.3. PERFIL BIOQUÍMICO	10
3.3.1 <i>Análisis de pigmentos fotosintéticos</i>	10
3.3.2 <i>Iones (Na⁺, Ca²⁺, K⁺ y Cl⁻)</i>	11
3.3.3 <i>Análisis de osmolitos indicadores de estrés</i>	11
3.3.3.1 Prolina.....	11
3.3.3.2 Glicina betaína	12
3.3.3.3 Azúcares totales	12
3.3.4 <i>Marcadores de estrés oxidativo (MDA)</i>	13
3.3.5 <i>Análisis de antioxidantes no enzimáticos</i>	13
3.3.5.1 Fenoles totales.....	13
3.3.5.2 Flavonoides.....	14
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4.1 PARÁMETROS DE CRECIMIENTO	14
4.2 PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS.....	18
4.3 IONES	19
4.4 OSMOLITOS, MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS	22
5. CONCLUSIÓN	25
6. BIBLIOGRAFÍA	25

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: ilustración de las condiciones del crecimiento de las plantas en invernadero.....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 2: r. sativus después del crecimiento en invernadero tras 23 días de estrés salino, sin tratamiento bioestimulante.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 3: r. sativus después del crecimiento en invernadero tras 23 días de estrés salino, con tratamiento bioestimulante.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 4: acumulación iónica. (A) Ion potasio (K+), (B) Ion sodio (Na+), (C) Cloruro (Cl-) y (D) Ion calcio (Ca2+), en raíz y hojas.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 5: contenido de prolina. (A) Hojas y (B) raíz.....</i>	<i>22</i>

ÍNDICE TABLAS

<i>Tabla 1: parámetros de crecimiento.....</i>	<i>14</i>
<i>Tabla 2: análisis estadístico Kruskal-Wallis de los parámetros de crecimiento para el efecto del estrés salino y el tratamiento bioestimulante ($p \leq 0,05$).....</i>	<i>16</i>
<i>Tabla 3: pigmentos fotosintéticos. Clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b) y carotenoides (Caro). 18</i>	
<i>Tabla 4: análisis estadístico Kruskal-Wallis de los parámetros fotosintéticos [clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b) y carotenoides (caro)] para el efecto del estrés salino y el tratamiento bioestimulante ($p \leq 0,05$).....</i>	<i>18</i>
<i>Tabla 5: análisis estadístico Kruskal-Wallis de los compuestos iónicos (K+, Ca2+, N+ y Cl-) para el efecto del estrés salino y el tratamiento bioestimulante; en raíz y hojas ($p \leq 0,05$).....</i>	<i>20</i>
<i>Tabla 6: análisis estadístico Kruskal-Wallis de los osmolitos [prolina (pro) azúcares solubles totales (TSS) y glicina betaína (GB)], marcadores de estrés oxidativo [malonaldehído (MDA)] y antioxidantes no enzimáticos [flavonoides totales (TF) y compuestos fenólicos totales (TPC)] para el efecto del estrés salino y el tratamiento bioestimulante; en hojas y raíz ($p \leq 0,05$).....</i>	<i>22</i>
<i>Tabla 7: análisis bioquímico de osmolitos, marcadores de estrés oxidativo y antioxidantes no enzimáticos en hoja (H) y raíz (R).....</i>	<i>23</i>

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Estrés salino

El estrés abiótico ocurre cuando se dan condiciones medioambientales que tienen un efecto negativo en el crecimiento y desarrollo del organismo. Entre estas condiciones climáticas encontramos las relacionadas con la presencia de agua (sequía o inundaciones), la temperatura (tanto por frío como por calor), la salinidad elevada, deficiencia de nutrientes o la toxicidad causada por metales pesados (He et al., 2018). Las plantas están expuestas a alguno o varios de estos estreses en algún momento de su desarrollo. Así, las plantas son capaces de activar diferentes mecanismos de resistencia para hacer frente a estas condiciones medioambientales y aumentar su supervivencia (Hanin et al., 2016; Isayenkov & Maathuis, 2019; Wania et al., 2016). En las especies cultivadas el estrés abiótico es uno de los mayores retos a los que se enfrenta la agricultura, ya que afecta al rendimiento de los cultivos, ocasionando importantes pérdidas económicas (Almeida et al., 2017; Godoy, 2021; Hanin et al., 2016; Panta et al., 2014).

El estrés abiótico más común y con efectos más drásticos en los cultivos es el causado por la salinidad del suelo. Lo más común es que el aumento de salinidad se produzca por concentraciones altas de NaCl, sin embargo, también se pueden presentar otro tipo de sales como Na⁺, Ca²⁺ o Mg²⁺ (Jenks, 2005). La salinidad se puede producir de manera natural, en zonas geográficas o ecosistemas particulares, como las dunas, marjales o saladares, que por su proximidad al mar se encuentran salinizadas; fenómeno que se conoce como salinización primaria (Lamz & González, 2013). En estas áreas sólo crecen plantas tolerantes o adaptadas a la sal. La segunda causa es la salinización provocada por la actividad antrópica debida, principalmente, a la incorrecta irrigación de los cultivos, donde se produce una acumulación de los iones procedentes del agua de riego causando un aumento en la concentración de sales en el suelo, lo que se conoce como salinización secundaria (Lamz & González, 2013).

Según la *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2021), la cantidad de suelos afectados por el estrés salino a nivel mundial asciende a más de 423 millones de hectáreas de la capa superficial del suelo (0-30 cm) y a más 832 millones de hectáreas de subsuelo (30-100 cm). Un suelo se considera salinizado si cuenta con una conductividad eléctrica (ECe) > 2 ds/m y/o una cantidad de porcentaje de sodio intercambiable (ESP) > 15% y/o pH > 8,2, ya que a partir de esos valores el rendimiento de ciertos cultivos se ve disminuido (FAO, 2006). Los datos descritos por la FAO (2021) indican que alrededor del 5% de la capa superficial del suelo y del 9% del subsuelo estudiados están afectados por el estrés salino. Sin embargo, estos datos sólo representan una estimación de la cantidad de suelos salinizados de todo el mundo, por lo que los valores podrían ser superiores. La publicación más reciente de la FAO (2021) sólo cuenta con datos extraídos del 73% del suelo a nivel global. Además, mapear la cantidad de suelos salinizados resulta complicado puesto que el estrés salino es altamente dinámico. Las mediciones se pueden ver sesgadas por factores como el riego y el régimen de lluvias o sequías extremas; por eso se cree que la cantidad de suelos afectados por el estrés salino es aún mayor y está en continuo crecimiento (Iyushkin et al., 2019). Las zonas cultivables son cada vez menores y para hacer frente a una población cada vez mayor es crucial ser capaces de incrementar el rendimiento de cultivos bajo estas condiciones. Diferentes investigaciones reportadas en la literatura nos muestran como la búsqueda y mejora de variedades que puedan tolerar dicho estrés

se ha convertido en un objetivo primordial (Amombo et al., 2022; Mbinda & Mukami 2021; Ondrasek et al., 2022).

El nivel de tolerancia de las plantas a la salinidad es muy variable, por lo que podemos distinguir entre especies halófitas y glicófitas. Las halófitas son aquellas plantas capaces de tolerar ambientes salinos, con concentraciones de sal alrededor de 100 mM. El resto de las plantas sólo son capaces de crecer en ambientes con concentraciones de hasta 40 mM (conductancia equivalente a 4 dS m⁻¹), también denominadas glicófitas (Flowers, 1977; Gul et al., 2022). Además, cada especie posee unos niveles de tolerancia característicos, aunque la mayoría de las plantas cultivadas son sensibles a este estrés y prefieren crecer en ambientes con < 40mM de [NaCl] (Hasegawa et al., 2000; Munns & Tester, 2008; Rasool et al., 2003). Ambos grupos de plantas poseen mecanismos de defensa contra el estrés salino, aunque los de las halófitas están mejor desarrollados y actúan con mayor eficiencia (Assaha et al., 2017; Horie et al., 2012; Zheng et al., 2009).

Los procesos fisiológicos de las plantas están regulados por un gran número de factores genéticos, hormonales, metabólicos y ambientales; a lo largo de todo su desarrollo (Teklić et al., 2020). Dichos eventos son desencadenados por diferentes fitohormonas o elicitores tanto externos como internos, que actúan modificando el metabolismo de la planta (Sadiq et al., 2020). El estrés salino, tiene una implicación directa en todos los procesos internos de la planta y altera la composición química del organismo, modificando su metabolismo primario y secundario. Tras la exposición a estrés salino la respuesta más inmediata ante la exposición excesiva de NaCl es un estrés osmótico que conlleva un proceso de deshidratación de la planta por una menor capacidad de adquisición de nutrientes y agua (Amombo et al., 2022; Horie et al., 2012). El estrés osmótico induce el cierre de los estomas de la planta, impidiendo una correcta transpiración y por tanto una inhibición de la fotosíntesis y del crecimiento (Amombo et al., 2022; Yeo & Flowers, 1980; 1986; Munns & Tester, 2008). Después se produce un desajuste iónico en la planta, debido principalmente a una acumulación excesiva del ion Na⁺ y a una caída en los niveles de K⁺, provocando una toxicidad por Na⁺ (Almeida et al., 2017; Flowers & Colmer 2008; Isayenkov & Maathuis, 2019; Wakeel 2013). En cuanto a las implicaciones negativas de la presencia excesiva de Na⁺ en el citosol de las células de la planta, se produce la muerte de los órganos foliares, así como la inactivación de proteínas y enzimas, lo cual influye en la realización de procesos fisiológicos como la fotosíntesis (Flowers & Colmer, 2008).

Una de las respuestas más generales y ampliamente estudiadas es la elevada producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales se producen como respuesta secundaria al estrés salino (Bhattacharjee; 2019; Gill & Tuteja, 2010; Hasanuzzaman et al., 2020). Dentro de la planta los mayores compartimentos generadores de ROS son los cloroplastos, peroxisomas y las mitocondrias. Debido al estrés salino se reduce la conductividad estomática lo que conlleva a una alcalinización del apoplasto, una acumulación de ácido abscísico (ABA) y una redistribución iónica (Wani et al., 2016); todo esto desencadena una caída en los niveles de CO₂ que limitan el ciclo de Calvin. En consecuencia, la generación de NADPH⁺ se reduce, por lo que el flujo de electrones que entra a la cadena de transporte de electrones aumenta drásticamente. En los fotosistemas I y II, los electrones sobrantes se juntan con el O₂, generando así ROS, lo que se conoce como reacción de Mehler. Por otro lado, la reducción en los niveles de CO₂ también favorece la fotorespiración, la β-oxidación de ácidos grasos y la oxidación enzimática de glicolato; provocando un exceso de producción de H₂O₂ en los peroxisomas. Por último, en la mitocondria, la exposición a condiciones climáticas adversas también contribuye a la producción de ROS en la

cadena de transporte de electrones (Hasanuzzaman et al., 2020). La elevada producción de ROS provoca un aumento en los procesos oxidativos de proteínas y lípidos, lo que altera la permeabilidad de la membrana y causa daños en el ADN y el ARN, lo que afecta al crecimiento y desarrollo de la planta e incluso ponen en riesgo su supervivencia; sin embargo, la planta detecta este aumento en los niveles de ROS y pone en marcha mecanismos de defensa (Amombo et al., 2022; Nadarajah, 2020).

1.2 Los bioestimulantes como solución al estrés salino

A día de hoy, numerosos investigadores estudian posibles soluciones para mejorar la tolerancia al estrés abiótico en plantas. Las estrategias basadas en la ingeniería genética son una robusta opción, pero para poder implementar estos avances se requiere una revisión de la legislación europea vigente, que es muy estricta con el uso de organismos modificados genéticamente (GMOs). Principalmente, estas técnicas modifican la expresión de determinados genes implicados en procesos de regulación y señalización, además, también pueden actuar en el nivel de expresión de genes relacionados con la producción de proteínas, enzimas y metabolitos relacionados con las respuestas de tolerancia (Haque et al., 2021; Hanin et al., 2016).

Otro campo de actuación, sin necesidad de alteración genética, es el tratamiento externo con agentes químicos (“priming”) que estén directamente implicados en las cascadas de defensa y procesos internos ya existentes en el organismo que tienen lugar durante la exposición a condiciones adversas (Nguyen et al., 2018). En relación con este último punto, a lo largo de estos años el uso de fertilizantes ha sido ampliamente utilizado en el sector agrícola, sin embargo, el uso excesivo de pesticidas ha dado lugar a efectos nocivos tanto en seres vivos como en ecosistemas (Kaur & Garg, 2014). Esencialmente, esto se debe a que solo un porcentaje ínfimo de estos productos actúan de manera específica, la mayoría repercute negativamente en el resto de los organismos del entorno y da lugar a una bioacumulación de estos agentes químicos en suelos, agua, aire y seres vivos (Carriger et al., 2006). Además, se ha relacionado el uso de estos agentes químicos con la aparición de diversas enfermedades agudas y crónicas en humanos (Dawson et al., 2010).

El uso de bioestimulantes en los últimos años ha adquirido enorme relevancia, ya que se trata de una alternativa natural y sostenible frente a los métodos químicos tradicionales. El consejo europeo de la industria de bioestimulantes (European Biostimulant Industry Council; EBIC), establece la siguiente definición de los productos bioestimulantes, atendiendo a su funcionalidad, para explicar así la relevancia de estos productos en el mercado agrícola. Un producto bioestimulante es un material que contiene una o más sustancias y/o microorganismos cuya función es estimular ciertos procesos naturales en el organismo o en el suelo (Ricci et al., 2019). Generalmente, se trata de productos con varios componentes puesto que se aprovecha de las sinergias producidas entre diferentes sustancias para maximizar su efecto (Rouphael & Colla, 2018). En cuanto a los beneficios tenemos en primer lugar una mayor eficiencia en el uso de nutrientes, ya que favorece la absorción de ciertos nutrientes que no serían accesibles para las plantas. Además, también aumenta la tolerancia a diferentes estreses abióticos; en algunos casos, solo con la aplicación del producto se logra la supervivencia de la planta. Asimismo, los bioestimulantes que contribuyen al desarrollo radicular también tienen una influencia positiva en la eficiencia del uso del agua (Baltazar et al., 2021). Como resultado de sus ventajas obtenemos cultivos de mejor calidad debido a una mejor adquisición de nutrientes y un uso menor de recursos en hacer frente a condiciones adversas, contribuyendo así a un mayor rendimiento y

calidad del cultivo. Se estima que con el uso de bioestimulantes se produce un aumento del rendimiento aproximado del 5-10 %, lo que influye directamente en la rentabilidad del agricultor (EBIC). Según los datos reportados por MARKET DATA FORECAST, en 2021 el mercado europeo de bioestimulantes oscilaba en 905,7 millones y se estima un crecimiento del 10,71 % en la tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) hasta alcanzar más de 1.500 millones en 2026. A la vista de las encuestas proporcionadas por la EBIC, las empresas europeas relacionadas con este sector dedican un gran número de recursos a la investigación y desarrollo de productos bioestimulantes, un desembolso mayor en comparación con otros campos, colocando la innovación en productos bioestimulantes como algo prioritario.

Los productos bioestimulantes vegetales son muy variados y habría que analizar cada uno de manera individual para determinar sus beneficios concretos. Atendiendo a su composición los bioestimulantes se pueden clasificar en diferentes categorías: (i) sustancias húmicas, que aparecen como resultado de la descomposición de plantas, animales y microorganismos; o de la actividad metabólica de diferentes microorganismos del suelo. (ii) Aminoácidos y péptidos que se obtienen de la hidrólisis enzimática de diferentes subproductos procedentes de la actividad agrícola y animal. (iii) Extractos de algas y productos botánicos, en este grupo podemos destacar el uso de sustancias como laminarina, alginatos o carragenatos, además de diferentes micro y macronutrientes beneficiosos para la planta como esteroides, betaínas u hormonas. (iv) Polisacáridos, siendo el más importante el quitosano por sus implicaciones fisiológicas en el soporte y activación de genes implicados en la defensa. (v) Elementos químicos inorgánicos que promueven el crecimiento en especies específicas. (vi) Hongos y bacterias beneficiosos, debido a su capacidad de interacción con la planta (Du Jardin, 2015).

La literatura de los últimos años nos muestra cómo el uso de bioestimulantes ha dado buenos resultados en diferentes estudios. Más en concreto, si atendemos al uso de bioestimulantes como ayuda para combatir el estrés salino encontramos diversos ejemplos donde se obtienen resultados favorables en diferentes especies y con diferentes ingredientes bioactivos, como producto bioestimulante: en hortalizas, por ejemplo, en espinaca (El-Yazal, 2019), pimiento (Abdelaal et al., 2019; Desoky et al., 2018), tomate (Alfosea-Simón et al., 2020) o fresa (Zahedi et al., 2020); en cereales como arroz (Krishnamurthy, 1991; Roy et al., 1993; 2005), colza (Nasibi et al., 2014; Lei et al., 2015) o trigo (Janda et al., 2018). En líneas generales los diferentes estudios demuestran como la aplicación del bioestimulante es capaz de mitigar los efectos negativos causados por la exposición a estrés salino, aumentando la tolerancia a la salinidad y mejorando la calidad del alimento. Las plantas tratadas aumentaban su rendimiento debido a la activación metabólica relacionada con la síntesis de compuestos osmoprotectores, permitiendo así la eliminación de componentes contaminantes y el ajuste iónico. Debido los numerosos estudios con buenos resultados y a la necesidad de combatir el estrés salino de manera natural y efectiva, numerosas empresas ya han apostado por el uso de estos ingredientes naturales para hacer frente al estrés por salinidad, y los han incluido en sus formulaciones. Este es el caso de productos como Algabon® y Bonamid®, el primero basado en ácido algínico y el segundo formulado mayoritariamente por diferentes aminoácidos (Hosseini et al., 2022). Otro ejemplo es el producto conocido como Retrosal®, que como ingredientes bioactivos contiene óxido de calcio y zinc, el cual aumenta la tolerancia a la salinidad (Bulgari et al., 2019). Otros productos se centran en el uso de algas como ingrediente activo principal como es el caso de Super fifty® y Rygex®, los cuales son capaces de aumentar metabolitos osmoprotectores en plantas estresadas (Di Stasio et al., 2018).

1.3 *Raphanus sativus*

El rábano (*Raphanus sativus*), es una hortaliza que se consume y se cultiva en todo el mundo, se trata de una planta dicotiledónea perteneciente a la familia Brassicaceae (cruciferae). En cuanto al cariotipo del rábano se trata de un genoma RR con 18 cromosomas somáticos ($2n = 2x = 18$) que comprende seis tipos de cromosomas tres tetrasómicos (BB, DD y FF) y tres disómicos (A, C y E). Sus tamaños son relativamente pequeños comprendiendo valores de entre 0,9 y 2,5 μm de longitud (Richharia, 1937) y el tamaño de su genoma se estableció en 526 Mbp (Arumuganathan & Earle, 1991). El término "Radish", deriva de la palabra en latín Radix, que significa raíz, este nombre hace referencia a su raíz pivotante y carnosa, por tratarse de la parte comestible y de importancia comercial. Por otro lado, el género *Raphanus* proviene del griego y hace referencia a la rápida germinación y crecimiento que posee la planta. (Singh, 2021).

En relación con su origen, existen documentos que sitúan el primer registro de consumo de *Raphanus sativus* en el 2.700 a.C en el antiguo Egipto. Por otro lado, en Corea y China se cree que se empezó a consumir sobre el 400 a.C y a partir del 700 d.C en Japón. Sin embargo, no fue hasta finales del siglo XVI que se extendió su consumo por Europa con la variedad *Raphanus sativus* var. *Radícula* (Crisp, 1995; George & Evans, 1981). En cuanto a su proceso de domesticación, primero, se creyó que había evolucionado únicamente de la variedad silvestre *Raphanus raphanistrum*, distribuida por las costas del mediterráneo y mar caspio (Kaneko et al., 2007). Sin embargo, debido a su elevada diversidad en cuanto a morfología y condiciones de crecimiento, años después, se estableció su origen en cuatro variedades diferentes: *R. raphanistrum*; *R. maritimus*; *R. Landra* y *R. rostratus*. A partir del análisis con marcadores moleculares y de repeticiones de secuencia única de cloroplasto (cpSSR) se determinaron tres eventos de domesticación independientes para el rábano cultivado europeo, el rábano negro español y el rábano cultivado asiático (Yamane et al., 2009).

La raíz del rábano se trata de la parte de interés comercial, dado que es la parte que se consume principalmente en esta hortaliza. Su morfología pivotante característica, distingue al rábano de otros tubérculos similares. La raíz primaria se compone de dos secciones diferenciales, por un lado, encontramos el hipocótilo engrosado que conforma la parte comestible y succulenta de la planta y de ella nace la segunda sección radicular la cual se compone de raíces "verdaderas", la cual es capaz de desarrollar raíces laterales (Zaki et al., 2012). Por otro lado, las hojas están organizadas en forma de espiral y aunque es menos común, el consumo de hojas y brotes ha ido en aumento en los últimos años usándose en la dieta como el resto de las verduras de hoja verde. Este crecimiento es debido la alta presencia de los metabolitos secundarios beneficiosos en esta parte de la planta también (Beevi et al., 2010; Goyeneche et al., 2015). La raíz del rábano se puede presentar en diferentes colores y formas según el tipo de variedad, la variedad redonda es más consumida en países occidentales, mientras que en Asia lo es la variedad Daikon, de raíz blanca y alargada. Su interés económico y comercial reside principalmente en su aporte nutritivo en la dieta, además, posee fitoquímicos con numerosos beneficios en la salud (Manivannan et al., 2019).

En cuanto a los componentes de mayor concentración; los carbohidratos, fibra, glucosinolatos, ácidos carboxílicos, flavonoides y minerales son aquellos que se

encuentran en una mayor cantidad (Gamba et al., 2021). Goyeneche et al. (2015) demuestra que el contenido en fibra, proteínas y ciertos macronutrientes del rábano es significativamente superior en hojas y brotes que, en la raíz tuberosa, lo que dota a estas partes de la planta de beneficios nutricionales superiores, en ciertos aspectos. Dentro del grupo de compuestos fenólicos, los flavonoides son los componentes más abundantes, en cuanto a este grupo de compuestos, las antocianinas son aquellas que se encuentran presentes en una mayor concentración, destacando las cianidinas, pelargonidinas y delfinidinas (Gamba et al., 2021; Giusti & Wrolstad, 1996; Hanlon & Barnes, 2011). En relación con los terpenos y derivados, los β - carotenos destacan en comparación con el resto de los químicos (Xiao, 2012). De lípidos y ácidos grasos se encuentran en mayor concentración el ácido linoleico, oleico y palmítico (Selyutina, 2016). Los glucosinolatos son de los componentes más relevantes del rábano, puesto que son característicos de este cultivar en la familia de las crucíferas, además estos se tratan de los precursores de los isotiocianatos los cuales también poseen importantes beneficios en la dieta. (Hanlon & Barnes, 2011; Matera, 2012). Por último, respecto a minerales y vitaminas se han encontrado elevados contenidos en los estudios realizados con rábano siendo el ion calcio, L-ácido ascórbico (Vitamina C) y el α -tocoferol los componentes de mayor concentración en esta área (Gamba et al., 2021). De los componentes citados aquellos más relevantes, en cuanto a beneficios clínicos son los glucosinolatos, isotiocianatos y polifenoles.

El rábano es una crucífera que destaca por sus elevados contenidos en compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes por su alto contenido en polifenoles (Beevi et al., 2010). Las antocianinas, más en concreto la pelargonidina, son de los componentes con mayor potencial antioxidante y que se encuentra presente en grandes cantidades en el rábano rojo (Wang et al., 2010). Dichos metabolitos secundarios actúan como protectores químicos al ser capaces de activar enzimas antioxidantes, participar en el proceso de donación de hidrogeno, en la quelación de metales y en la unión a proteínas. Las propiedades antioxidantes repercuten directamente en una mejora de la salud ya que la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) se ha visto que repercuten directamente en la aparición de enfermedades como la diabetes, disfunciones hepáticas, cáncer, enfisema pulmonar y disfunciones cerebrales (Banihani, 2017; Grassi et al., 2010; Manivannan et al., 2019). Los isotiocianatos y glucosinolatos también tienen importantes implicaciones clínicas debido a sus propiedades anticancerígenas y quimioprotectoras, principalmente. Los efectos hepatoprotectores son de los más destacados en cuanto a los beneficios del consumo de rábano, además este históricamente ha sido ampliamente usado en la medicina tradicional con la finalidad de disminuir dolores hepáticos y digestivos (Ahn et al., 2018; Kim et al., 2017). Tanto los glucosinolatos como los isotiocianatos están estrechamente implicados en diferentes mecanismos del desarrollo del cáncer como la regulación enzimática, apoptosis y proliferación, lo cual convierte al rábano en una hortaliza con importantes beneficios en la quimiopreención. Por esta razón las propiedades anticancerígenas del rábano están siendo estudiadas en detalle en diferentes tipos de cánceres (Beevi et al., 2010; Manivannan et al., 2019; Nakamura et al., 2001; Kim et al., 2017; Wu et al., 2020). El rábano también posee importantes propiedades antidiabéticas debido a la presencia de polifenoles parecidos a la insulina o inhibidores de glucosa, estas propiedades antidiabéticas pueden estar relacionadas con la regulación de hormonas implicadas en el ciclo de la glucosa, con la prevención del estrés oxidativo producido por la diabetes o en su implicación en la homeostasis durante la absorción de glucosa (Banihani, 2017; Kim et al., 2017).

1.4 Tolerancia a la salinidad de *Raphanus sativus*

En la bibliografía se encuentran documentos que clasifican a *R. sativus* como un cultivo sensible a ambientes salinos (Malcolm 1962; Scialabba y Melati, 1990; Shannon & Grieve, 1999). Malcolm (1962) recoge los datos extraídos por la USDA en un estudio realizado en 1954 sobre los suelos salinos (McGeorge, 1954) en él se posiciona al rábano como cultivo de baja tolerancia, lo que significa que no debería crecer en suelos contaminados por la sal y preferiblemente ser regado con agua pura. Scialabba y Melati (1990) estudiaron el efecto del estrés salino en la diferenciación celular de plántulas de *R. sativus*, en concreto en las células del xilema. Obtuvieron que a medida que las concentraciones de NaCl en el medio aumentaban el crecimiento y la diferenciación celular se veía disminuido. Este suceso podía deberse a una falta de coordinación de la diferenciación celular respecto a la expansión celular. El NaCl, tiene funciones reguladoras en la membrana y se encarga de inducir cambios estructurales en esta, es por eso por lo que la exposición a la salinidad tiene una implicación directa en el metabolismo de la planta induciendo cambios morfológicos que afectan a su ratio de germinación. Sin embargo, en contraposición a estos artículos, otros autores califican al rábano de un cultivo con cierta resistencia al estrés salino. Shimose & Hayashi (1983), determinaron en sus estudios con rábano japonés que este poseía una fuerte tolerancia a la salinidad. Otros autores que concuerdan con dichas afirmaciones son Marcelis & Van Hooijdonk (1998), que determinaron que *R. sativus* fue capaz de crecer en condiciones de 4 dS m^{-1} , lo que lo sitúa como un cultivo bastante tolerante a las condiciones ambientales estudiadas. Sonneveld & van den Bos (1995), reportan que un ligero estrés confería al bulbo mejores propiedades organolépticas, ya que poseía un mayor tamaño y esponjosidad, lo cual tenía una implicación directa en la calidad de este.

Dichas discrepancias entre estudios pueden deberse a que existen factores externos e internos, que pueden afectar a su sensibilidad al estrés. Por ejemplo, Waisel & Breckle (1987) demostraron que el estrés salino no afecta de la misma manera a las diferentes secciones de la raíz del rábano, existiendo diferencias entre la raíz pivotante y las raíces laterales. También en este estudio se demostró que el estrés no afectaba de la misma manera a las diferentes etapas de desarrollo de la planta, se determinó que el proceso que sufría menos consecuencias durante los tratamientos salinos era la iniciación del crecimiento de la raíz pivotante. Sugimoto (2009), comparó el efecto de la sal en variedades silvestres y cultivadas. Como resultado obtuvo que las variedades de rábano cultivadas poseían una mayor resistencia en comparación con los genotipos de variedades silvestres, en el proceso de germinación. Otras publicaciones estudian como afectan diversos factores climáticos a la tolerancia del rábano, puesto que el estrés salino se encuentra en la naturaleza combinado con otro tipo de factores ambientales. Por ejemplo, Hoffman y Rawlins (1971) estudiaron como afectaba la humedad relativa al rendimiento de cultivos bajo condiciones de estrés salino. En sus ensayos obtuvieron como resultado que la tolerancia a la salinidad en el rábano aumentaba a medida que lo hacía la humedad relativa. Por otro lado, Sonneveld & van den Bos (1995), estudiaron el crecimiento del rábano con tratamientos salinos en distintas épocas del año. Concluyeron que el rendimiento en invierno era mayor en concentraciones salinas ligeramente más elevadas, en comparación con las plantas crecidas en condiciones más cálidas. Estas reacciones diferenciales, podían explicarse por las diferentes condiciones de luz y humedad, las cuales repercuten directamente en la absorción de agua y nutrientes. Esto significa que el estrés salino de una especie determinada se encuentra altamente influenciado por factores genotípicos y ambientales.

1.5 El experimento

El presente trabajo se centra en evaluar la respuesta de *R. sativus* a distintas concentraciones de sal tras la aplicación de un bioestimulante comercial inductor de la tolerancia a estrés salino denominado Balox ®.

Balox ® actúa a nivel radicular influyendo en el metabolismo de la planta. Balox ® contiene como ingredientes bioactivos polifenoles (1.4 % p/p) y glicina betaína (3.0 % p/p), estos componentes contribuyen a la biosíntesis de ciclitoles específicos, los cuales ayudan a la regulación del potencial osmótico de las células radiculares, contribuyendo a aumentar la tolerancia a la salinidad (INNOVAKGLOBAL, 2022). El uso de polifenoles y glicina betaína, como ingredientes activos en este tipo de productos ha sido reportado en numerosos estudios. En el estudio llevado a cabo por Sofy et al. (2020) se demuestra como la aplicación de Glicina betaína (GB) en las plantas de judía común mejoraron los sistemas antioxidantes de defensa de la planta aumentando así su tolerancia al NaCl. En sus estudios con plantas de lechuga Shams et al. (2016) indicaron como la aplicación de GB exógena compensaba los efectos negativos causados por concentraciones de salinidad moderadas, debido a un aumento de compuestos bioactivos beneficiosos. Además, Hossain et al. (2011) demostraron como los sistemas antioxidantes de defensa frente al estrés oxidativo se veían reforzados cuando la plántula de frijol era pretratada con una combinación de prolina (Pro) y GB. También, Gadallah (1999) observó como la aplicación combinada de GB y de Pro en plantas de judía contrarrestaba los efectos causados por el estrés salino mejorando la captación iónica y los parámetros de crecimiento. En cuanto a polifenoles, Cercarini et al. (2019) aplicaron un extracto basado en estos compuestos procedente de la espelta, en maíz. Sus resultados determinaron que este tratamiento era capaz de modificar ciertos procesos fisiológicos para reducir los efectos nocivos del estrés salino.

2. OBJETIVOS

Disminuir los efectos provocados en las plantas de consumo alimentario por la salinidad resulta un objetivo de máxima prioridad en la actualidad. Los datos reportados por la FAO (FAO, 2021) determinan una creciente salinidad de los suelos; en cuanto a las tierras agrícolas el porcentaje es también elevado provocado principalmente por una mala praxis en el riego de los cultivos, lo que conlleva a una imposibilidad de crecimiento de la mayoría de los cultivos. Estos datos alarmantes en cuanto a la pérdida de tierras de cultivo ponen en riesgo el suministro de alimentos para una población que va en aumento con los años, según las Naciones Unidas (2019) se prevé que para 2050 esta ascienda a 9,7 billones. Además, esta situación se ve agravada por los crecientes efectos del cambio climático, como sequías extremas, altas temperaturas o la subida del nivel del mar (Ondrasek, 2022). Es por eso por lo que la búsqueda de cultivos que sean capaces de crecer en estas condiciones sin ver perjudicadas sus características morfológicas y nutricionales se ha convertido en algo necesario y de gran interés por parte de investigadores y empresas.

Son numerosos los estudios que se centran en buscar y desarrollar cultivos resistentes al estrés abiótico; bien mediante el uso de transgénesis o bien mediante la aplicación externa de productos con ingredientes bioactivos inductores de la tolerancia a estrés (Nguyen et al., 2018). Los productos bioestimulantes se han hecho un hueco en el mercado por ser productos de origen natural y sostenibles, además cuentan con

numerosos estudios realizados con resultados satisfactorios (García et al., 2020; Teklić et al., 2021). Por esta razón este trabajo va enfocado a dilucidar como afecta un bioestimulante comercial al rendimiento y a los procesos fisiológicos de plantas estresadas con diferentes concentraciones de NaCl. Observar cómo afecta el estrés salino a cada una de las especies permite determinar mecanismos de defensa comunes entre ellas, en concreto el estudio del perfil bioquímico revela mucha información acerca de las rutas metabólicas que se activan en las respuestas a estrés salino. Dicha información resulta de gran utilidad para el desarrollo de productos agrícolas que posean la capacidad de inducir repuestas de tolerancia. Además, el conocimiento de las rutas implicadas es el primer paso en la búsqueda de genes clave en la resistencia a estrés. En este caso concreto se pretende estudiar los cambios de *Raphanus sativus* ante la presencia del producto Balox®, un bioestimulante inductor de la tolerancia a estrés salino, para testear la eficacia del producto en este cultivar en concreto. El rábano es la especie elegida puesto que se trata de una especie con un gran interés nutricional debido a su elevado contenido en compuestos beneficiosos para la dieta (Gamba et al., 2021). Además, esta planta posee numerosos beneficios clínicos principalmente relacionados con la protección de sistema digestivo y con sus propiedades anticancerígenas (Manivannan et al., 2019).

Para ello se lleva a cabo un estudio de los parámetros de crecimiento y bioquímicos en plantas con diferentes niveles de estrés por NaCl y con la aplicación de tratamiento, para compararlos con sus respectivos controles. Estos análisis se realizan con los siguientes objetivos: (i) observar cómo afecta el estrés salino al crecimiento de *Raphanus sativus*, (ii) observar cómo afecta el estrés salino a sus rutas metabólicas, (iii) determinar la correlación que existe entre el rendimiento y las rutas metabólicas activadas, (iv) estimar el nivel de tolerancia de *Raphanus sativus* al estrés salino, (v) observar el efecto del tratamiento en los parámetros de crecimiento, (vi) observar el efecto del tratamiento en la bioquímica del organismo y (vii) determinar la eficacia del bioestimulante aplicado en *Raphanus sativus*, en las condiciones estudiadas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Para la realización del estudio se plantó 40 macetas con rabanito redondo rojo (*Raphanus sativus*) de la variedad de ciclo corto en el invernadero, cinco macetas por bandeja (Figura 1a y b). Primero, se dejó crecer la plántula en semillero hasta ser lo suficientemente grande para su trasplante a maceta. Las plantas se regaron dos veces por semana (750 ml/bandeja).

Los primeros 17 días se utilizó solo agua del grifo para el riego y a partir de esa fecha se regó con diferentes concentraciones de NaCl (0, 50, 100 y 150 mM). Además, se realizaron tres aplicaciones del producto bioestimulante Balox® (3 l/ha) junto con el riego, en la mitad de las macetas. La inoculación del producto se llevó a cabo en los días 3, 17 y 30, contando desde el trasplante en maceta. A los 23 días de exposición al estrés salino (Figura 1c) se realizó el corte de las plantas. Como resultado se obtuvo cinco réplicas por cada tratamiento.

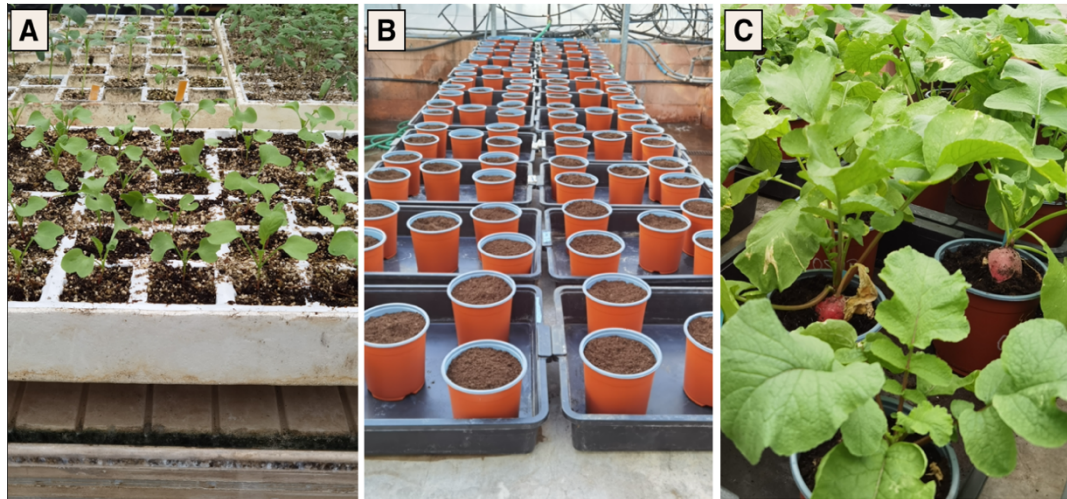


Figura 1: ilustración de las condiciones del crecimiento de las plantas en invernadero. (A) Plántulas de rábano en el semillero antes del trasplante en maceta. (B) Disposición de las macetas en el invernadero (5 réplicas; 5 macetas por bandeja) solo con el sustrato en su interior. (C) *Raphanus sativus* en las fases finales de tratamiento en invernadero.

3.2. Evaluación de los parámetros de crecimiento

Para llevar a cabo el análisis del efecto del bioestimulante en *Raphanus sativus* en condiciones de estrés salino, se evaluó en primer lugar los parámetros biométricos de la parte aérea y de la raíz de las plantas: (i) peso fresco de hojas (ii) peso fresco de raíz (iii) altura de la planta (iv) número de hojas (v) diámetro vertical raíz (vi) diámetros horizontales de la raíz.

Con los datos del diámetro se estableció una estimación de la medida del perímetro del bulbo de la planta asumiendo que tiene una forma elíptica. Con la finalidad de obtener el % de humedad de las plantas, se pesó el peso fresco (FW) de una muestra de hojas y de raíz y se introdujeron en estufa a 65 °C. Pasados tres días se pesó el material seco (DW) obtenido. Aplicando la fórmula indicada en la Ecuación 1, se calculó la cantidad de agua retenida en cada planta. El resto de material vegetal se reservó a -76°C para posteriormente hacer el estudio bioquímico.

$$\% \text{ Contenido en agua} = \frac{FW - DW}{FW} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

3.3. Perfil bioquímico

3.3.1 Análisis de pigmentos fotosintéticos

La cantidad de clorofila a, clorofila b (Chl a, Chl b) y los carotenoides totales (Caro) se determinó utilizando el protocolo descrito por Lichtenthaler & Wellburn (1983):

primero se realiza el extracto de los pigmentos añadiendo 1 ml de acetona 80% a la muestra triturada (0,05 – 0,1 g de peso fresco de hoja) y se deja agitando en oscuridad a una temperatura de 4 °C. Pasadas 24 horas se centrifuga los tubos durante 15 minutos a 12.000 rpm y 4 °C) para separar el sobrenadante con los pigmentos del resto de componentes. Finalmente, se diluye 100 µl de sobrenadante en 900 µl de acetona al 80 % y se mide la densidad óptica en el espectrofotómetro a 470; 646 y 663 nm, usando la acetona como blanco (Abs).

Para obtener la concentración de pigmentos presentes en cada muestra se realizan los cálculos descritos en las ecuaciones indicadas en Lichtenthaler & Wellburn (1983):

$$\text{Clorofila } a \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = 12.21 \text{ Abs}_{663} - 2.81 \text{ Abs}_{646} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$\text{Clorofila } b \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = 20.13 \text{ Abs}_{646} - 5.03 \text{ Abs}_{663} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$\text{Carotenoides} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = (1000 \text{ Abs}_{470} - 3.27[\text{Chl } a] - 104[\text{Chl } b])/229 \quad (\text{Ecuación 4})$$

La cantidad de pigmentos fotosintéticos se expresa en mg g⁻¹ peso seco (DW).

3.3.2 Iones (Na⁺, Ca²⁺, K⁺ y Cl⁻)

La cantidad de iones se determina siguiendo el protocolo propuesto por Weimberg (1987) en cuanto a la medición de Na⁺, Ca²⁺ y K⁺ y se utiliza la metodología descrita por Cotlove (1963) para el Cl⁻. Para la medición de iones se recoge muestras de material seco de hoja y raíz (0,1 - 0,05 g de peso seco). Una vez triturado el material, se le añade 1 ml de agua MiliQ a cada tubo y se agita vigorosamente. Seguidamente se incuban las muestras en el termobloque a 95 °C durante una hora y se dejan reposar 24h en agitación. A continuación, se añade 1 ml más de agua MiliQ y se centrifuga durante 10 min a 12.000 rpm a temperatura ambiente para obtener el sobrenadante limpio. Se realiza una dilución ×15 utilizando 500 µl de sobrenadante con 7 ml de agua MiliQ. Con el extracto diluido se lleva a cabo la cuantificación de los cuatro iones. Por un lado, para la cuantificación de Na⁺, Ca²⁺, K⁺ se utiliza un fotómetro de llama, mientras que la medida de Cl⁻ se realiza usando un clorurímetro. Para determinar la concentración de Na⁺, Ca²⁺ y K⁺ se preparan muestras con concentraciones conocidas de cada uno de los iones (ppm; mg/L) para establecer la concentración en cada una de las muestras. En el caso del Cl⁻, el clorurímetro mide directamente la concentración de Cl⁻ (mg/l) presente en la muestra. Los valores de cada uno de ellos se expresan de µmol eq g⁻¹ DW.

3.3.3 Análisis de osmolitos indicadores de estrés

3.3.3.1 Prolina

La concentración de prolina (Pro) se determinó según se detalla en la determinación colorimétrica expuesta por Bates et al. (1972). En este caso se mide la concentración de prolina en muestras recogidas en hoja y raíz. Se prepara el extracto

añadiendo 1 ml de ácido sulfosalicílico al 3% a las muestras (0,05 – 0,1 g de peso fresco) y se centrifuga durante 15 minutos a máxima velocidad, para llevar a cabo la precipitación proteica. En un tubo Falcon (15 ml) se añade en volúmenes 1:1:1, 500 µl de muestra, ácido acético glacial y ninhidrina y se deja reposar en el baño de María a 98 °C) durante una hora, durante la que se va a formar el complejo ninhidrina-prolina. Transcurrida la hora se transfiere las muestras al hielo, durante diez minutos, para terminar la reacción. La prolina presente en las muestras recogidas se separa añadiendo 3 ml de tolueno a cada una de ellas, extrayendo el cromóforo ninhidrina-prolina. Transcurridos cinco minutos se observa la separación de las fases orgánicas, siendo la fase superior la que contiene el tolueno con toda la prolina. Finalmente se mide la absorbancia a 520 nm, usando el tolueno como blanco. Para la determinación de la prolina presente en cada muestra se construye una curva patrón con volúmenes L-prolina (2 mM) conocidos, diluidos en ácido sulfosalicílico 3% posteriormente los tubos de la curva patrón siguen el mismo protocolo que las muestras. La cantidad estimada en cada muestra se expresa en $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW.

3.3.3.2 Glicina betaína

Para cuantificar la cantidad de glicina betaína (GB) en las muestras se reprodujo el protocolo descrito por Grieve & Grattan (1983), aplicando las optimizaciones descritas en González et al. (2021). Se realizó un extracto añadiendo 1,5 ml de agua MiliQ a cada muestra (0,1 - 0,05 g de peso fresco) de hoja y de raíz. Los tubos se llevaron a agitación durante 24 h (4 °C en oscuridad). Luego, se centrifuga los tubos de muestras 20 minutos a 13.000 rpm, siendo el sobrenadante el extracto. El ensayo se realiza añadiendo 400 µl del extracto centrifugado a un tubo de vidrio con 400 µl de ácido sulfúrico (H_2SO_4 2N). La mezcla se deja reaccionar durante una hora en hielo. Se cogen 125 µl de la mezcla anterior y se añaden 50 µl de yoduro de potasio (KI-I_2); se agita suavemente para que este último compuesto provoque la precipitación de la glicina en forma de cristales. Los tubos se almacenaron a 4 °C durante 16h en condiciones de oscuridad para que no se degrade el color de las muestras. Transcurrido dicho tiempo se centrifuga a velocidad máxima durante 45 min a 0 °C, con la finalidad de rescatar los cristales de glicina betaína fijos en la pared y fondo de los tubos. Una vez desechado el sobrenadante, el precipitado se diluye en 1,4 ml de 1,2 dicloroetano frío. Pasadas 2,5 horas se mide la densidad óptica en el espectrofotómetro a 365 nm. Para determinar la concentración de GB presente en cada muestra se realiza una curva patrón con concentraciones de betaína (1 mg/ml) conocidas y se mide su absorbancia correspondiente. La cantidad de GB de cada tubo se expresa en $\mu\text{mol eq. de betaína g}^{-1}$ DW.

3.3.3.3 Azúcares totales

Para medir la concentración de azúcares solubles totales (TSS), se sigue el protocolo establecido por Dubois et al. (1956). Primero se lleva a cabo el extracto de la muestra triturada recogida de hoja y raíz (0,05 – 0,1 g de peso fresco) añadiendo 2 ml de metanol al 80 %. Los tubos se dejan en agitación durante 24 horas a 4 °C en oscuridad; transcurrido dicho tiempo se centrifuga durante 15 min (13.000 rpm; 4°C) para extraer el sobrenadante. Se recoge 25 µl del extracto y se mezcla con 475 µl de agua MiliQ. Posteriormente se añaden 500 µl de fenol al 5 %, 2,5 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y se deja reaccionar la muestra durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se mide la absorbancia a 490 nm, usando como blanco una dilución de 25 µl de metanol 80 % en 475 µl de agua MiliQ. Para usar como referencia, se elaboró una

curva patrón utilizando glucosa (Gluc) 1 mM a diferentes concentraciones. La concentración de TSS presente en cada muestra se expresa como mg eq. de gluc g⁻¹ DW.

3.3.4 Marcadores de estrés oxidativo (MDA)

Para la medida de malonaldehído (MDA) se parte del extracto de metanol 80 % (2 ml de metanol con 0,1 - 0,05 g de material fresco) elaborado anteriormente para la medida de otros compuestos como TSS. Para la medida de MDA se siguió el protocolo propuesto por Hodges et al. (1999). Para llevar a cabo este análisis, se diluyen 200 µl de extracto en 400 µl de metanol 80 % por duplicado. A los primeros tubos se les adiciona 600 µl del reactivo TCA 20 % con TBA al 0,5 %, y a la otra mitad de tubos se les adiciona 600 µl de TCA 20 % solo. Los tubos se incuban en el termobloque a 95°C durante 15 minutos, transcurrido el tiempo se detiene la reacción depositando los tubos en hielo durante 5 minutos. Las muestras se centrifugan durante 10 minutos (12,000 rpm; 4 °C) y se mide la absorbancia del sobrenadante en el espectrofotómetro a 440; 532 y 600 nm en cubetas de plástico. La concentración de MDA contenida en la muestra se calcula siguiendo las fórmulas propuestas por Hodges et al. (1999) que se indican en las siguientes ecuaciones.

$$A = Abs\ 532 - Abs\ 600 - (Abs\ 532_{solo\ TCA} - Abs\ 600_{solo\ TCA}) \quad (Ecuación\ 5)$$

$$B = (Abs\ 400 - Abs\ 600) \cdot 0.0571 \quad (Ecuación\ 6)$$

$$MDA \left(\frac{nmol}{ml} \right) = \left(\frac{A-B}{157000} \right) \cdot 10^6 \quad (Ecuación\ 7)$$

El contenido presente en cada tubo de MDA se expresa como nmol g⁻¹ DW

3.3.5 Análisis de antioxidantes no enzimáticos

3.3.5.1 Fenoles totales

El análisis de fenoles totales (TPC) se lleva a cabo a partir del extracto realizado con metanol 80 % como en ensayos previos (2 ml de metanol con 0,1-0,05 g de material fresco). El análisis se llevó a cabo siguiendo las especificaciones incluidas en el ensayo optimizado propuesto por Blainski et al. (2013). Se cogen 100 µl del sobrenadante obtenido durante la realización del extracto y se diluyen en 1,4 ml de agua MiliQ. A dicha dilución se le añade 100 µl del reactivo Folin-Ciocalteu y se deja reaccionar durante cinco minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de reacción se añade 350 µl de carbonato de sodio (Na₂CO₃) 15% a todos los tubos, la mezcla se deja incubar durante 90 minutos en oscuridad. La absorbancia se lee a 765 nm en cubetas de plástico. Para determinar la concentración de polifenoles en cada muestra se realiza una curva patrón con ácido gálico (GA) a 0,2 mg/ml. La cantidad de TPC se expresa en mg eq. de GA g⁻¹ DW.

3.3.5.2 Flavonoides

La determinación de flavonoides totales (TF) se lleva a cabo mediante el sobrenadante obtenido tras realizar el extracto con metanol 80 % (2 ml de metanol con 0,1 - 0,05 g de material fresco) siguiendo la metodología propuesta por Zhishen et al. (1999). Para ello se utiliza 300 μ l de muestra extraída a la que se le añaden 200 μ l de agua MiliQ. A dicha mezcla se le añaden 30 μ l de nitrito de sodio (NaNO_2) 5% para que se inicie la nitración del grupo catecol y se deja reaccionar durante cinco minutos. Seguidamente se añade 30 μ l de cloruro de aluminio (AlCl_3) a todos los tubos y se deja incubar durante seis minutos. Una vez finalizado el tiempo, se añaden 200 μ l de hidróxido de sodio (NaOH) 1M y se lee la absorbancia a 510 nm en cubetas de plástico. Para determinar la cantidad de flavonoides presentes se usa como patrón interno diferentes concentraciones de catequina (C) a 100 mg/ml. La cantidad de flavonoides totales se expresa como mg eq. de C g^{-1} DW.

3.4 Análisis estadístico

El programa utilizado para realizar el análisis estadístico fue IBM® SPSS® Statistics, versión 25. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el uso del test de Kruskal-Wallis o test H, prueba homóloga al análisis ANOVA, pero no paramétrica. Se usó un nivel de confianza superior del 95% ($p \leq 0,05$). En este caso se hizo uso de esta prueba debido a que los datos estudiados no cumplían las condiciones del análisis ANOVA (Acosta-Quezada, 2022). Posteriormente se realizó la prueba de Tukey para identificar los subgrupos ($p \leq 0,05$). De esta manera se va a determinar si los datos obtenidos en las diferentes condiciones estudiadas son o no significativos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Parámetros de crecimiento

Las plantas se sometieron a 23 días de estrés salino (50, 100 y 150 mM NaCl) y estuvieron 37 días bajo el tratamiento con el producto bioestimulante Balox ®. Tras llevar a cabo el análisis de ciertos parámetros biométricos (Tabla 1) se puede observar cómo se produce una disminución del crecimiento al aumentar la concentración de sal durante el riego, pero en ninguno de los casos se registra la muerte de la planta. Visualmente podemos corroborar estos resultados en la Figura 2, para las plantas sin tratamiento bioestimulante y en la Figura 3 para las plantas con tratamiento bioestimulante.

Tabla 1: parámetros de crecimiento. Número de hojas (NL), altura (H), perímetro estimado de la raíz (P), peso fresco de la totalidad de la planta (TFW), peso fresco hojas (LFW), peso fresco raíz (RFW), contenido en agua de las hojas (LWC) y contenido en agua de la raíz (RWC). Datos obtenidos tras 23 días de exposición a estrés salino (concentración de NaCl indicada) y la aplicación del tratamiento con el producto bioestimulante; en R. sativus. Los valores representan la media \pm SE. (n= 5). La significancia estadística viene determinada por las letras (minúsculas para las plantas sin tratamiento

bioestimulante y mayúsculas para las plantas tratadas) donde la misma letra indica que pertenecen al mismo grupo según el Test de Tukey ($p \leq 0,05$).

	Control				Tratamiento bioestimulante			
	Control	50 mM NaCl	100 mM NaCl	150 mM NaCl	Control	50 mM NaCl	100 mM NaCl	150 mM NaCl
NL	7,8 ± 0,8 ^{ab}	8,2 ± 0,4 ^{ab}	8,4 ± 0,5 ^b	7,0 ± 1,0 ^a	10,4 ± 3,4 ^B	8,6 ± 0,9 ^{AB}	8,4 ± 0,5 ^{AB}	6,8 ± 0,4 ^A
H (cm)	26,9 ± 3,3	25,3 ± 1,6	23,3 ± 1,4	25 ± 2,34	29 ± 1,0 ^B	28,9 ± 1,1 ^B	27,6 ± 2,3 ^{AB}	25,3 ± 1,0 ^A
P (mm)	141,8 ± 5,1 ^b	122,7 ± 4,6 ^b	97,8 ± 3,3 ^a	96,3 ± 6,7 ^a	138,0 ± 8,0	132,6 ± 4,1	118,6 ± 22,5	94,4 ± 3,8
TFW (g)	89,7 ± 3,0 ^c	67,4 ± 4,5 ^b	47,4 ± 3,4 ^a	37,8 ± 3,0 ^a	100,7 ± 8,2 ^C	77,4 ± 3,7 ^B	53,7 ± 3,2 ^A	41,2 ± 1,8 ^A
LFW (g)	31,0 ± 2,7 ^b	29,6 ± 1,3 ^b	26,6 ± 1,2 ^{ab}	22,3 ± 1,5 ^a	37,2 ± 1,4 ^C	30,1 ± 1,5 ^B	28,7 ± 1,3 ^B	21,5 ± 1,1 ^A
RFW (g)	58,7 ± 2,2 ^c	37,8 ± 4,3 ^b	20,8 ± 2,8 ^a	15,5 ± 2,8 ^a	63,5 ± 8,4 ^B	47,3 ± 2,4 ^B	25,0 ± 3,4 ^A	19,7 ± 1,3 ^A
LWC (%)	92,5 ± 0,3	91,0 ± 0,7	91,6 ± 1,0	90,1 ± 0,3	91,3 ± 0,8	91,2 ± 0,2	91,5 ± 0,4	89,9 ± 0,4
RWC (%)	96,6 ± 0,2 ^b	92,7 ± 0,7 ^a	91,4 ± 0,7 ^a	91,5 ± 0,6 ^a	96,0 ± 0,6 ^B	94,8 ± 0,4 ^B	92,1 ± 0,6 ^A	91,5 ± 0,6 ^A

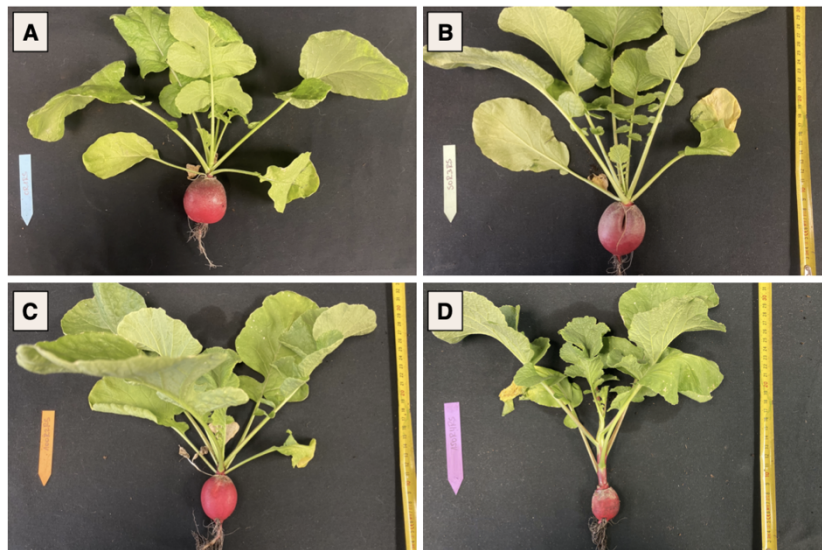


Figura 2: *R. sativus* después del crecimiento en invernadero tras 23 días de estrés salino, sin tratamiento bioestimulante. Cada fotografía corresponde a una planta elegida aleatoriamente de cada una de las condiciones estudiadas. (A) Planta control (0 mM NaCl). (B) Planta crecida bajo condiciones de estrés con

50 mM de NaCl. (C) Planta crecida bajo condiciones de estrés de 100 mM de NaCl. (D) Planta crecida bajo condiciones de estrés de 150 mM de NaCl.



Figura 3: *R. sativus* después del crecimiento en invernadero tras 23 días de estrés salino, con tratamiento bioestimulante. Cada fotografía corresponde a una planta elegida aleatoriamente de cada una de las condiciones estudiadas. (A) Planta control (0 mM NaCl). (B) Planta crecida bajo condiciones de estrés con 50 mM de NaCl. (C) Planta crecida bajo condiciones de estrés de 100 mM de NaCl. (D) Planta crecida bajo condiciones de estrés de 150 mM de NaCl.

Si atendemos al peso fresco de la totalidad de la planta (TFW), a concentraciones bajas (50 mM) ya se observan cambios significativos en comparación con las plantas control, pero al alcanzar concentraciones más altas (100; 150 mM) la disminución de su peso es mucho más pronunciada (Tabla 1). Si analizamos el peso fresco de las hojas por separado (LFW) solo se alcanza una reducción significativa cuando alcanzamos la concentración más alta de estrés, en plantas sin tratar. Sin embargo, en las plantas con producto bioestimulante, si se ven diferencias en plantas sometidas a concentraciones de NaCl moderadas (Tabla 1). En el peso fresco de la raíz (RFW) se ven ligeros cambios en un estrés de NaCl bajo (50 mM) pero a mayores concentraciones la diferencia es más relevante (Tabla 1). Respecto al perímetro de la raíz (P) este no disminuye significativamente en plantas con aplicación de producto, sin embargo, en plantas sin tratar se produce una reducción significativa de este en concentraciones de 100 y 150 mM de NaCl (Tabla 1). En cuanto al efecto del bioestimulante en el peso y perímetro, no se observan diferencias significativas si comparamos las plantas control con las tratadas (Tabla 2).

Tabla 2: análisis estadístico Kruskal-Wallis de los parámetros de crecimiento para el efecto del estrés salino y el tratamiento bioestimulante ($p \leq 0,05$). Se expone el número de muestras comparadas (N), el valor del estadístico de contraste o X^2 (H), los grados de libertad (d.f) y el p-value. Los valores destacados determinan un p-value significativo.

	N	Estrés salino			Tratamiento bioestimulante		
		H	d.f	p-value	H	d.f	p-value
Altura	40	7,067	3	0,07	10,443	1	0,001
Nº de hojas	40	17,139	3	0,001	0,799	1	0,371
Perímetro	40	24,655	3	<0,001	0,073	1	0,787
Peso total	40	33,294	3	<0,001	0,948	1	0,33
Peso hojas	40	24,502	3	<0,001	1,2	1	0,273
Peso raíz	40	31,619	3	<0,001	0,659	1	0,417
%WC hojas	40	13,99	3	0,003	0,073	1	0,787
%WC raíz	40	27,034	3	<0,001	0,495	1	0,482

En relación con la altura de las plantas (H), en las plantas no tratadas se observa una disminución leve de la altura, pero se produce un aumento en 150 mM, aunque no se trata de datos estadísticamente significativos; en las plantas bioestimuladas, por otro lado, las crecidas a la concentración de NaCl máxima estudiada sí que presentan una reducción significativa en su altura (Tabla 1). En comparación con las plantas control aquellas a las que se le había aplicado el producto bioestimulante crecieron, en longitud, en mayor medida que las no tratadas, siendo todas mayores en comparación con sus respectivos controles (Tabla 2). Respecto al número de hojas sí que se encuentran diferencias significativas en cuanto a la aplicación del tratamiento salino en concentraciones de 150 mM (Tabla 1), pero el tratamiento con producto no tiene un efecto relevante en ellas, si comparamos con las plantas control (Tabla 2). Si atendemos al contenido en agua o grado de humedad en hojas (LWC) se mantiene un estado de equilibrio en todas las condiciones estudiadas, sin embargo, en raíz (RWC) a concentraciones de 100 mM si se percibe la deshidratación en plantas tratadas con bioestimulante y a concentraciones más bajas (50 mM) en las no tratadas (Tabla 1). En estos dos últimos parámetros el efecto del bioestimulante no es significativo (Tabla 2).

A la vista de los resultados obtenidos tras someter a *R. sativus* a condiciones de estrés salino en condiciones controladas de invernadero, se puede determinar el grado de tolerancia de esta planta. Las plantas sobrevivieron por más de 20 días a concentraciones salinas de 150 mM, si bien es cierto que toleraron ciertas concentraciones elevadas de salinidad, muchos de sus parámetros de crecimiento se vieron afectados de manera negativa. La inhibición del crecimiento es una respuesta no específica de las plantas cuando están sometidas a estrés salino, el grado de tolerancia depende de la especie que se estudie, además de diversos factores genotípicos y ambientales. Suele darse un punto máximo de tolerancia en el cual a partir de ahí progresivamente disminuye su rendimiento (Almeida et al., 2017; Hanin et al., 2016). El estrés salino provoca un déficit hídrico en los cultivos debido al desajuste osmótico, que ocurre de manera drástica como respuesta inmediata al estrés. Este estrés osmótico provoca una desestructuración de la membrana, toxicidad iónica y problemas en la división celular (Tuteja, 2007). Además, la acumulación de iones va a dificultar la adquisición de ciertos iones y nutrientes esenciales. También la función estomática se va a ver alterada lo cual va a afectar a la capacidad de intercambio gaseoso y transpiración, provocando una bajada del ratio de fotosíntesis de la planta (Gul et al., 2022). Todos estos efectos provocados por el estrés van a resultar en conjunto en una inhibición de la germinación y crecimiento. A la vista de los resultados podemos confirmar que en *R. sativus* se produce una disminución del rendimiento de la planta, demostrada por el estudio de sus parámetros de crecimiento. Sin embargo, en cuanto a

la aplicación del producto no se observan diferencias destacables en casi ninguna característica biométrica. Otro resultado a tener en cuenta es que el crecimiento de la raíz se ve resentido a concentraciones de NaCl menores en comparación con la parte aérea que es capaz de mantener su peso estable hasta concentraciones más elevadas, mientras que la raíz disminuye drásticamente su peso en concentraciones mínimas, de la misma manera ocurre con el contenido en agua que decrece con más intensidad en la raíz que en hoja.

4.2 Pigmentos fotosintéticos

En *R. sativus* se observa una tendencia a decrecer la concentración de los tres pigmentos a 50 mM, pero se eleva al pasar de 100 mM alcanzando los niveles de las plantas control; sin embargo, los resultados de este análisis no son significativos a nivel estadístico (Tabla 3). En cuanto a la aplicación de bioestimulante solo se encuentran diferencias al analizar la Chl b (Tabla 4).

Tabla 3: pigmentos fotosintéticos. Clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b) y carotenoides (Caro). Datos obtenidos tras 23 días de exposición a estrés salino (concentración de NaCl indicada) y la aplicación del tratamiento con el producto bioestimulante; en Raphanus sativus. Los valores representan la media \pm SE. (n= 5). La significancia estadística viene determinada por las letras (minúsculas para las plantas sin tratamiento bioestimulante y mayúsculas para las plantas tratadas) donde la misma letra indica que pertenecen al mismo grupo según el Test de Tukey ($p \leq 0,05$).

	Control				Tratamiento bioestimulante			
	Control	50 mM NaCl	100 mM NaCl	150 mM NaCl	Control	50 mM NaCl	100 mM NaCl	150 mM NaCl
Chl a (mg g ⁻¹ DW)	11,1 \pm 1,3	8,3 \pm 0,8	12,3 \pm 2,9	9,0 \pm 0,9	8,8 \pm 1,1	7,9 \pm 0,4	9,8 \pm 1,2	8,4 \pm 0,7
Chl b (mg g ⁻¹ DW)	2,6 \pm 0,3	2,3 \pm 0,2	3,2 \pm 0,8	2,6 \pm 0,4	1,6 \pm 0,2	1,4 \pm 0,2	2,2 \pm 0,3	2,2 \pm 0,4
Caro (mg g ⁻¹ DW)	2,0 \pm 0,2	1,5 \pm 0,2	1,9 \pm 0,5	1,2 \pm 0,2	1,2 \pm 0,1 ^{AB}	1,1 \pm 0,1 ^A	1,8 \pm 0,3 ^B	1,5 \pm 0,2 ^{AB}

Tabla 4: análisis estadístico Kruskal-Wallis de los parámetros fotosintéticos [clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b) y carotenoides (caro)] para el efecto del estrés salino y el tratamiento bioestimulante ($p \leq 0,05$). Se expone el número de muestras comparadas (N), el valor del estadístico de contraste o X^2 (H), los grados de libertad (d.f) y el p-value. Los valores destacados determinan un p-value significativo.

	N	Tratamiento salino			Bioestimulante		
		H	d.f	p-value	H	d.f	p-value
Chl a	40	4,979	3	0,174	1,113	1	0,298
Chl b	40	3,553	3	0,314	12,176	1	<0,001
Caro	40	4,465	3	0,215	1,903	1	0,168

Las elevadas concentraciones de NaCl como ya se ha especificado anteriormente provocan cambios en la conductividad estomática debido al efecto del estrés osmótico que provoca el cierre de estomas para mantener el balance osmótico en las raíces de la planta (Gul et al., 2022; Munns & Tester, 2008), esto ocurre en un primer momento por el déficit de agua y se ve reforzado por la síntesis de ABA (Gul et al., 2022; 2016; Tuteja, 2007; Wani et al., 2016). Dicha respuesta en muchos casos lleva a una disminución de la transpiración y de la fotosíntesis (Amombo, 2022; Gul et al., 2022), pero en las plantas estudiadas no se observa degradación fotosintética en las plantas estresadas control ni en las que llevaban tratamiento.

4.3 Iones

Las concentraciones de los iones Na^+ y Cl^- aumentaron significativamente al exponer a la planta a condiciones de estrés salino, como se esperaba (Figura 4a y b). En el ion sodio se vio un aumento de la acumulación de este tanto en hojas como en raíz, siendo estadísticamente significativo en todas las concentraciones de NaCl estudiadas, excepto en hojas de plantas sin bioestimulante (Figura 4a). El cloruro también se acumula notoriamente en ambos órganos, se produce un aumento drástico, de este compuesto, desde la exposición a las concentraciones mínimas de NaCl estudiadas (Figura 4b).

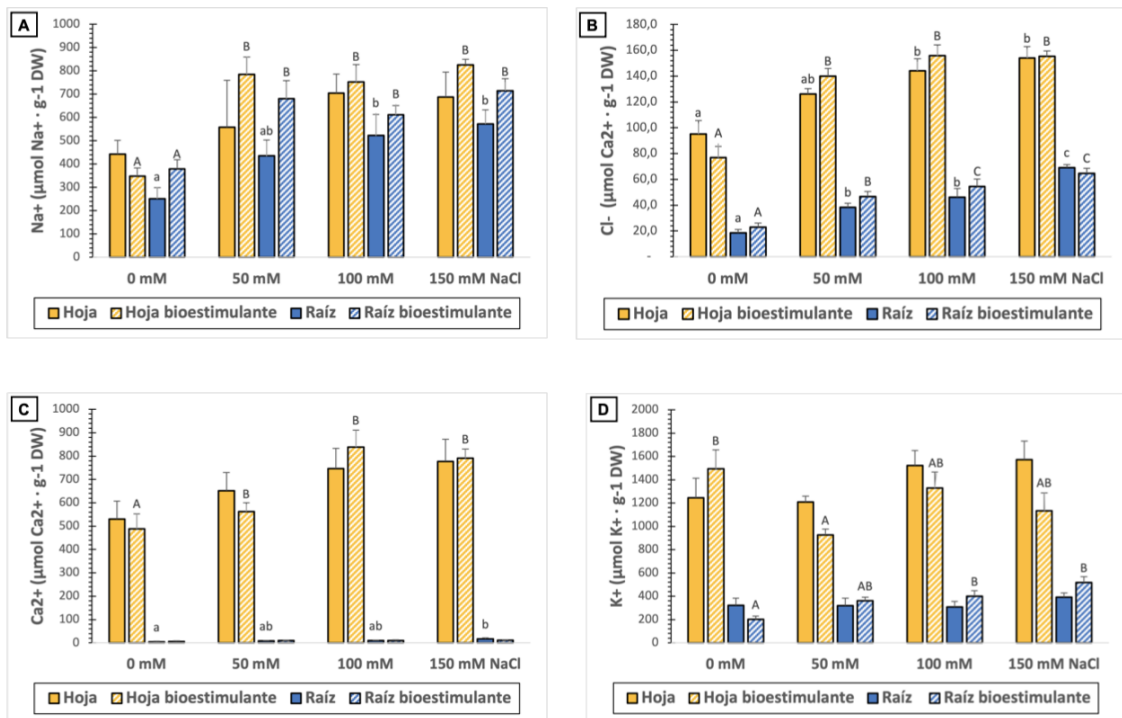


Figura 4: acumulación iónica. (A) Ion potasio (K^+), (B) ion sodio (Na^+), (C) cloruro (Cl^-) y (D) ion calcio (Ca^{2+}), en raíz y hojas. Datos obtenidos tras 23 días de exposición a estrés salino (concentración de NaCl indicada) y la aplicación del tratamiento con el producto bioestimulante; en *Raphanus sativus*. Los valores representan la media y el error estándar. ($n = 5$). La significancia estadística viene determinada por las letras (minúsculas para las plantas sin tratamiento bioestimulante y mayúsculas para las plantas tratadas) donde la misma letra indica que pertenecen al mismo grupo según el Test de Tukey ($p \leq 0,05$).

Si comparamos ambos iones se describe una concentración superior del Na⁺ en el interior de la planta, en comparación con los datos de Cl⁻. Otro resultado destacable es que ambos iones se acumulan a concentraciones más altas en las hojas de la planta que en raíces. En cuanto al tratamiento con el producto solo se observan cambios en raíz en la acumulación de Na⁺, resultando en valores ligeramente superiores a los controles, con un máximo de 887,01 μmol g⁻¹ DW en una de las plantas sometidas a la mayor concentración de estrés estudiada (Tabla 5).

Tabla 5: análisis estadístico Kruskal-Wallis de los compuestos iónicos (K⁺, Ca²⁺, N⁺ y Cl⁻) para el efecto del estrés salino y el tratamiento bioestimulante; en raíz y hojas (p≤0,05). Se expone el número de muestras comparadas (N), el valor del estadístico de contraste o X² (H), los grados de libertad (d.f) y el p-value. Los valores destacados determinan un p-value significativo.

	Hoja							Raíz						
	N	Tratamiento salino			Bioestimulante			N	Tratamiento salino			Bioestimulante		
		H	d.f	p-value	H	d.f	p-value		H	d.f	p-value	H	d.f	p-value
K ⁺	40	8,214	3	0,042	3,793	1	0,051	40	11,258	3	0,01	0,457	1	0,499
Ca ²⁺	40	16,017	3	0,001	0,047	1	0,829	40	11,895	3	0,008	0,047	1	0,829
Na ⁺	40	15,593	3	0,001	1,353	1	0,245	40	16,62	3	0,001	5,797	1	0,016
Cl ⁻	40	26,407	3	<0,001	0,659	1	0,417	40	30,457	3	<0,001	0,354	1	0,552

En cuanto al Ca²⁺ se observa un ligero aumento en la concentración de este conforme aumenta el estrés, sin embargo, solo es notable en algunos casos específicos; en las plantas tratadas sí que se produce un aumento significativo desde concentraciones de 50 mM de NaCl en hojas, aunque en las plantas control no ocurre lo mismo (Figura 4c). En cambio, en raíz solo resulta un aumento relevante en la concentración de Ca²⁺ cuando alcanzamos concentraciones de 150 mM en las plantas sin tratar (Figura 4c). Resulta destacable los niveles tan bajos de este mineral que se reportan en el estudio de las raíces de la planta (Figura 4c).

Por otro lado, el K⁺ mantiene sus niveles estables frente al tratamiento salino (Figura 4a), solo se reporta una ligera subida de este en la raíz a concentraciones de 150 mM, si nos centramos en las plantas con aplicación de producto (Figura 4c).

El tratamiento en invernadero con una elevada concentración de NaCl conlleva a una elevación de los contenidos en Na⁺ y Cl⁻ en raíces, causando una condición hiperosmótica e impidiendo que las plantas sean capaces de absorber agua y nutrientes del medio con normalidad; lo cual va tener implicaciones directas en su rendimiento. Durante el estrés se producen varias fases, una primera donde predomina el estrés osmótico causado por la deshidratación y una segunda denominada estrés iónico debido a la acumulación de estos iones. Debido al estrés iónico, las hojas pierden la capacidad de expansión y por elevada concentración de sal no son capaces de sobrevivir. Si la aparición de nuevas hojas no ocurre simultáneamente, la capacidad fotosintética de la planta se ve disminuida hasta que esta no es capaz de suplir sus necesidades afectando al rendimiento de crecimiento (Almeida et al., 2017; Muuns et al., 2006). La cantidad de iones sodio y cloro que es capaz de acumular la planta

determina su resistencia al estrés. Existen mecanismos de defensa reportados principalmente en halófitas, aunque también se han encontrado en glicófitas, para reducir la concentración de estos iones; especialmente el Na^+ por su elevada toxicidad en la planta (Amombo et al., 2022; Isayenkov & Maathuis, 2019). En diversos estudios se ha visto como algunas plantas son capaces de expulsar el Na^+ y el Cl^- captado a las regiones exteriores de la raíz, devolverlo al suelo o transportarlo a otras partes de la planta como hojas y brotes gracias a la acción de antiportadores H^+/Na^+ (Almeida et al., 2017; Amombo et al., 2022; Bose et al., 2015; Hanin et al., 2016; Wang et al., 2021; Zheng, 2009). Este cambio de localización del Na^+ es una primera respuesta que retrasa los efectos tóxicos de Na^+ y Cl^- en el citoplasma, sin embargo, la traslocación de los iones Na^+ y Cl^- a las partes aéreas de la planta no disminuye la toxicidad de estos ya que su presencia elevada va a disminuir la actividad de proteínas y enzimas esenciales para los procesos fisiológicos de la planta, especialmente si hablamos de los tejidos con gran capacidad metabólica (Tuteja, 2007). Es por eso por lo que la planta, como respuesta secundaria para reducir la toxicidad en hojas y brotes, lleva a cabo un proceso de compartimentación en vacuolas en el interior de las células (Bose et al., 2015; Horie et al., 2012; Ji et al., 2013; Munns & Tester, 2008; Staal et al., 1991) Para lograr secuestrar a estos iones en las vacuolas, se necesita la presencia de metabolitos compatibles que sean capaces de acumularse en las células y mantener así la presión osmótica (Isayenkov & Maathuis, 2019; Wyn Jones et al., 1977).

La planta es capaz de detectar concentraciones mínimas de Na^+ y poner en marcha la ruta "Salt overly sensitive" (SOS), para permitir el movimiento de Na^+ fuera de las células, para eso intervienen el antiportador SOS1 (Na^+/H^+), la kinasa SOS2 y la proteína SOS3, la cual es dependiente de calcio. El ion calcio actúa como protector frente a la acumulación de Na^+ en las células, cuando la concentración de Na^+ alcanza niveles de toxicidad el Ca^{2+} se une a la proteína SOS3 activando a SOS2, la cual es responsable de activar el antiportador SOS1 responsable de la excreción de Na^+ (Amombo et al., 2022; Gul et al., 2022; Ji et al., 2013; Qiu et al., 2002). Además, el ion calcio también actúa como regulador osmótico frente a la pérdida de K^+ (Hanin et al., 2016; He et al., 2018).

La entrada de Na^+ en las células, conlleva a una reducción del K^+ con la finalidad de mantener el potencial de membrana, también, la cantidad de K^+ en el citoplasma se ve reducida debido a que Na^+ y K^+ hacen uso de los mismos transportadores y la mayoría presentan una mayor afinidad por el Na^+ (Hanin et al., 2016). Además, la generación de compuestos ROS a causa del estrés salino activa canales no selectivos de cationes que también provocan la expulsión de K^+ (Wakeel, 2013).

Todos estos recursos de la planta son mecanismos de tolerancia para evitar que el Na^+ y el Cl^- se encuentren en el citoplasma. Ciertos resultados obtenidos concuerdan con los mecanismos de defensa que se activan por la entrada a las raíces de los iones Na^+ y Cl^- . En los datos recogidos se distingue una mayor concentración de Na^+ y Cl^- en las hojas, lo que sugiere que la planta los ha transportado a las partes aéreas de la planta, además, probablemente estos se encuentren secuestrados en las vacuolas intracelulares ya que las hojas siguen realizando sus funciones (Ji et al., 2013). También se aprecia un aumento en Ca^{2+} , lo cual concuerda con su implicación en la homeostasis como osmoprotector y molécula de señalización para iniciar la ruta SOS (He et al., 2018; Isayenkov & Maathuis, 2019; Tuteja, 2007). En cuanto al ión K^+ , los datos obtenidos no muestran una caída en sus niveles, como se predecía, sino que mantiene sus niveles similares a las plantas control manteniendo su homeostasis. Un mecanismo de los productos bioestimulantes para hacer frente al estrés salino podría basarse en reducir niveles Na^+ , Cl^- y aumentar la cantidad de K^+ en concordancia con los mecanismos de

tolerancia reportados en numerosos estudios (Hanin et al., 2016; Isayenkov & Maathuis, 2019; Panta et al, 2014). Sin embargo, en los resultados no se observan dichos cambios lo cual sugiere que el producto no posee ningún efecto de inducción a la salinidad en cuanto al comportamiento de iones.

4.4 Osmolitos, marcadores de estrés oxidativo y antioxidantes no enzimáticos

Respecto a los osmolitos, la prolina (Pro), azúcares solubles totales (TSS) y glicina betaína (GB) son osmoprotectores muy comunes en las respuestas a estrés salino. En los niveles de prolina se vio un aumento progresivo conforme aumentaba la concentración de NaCl en hoja (Figura 5a) y raíz (Figura 5b). Aunque a concentraciones de 50 mM no resulta un incremento significativo, si lo es a concentraciones de salinidad mayor alcanzando un máximo en hoja de 334,44 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW y en raíz de 950,11 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW, en plantas no sometidas al tratamiento bioestimulante. En cuanto al producto bioestimulante no repercute de manera destacable en este compuesto (Tabla 6).

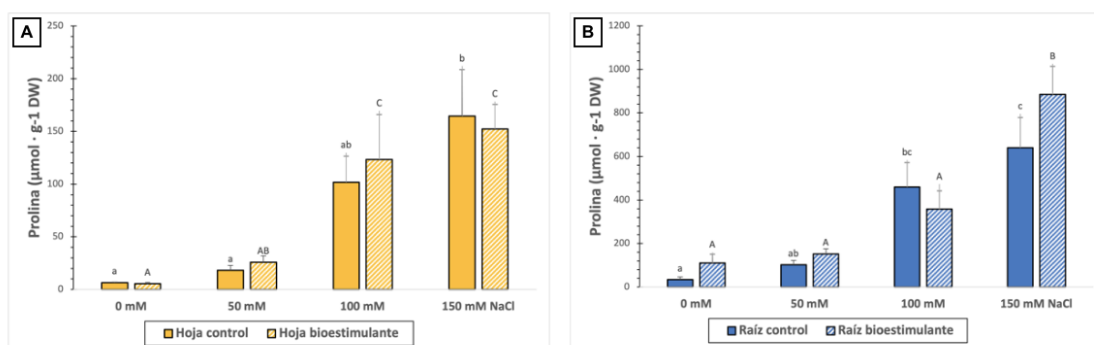


Figura 5: contenido de prolina. (A) Hojas y (B) raíz. Datos obtenidos tras 23 días de exposición a estrés salino (concentración de NaCl indicada) y la aplicación del tratamiento con el producto bioestimulante; en *R. sativus*. Los valores representan la media y el error estándar. (n= 5). La significancia estadística viene determinada por las letras (minúsculas para las plantas sin tratamiento bioestimulante y mayúsculas para las plantas tratadas) donde la misma letra indica que pertenecen a un grupo homogéneo según el Test de Tukey ($p \leq 0,05$)

Tabla 6: análisis estadístico Kruskal-Wallis de los osmolitos [prolina (pro) azúcares solubles totales (TSS) y glicina betaína (GB)], marcadores de estrés oxidativo [malonaldehído (MDA)] y antioxidantes no enzimáticos [flavonoides totales (TF) y compuestos fenólicos totales (TPC)] para el efecto del estrés salino y el tratamiento bioestimulante; en hojas y raíz ($p \leq 0,05$). Se expone el número de muestras comparadas (N), el valor del estadístico de contraste o X^2 (H), los grados de libertad (d.f) y el p-value. Los valores destacados determinan un p-value significativo.

	HOJA							RAÍZ						
	N	Tratamiento salino			Bioestimulante			N	Tratamiento salino			Bioestimulante		
		H	d.f	p-value	H	d.f	p-value		H	d.f	p-value	H	d.f	p-value
Pro	38	31,195	3	<0,001	0,008	1	0,93	38	28,712	1	<0,001	0,471	1	0,493
TSS	40	7,297	3	0,063	19,203	1	<0,001	40	4,428	1	0,219	21,647	1	<0,001
GB	40	8,532	3	0,036	7,171	1	0,007	40	2,419	1	0,49	7,317	1	0,007
MDA	40	3,479	3	0,324	0,105	1	0,745	40	4,175	1	0,243	0,211	1	0,646
TF	40	7,482	3	0,058	0,073	1	0,787	40	2,889	1	0,409	3,187	1	0,074
TPC	40	5,971	3	0,113	1,23	1	0,267	40	5,024	1	0,17	1,291	1	0,256

En relación con la cantidad de TSS no se encuentra correlación con el estrés salino, lo mismo ocurre con la medición de GB (Tabla 6). Cabe destacar como la cantidad en azúcares y de glicina en raíces es significativamente mayor a la presente en hojas (Tabla 7), probablemente debido a las funciones de reserva de la raíz pivotante. Aunque la prolina sea el osmolito más relevante en cuanto a la respuesta a estrés salino de los tres estudiados; tanto los azúcares como la glicina betaína se encuentran notoriamente alterados por la aplicación del tratamiento (Tabla 6); en ambos casos se produce un aumento considerable en la cantidad del componente en comparación con el respectivo control, tanto en raíz como en hojas (Tabla 7).

*Tabla 7: análisis bioquímico de osmolitos, marcadores de estrés oxidativo y antioxidantes no enzimáticos en hoja (H) y raíz (R). Osmolitos: (i) azúcares solubles totales (TSS) y (ii) glicina betaína (GB); los osmolitos se expresan en mg eq. glucosa (Gluc) g⁻¹ DW y μmol eq. de betaína (Bet) g⁻¹ DW, respectivamente. Marcadores de estrés oxidativo: malonaldehído (MDA); expresado en nmol g⁻¹ DW. Por último, compuestos antioxidantes no enzimáticos: (i) flavonoides totales (TF) y (ii) compuestos fenólicos totales (TPC); los antioxidantes no enzimáticos se expresan en mg eq. de catequina (C) y mg eq. de ácido gálico (GA) g⁻¹ DW. Datos obtenidos tras 23 días de exposición a estrés salino (concentración de NaCl indicada) y la aplicación del tratamiento con el producto bioestimulante; en *Raphanus sativus*. Los valores representan la media ± SE. (n= 5). La significancia estadística viene determinada por las letras (minúsculas para las plantas sin tratamiento bioestimulante y mayúsculas para las plantas tratadas) donde la misma letra indica que pertenecen al mismo grupo según el Test de Tukey (p≤0,05).*

		Control				Tratamiento bioestimulante			
		Control	50 mM NaCl	100 mM NaCl	150 mM NaCl	Control	50 mM NaCl	100 mM NaCl	150 mM NaCl
		TSS (mg eq. Gluc g ⁻¹ DW)	H	37,3 ± 4,7	67,6 ± 18,9	76,6 ± 16,9	73,8 ± 8,9	147,5 ± 40,2 ^A	151,4 ± 41,2 ^A
	R	1393,0 ± 220,8	1833,6 ± 202,5	1294,5 ± 247,3	1018,5 ± 288,5	3296,8 ± 640,3	4039,4 ± 987,3	2333,7 ± 191,8	2415,9 ± 280,1
GB (μmol eq. Bet g ⁻¹ DW)	H	11,23 ± 1,7	31,7 ± 9,6	31,0 ± 9,7	30,9 ± 15,6	20,7 ± 2,5 ^A	89,7 ± 21,7 ^B	32,2 ± 11,4 ^{AB}	61,3 ± 19,8 ^{AB}
	R	244,2 ± 69,8	365,8 ± 40,3	251,4 ± 85,5	138,8 ± 38,7	533,8 ± 127,0	332,3 ± 126,9	417,9 ± 72,9	373,8 ± 43,8
MDA (nmol g ⁻¹ DW)	H	604,2 ± 207,2	500,4 ± 77,1	602,6 ± 82,0	498,7 ± 82,8	531,6 ± 97,9	565,7 ± 64,0	662 ± 66,6	497,9 ± 33,4

	R	2886,2 ± 329,9	6040,9 ± 1666,7	4625,6 ± 1654,6	3660,2 ± 2167,9	5554,2 ± 1356,5	4861 ± 727,5	6009,7 ± 1723,2	4243,8 ± 1058,4
TF (mg eq. C g-1 DW)	H	10 ± 1,9	9,7 ± 1,7	13,1 ± 1,6	9,5 ± 0,6	7,5 ± 1,6	8,9 ± 1,6	11,3 ± 0,7	8,4 ± 1,0
	R	7,5 ± 1,1	11,1 ± 4,0	5,7 ± 1,6	10,7 ± 6,2	13,5 ± 3,0	8,8 ± 1,5	9,1 ± 1,8	7,8 ± 1,4
TPC (mg eq. GA g-1 DW)	H	35,0 ± 4,6	28,2 ± 3,9	32,1 ± 4,3	28,4 ± 1,0	33,1 ± 9,0	32,9 ± 3,6	35,8 ± 2,7	24,6 ± 2,7
	R	97,8 ± 22,2	108,1 ± 19,2	99,5 ± 18,8	111,1 ± 42,5	198,5 ± 34,5 ^B	125 ± 20,8 ^{AB}	105,0 ± 15,6 ^{AB}	75,7 ± 17,5 ^A

Respecto a los marcadores de estrés oxidativo en este estudio se analiza el malonaldehído (MDA), además, se mide la cantidad total de flavonoides (TF) y de fenoles (TPC) como representación de compuestos antioxidantes. En los tres compuestos medidos se mantiene el equilibrio, ya que las concentraciones no varían en relación con las plantas control (Tabla 7). En cuanto a la aplicación del tratamiento tampoco afecta de manera significativa a ninguno de los tres componentes (Tabla 6).

De todos los osmolitos presentes durante el estrés salino, el presente estudio se centra en la actuación de Pro, TSS y GB. Estos compuestos poseen la capacidad osmoreguladora y osmoprotectora en las plantas sometidas a estrés, aumentando su tolerancia. Con la finalidad de mantener el equilibrio osmótico en el interior de la célula, y hacer frente a la acumulación iónica provocada por el estrés, las plantas introducen ciertos osmolitos en el citoplasma, para regular el potencial iónico y reducir la toxicidad iónica. Además, estos osmolitos actúan como estabilizadores de proteínas, enzimas y estructuras celulares lo que repercute en una mejoría de ciertos los procesos fisiológicos de la planta durante condiciones de salinidad. Además, estos compuestos también están implicados en hacer frente a los compuestos ROS debido a la capacidad de activación de compuestos antioxidantes (Ahmad et al., 2013; Godoy et al., 2021; Gul et al., 2022; Slama et al., 2015). A la vista de los resultados entre los osmolitos estudiados parece ser que el efecto de la prolina es predominante, sin embargo, el tratamiento con bioestimulante produce una subida en la concentración de GB y TSS, lo que determina que la aplicación del producto es capaz de activar mecanismos de tolerancia en cuanto a la síntesis de osmolitos.

Los compuestos ROS son efecto secundario del estrés salino en planta, la producción de estos componentes es capaz de alterar la función de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos debido al daño oxidativo; es por eso que las plantas poseen mecanismos antioxidantes de defensa frente a ellos los cuales pueden ser enzimáticos como superóxido dismutasa, catalasa o peroxidasa y no enzimáticos como flavonoides (Amombo et al., 2022; Noreen & Ashraf, 2009; Tuteja, 2007). En este trabajo se ha llevado a cabo el análisis de malonaldehído cuyos niveles nos indican el nivel de peroxidación lipídica, dado que es un producto generado por esta reacción, dichos valores nos dan una idea del daño oxidativo que ha sufrido la planta (Gulen et al., 2008; He et al., 2018). Por lo tanto, la alteración de este componente se debería ver correlacionada con un aumento de los componentes antioxidantes, como mecanismo de defensa. En las condiciones estudiadas no se vieron cambios significativos de MDA, lo que sugiere que no hay actividad diferencial de compuestos antioxidantes en las plantas, que indica que no se produce un aumento del daño oxidativo en estas condiciones. Esta hipótesis se ve sustentada por los datos obtenidos en TPC y TF, los cuales indican una baja actividad de estos compuestos antioxidantes que actúan como apoyo secundario a las enzimas para reducir la cantidad de ROS producidos durante el estrés (Gul et al., 2022; Mrid et al., 2022).

5. CONCLUSIÓN

En el trabajo realizado se logró determinar mediante un estudio de los parámetros de crecimiento y del perfil bioquímico como afectaba el estrés salino a *R.sativus*, además, se establecieron las implicaciones del bioestimulante comercial Balox ® en la tolerancia a este tipo de estrés.

Como consecuencias de la exposición a estrés se observó tras estudiar en detalle las características biométricas, como la exposición de las plantas a concentraciones de NaCl elevadas, produjo una inhibición del crecimiento. En cuanto a los componentes bioquímicos se produjo una elevación en los niveles de Na⁺ y Cl⁻ en el interior de hojas y raíces, a causa de la entrada de NaCl en el organismo. Respecto a los mecanismos de defensa activados por la planta se estableció que se había producido el transporte de Na⁺ a las secciones superiores de la planta, como mecanismo para evitar la toxicidad citoplasmática. También se observa un ligero aumento en la concentración de Ca²⁺, probablemente debido a sus implicaciones como componente osmoprotector y de señalización en rutas de defensa. También se observó como el estrés aumentaba la síntesis de osmolitos, principalmente prolina, debido a sus implicaciones homeostáticas y de estabilización de compuestos.

En cuanto a la aplicación del producto bioestimulante se observan cambios significativos al estudiar la cantidad de azúcares solubles totales (TSS) y glicina betaína (GB). Dada la implicación de estos dos osmolitos en la tolerancia a estrés salino, es probable que los mecanismos de acción de Balox ® se basen en actuar en las rutas de síntesis de estos dos compuestos, como medida de protección frente al estrés. Sin embargo, se necesitan más estudios con diferentes condiciones en cuanto a número de dosis, tiempo de exposición, concentración de NaCl estudiadas y en diferentes especies para tener una visión más completa de las implicaciones positivas de Balox ® en la tolerancia a estrés.

6. BIBLIOGRAFÍA

ABDELAAL, K.A.; EL-MAGHRABY, L.M.; ELANSARY, H.; HAFEZ, Y.M.; IBRAHIM, E.I.; EL-BANNA, M.; EL-ESAWI, M. & ELKELISH, A. (2020). Treatment of Sweet Pepper with Stress Tolerance-Inducing Compounds Alleviates Salinity Stress Oxidative Damage by Mediating the Physio-Biochemical Activities and Antioxidant systems. *Agronomy*, 10(1): 26-41

ACOSTA-QUEZADA, P.G.; SALINAS, E.H., MURQUINCHO-CHUNCHO, J.M.; JADÁN-VERIÑAS, E. & RUÍZ-GONZÁLEZ M.X. (2022) Heterogeneous effects of climatic conditions on Andean bean landraces and cowpeas highlight alternatives for crop management and conservation. *Scientific Reports* 12: 6586.

AHMAD, P.; AZOOZ, M.M. & PRASAD, M.N.V. (2013). *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*. Ed. Springer. New York. 510 pp.

AHN, M.; KIM, J.; HONG, S.; KIM, J.; KO, H.; LEE, N.H.; KIM, G.O. & SHIN, T. (2018). Black Radish (*Raphanus sativus* L. var. niger) Extract mediates its hepatoprotective effect on carbon tetrachloride-induced hepatic injury by attenuating oxidative stress. *Journal of Medicinal Food*, 21(9): 866–875.

ALFOSEA-SIMÓN, M.; ZAVALA-GONZÁLEZ, E.; CÁMARA- ZAPATA, J. M.; NICOLÁS, J. J.; SIMÓN, I.; SIMÓN-GRAO, S. & GARCÍA-SÁNCHEZ, F. (2020). Effect of foliar application of amino acids on the salinity tolerance of tomato plants cultivated under hydroponic system. *Scientia Horticulturae*, 272:1-9

ALMEIDA, D. M.; OLIVEIRA, M. M. & SAIBO, N. (2017). Regulation of Na⁺ and K⁺ homeostasis in plants: towards improved salt stress tolerance in crop plants. *Genetics and molecular biology*, 40(1): 326–345.

AMOMBO, E., ASHILENJE, D., HIRICH, A.; KOUISNI, L.; OUKARROUM, A.; GHOUAM, C.; EL GHAROUS, M. & NILAHYANE, ABDELAZIZ. (2022). Exploring the correlation between salt tolerance and yield: research advances and perspectives for salt-tolerant forage sorghum selection and genetic improvement. *Planta*, 255: 71-87

ARUMUGANATHAN, K.E.E & EARLE, E. (1991). Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9: 208-218.

ASSAHA D.V.M.; UEDA A.; SANEOKA H.; AL-YAHYAI R. & YAISH M.W. (2017) The Role of Na⁺ and K⁺ Transporters in Salt Stress Adaptation in Glycophytes. *Frontiers in Physiology*, 8:509.

BALTAZAR, M.; CORREIA, S.; GUINAN, K.J.; SUJEETH, N.; BRAGANÇA, R. & GONÇALVES, B. (2021) Recent Advances in the Molecular Effects of Biostimulants in Plants: An Overview. *Biomolecules*, 11(8):1096.

BANIHANI S. A. (2017). Radish (*Raphanus sativus*) and Diabetes. *Nutrients*, 9(9): 1014.

BATES, L.S.; WALDREN, R.P. & TEARE, I.D. (1972). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39:205–207.

BEEVI, S. & NARASU, M. (2010). Polyphenolics Profile, Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Leaves and Stem of *Raphanus sativus* L. *Plant foods for human nutrition*, 65: 8-17.

BHATTACHARJEE, S. (2019). *Reactive Oxygen Species in Plant Biology*. Ed. Springer, India. 187 pp.

BIOSTIMULANTS MARKET SIZE, TRENDS, FORECAST 2021 – 2027. *Market Data Forecast*. Recuperado 4 de septiembre de 2022, de <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/biostimulants-market>

BLAINSKI, A.; LOPES, G.C. & MELLO, J.C.P. (2013). Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules* 18:6852–6865.

BOSE, J.; RODRIGO-MORENO, A.; LAI, D.; XIE, Y.; SHEN, W. & SHABALA, S. (2015). Rapid Regulation of the Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity Is Essential to Salinity Tolerance in Two Halophyte Species, *Atriplex Lentiformis* and *Chenopodium Quinoa*. *Annals of Botany*, 115:481–494.

BULGARI, R.; TRIVELLINI, A.; & FERRANTE, A. (2019). Effects of two doses of organic extract-based biostimulant on greenhouse lettuce grown under increasing NaCl concentrations. *Frontiers in Plant Science*, 9:1-14.

CARRIGER, J.; RAND, G.; GARDINALI, P.; PERRY, W.; TOMPKINS, M. & FERNANDEZ, A. (2006). Pesticides of Potential Ecological Concern in Sediment from South Florida Canals: An Ecological Risk Prioritization for Aquatic Arthropods. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 15:21-45.

CECCARINI, C.; ANTOGNONI, F.; BIONDI, S.; FRATERNALE, A.; VERARDO, G.; GORASSINI, A. & SCOCCIANI, V. (2019). Polyphenol-enriched spelt husk extracts improve growth and stress-related biochemical parameters under moderate salt stress in maize plants. *Plant physiology and biochemistry*, 141:95-104.

COTLOVE, E. (1963). Determination of the True Chloride Content of Biological Fluids and Tissues. II. Analysis by Simple, Nonisotopic Method. *Analytical Chemistry*, 35(1): 101–105.

CRISP, P. (1995) Radish, *Raphanus sativus* (Cruciferae) en *Evolution of crop plants*. Ed. Longman Scientific & Technical, London. 86–89 pp

DAWSON, A. H.; EDDLESTON, M.; SENARATHNA, L.; MOHAMED, F.; GAWARAMMANA, I.; BOWE, S. J.; MANUWEERA, G. & BUCKLEY, N. A. (2010). Acute human lethal toxicity of agricultural pesticides: a prospective cohort study. *PLoS medicine*, 7(10): e1000357

DESOKY, E. S. M.; ELRYS, A. S.; MOHAMED, G. F. & RADY, M. M. (2018). Exogenous application of moringa seed extract positively alters fruit yield and its contaminant contents of *Capsicum annuum* plants grown on a saline soil contaminated with heavy metals. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 8(6):591–601.

DI STASIO, E.; VAN OOSTEN, M. J.; SILLETTI, S.; RAIMONDI, G., DELL'AVERSANA, E.; CARILLO, P. & MAGGIO, A. (2018). Ascophyllum nodosum-based algal extracts act as enhancers of growth, fruit quality, and adaptation to stress in salinized tomato plants. *Journal of Applied Phycology*, 30(4):2675–2686.

DU JARDIN, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196:3-14.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. & SMITH, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28:350-356.

EBIC – The European Biostimulants Industry Council. Recuperado 5 de septiembre de 2022, de <https://biostimulants.eu>

EL-YAZAL, M. A. S. (2019). Presoaking treatment of propolis aqueous extract alleviates salinity stress in spinach (*Spinacia oleracea* L.) plants grown under calcareous saline soil conditions. *International Letters of Natural Sciences*, 76:23-33

FAO (2006). Guidelines for soil profile description (4th ed.). Rome: *Food and Agriculture Organisation of the United Nations*, 97 pp.

- FAO (2021). Global map of salt-affected soils. Rome. 20 pp.
- FLOWERS, T.J. & COLMER, T.D. (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*, 179:945-963.
- FLOWERS, T.J.; TROKE, P.F. & YEO, A.R. (1977). The Mechanism of Salt Tolerance in Halophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, 28:89–121.
- GADALLAH, M. A. A. (1999). Effects of proline and glycine betaine on *Vicia faba* responses to salt stress. *Biol. Plant.* 42:249–257.
- GAMBA, M.; ASLLANAJ, E.; RAGUINDIN, P.F.; GLISIC, M.; FRANCO, O.; MINDER, B.; BUSSLER, W.; METZGER, B.; KERN, H. & MUKA, T. (2021). Nutritional and phytochemical characterization of radish (*Raphanus sativus*): A systematic review. *Trends in Food Science & Technology*, 113:205-218.
- GARCÍA, A.L.; GARCÍA, F.J.; BORGES, A.A.; MORALES, S.; BOTO, A. & JIMÉNEZ, D. (2020). Pure Organic Active Compounds Against Abiotic Stress: A Biostimulant Overview. *Frontiers in Plant Science*, 11:575829.
- GEORGE, R.A.T. & EVANS, D.R. (1981). A classification of winter radish cultivars. *Euphytica*, 30, 483–492
- GILL, S.S. & TUTEJA, N. (2010). Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Plant Physiol. Biochem*, 48:909–930.
- GIUSTI, M.M. & WROLSTAD, R.E. (1996), Characterization of Red Radish Anthocyanins. *Journal of Food Science*, 61:322-326.
- GODOY, F.; OLIVOS-HERNÁNDEZ, K.; STANGE, C. & HANDFORD, M. (2021). Abiotic Stress in Crop Species: Improving Tolerance by Applying Plant Metabolites. *Plants* (Basel, Switzerland),10(2):186.
- GONZÁLEZ ORENGA, S.; LEANDRO, M.E.; TORTAJADA, L.; GRIGORE, M.; LLORENS, J.; FERRER- GALLEGU, P.; LAGUNA, E.; BOSCAIU, M. & VICENTE, O. (2021). Comparative studies on the stress responses of two *Bupleurum* (Apiaceae) species in support of conservation programmes. *Environmental and Experimental Botany*, 191:104616.
- GOYENECHÉ, R.; ROURA, S.; PONCE, A.G.; VEGA-GALVEZ, A.; QUISPE, I.; URIBE, E. & DI SCALA, K. (2015). Chemical characterization and antioxidant capacity of red radish (*Raphanus sativus* L.) leaves and roots. *Journal of Functional Foods*, 16:256-264.
- GRASSI, D.; DESIDERI, G. & FERRI, C. (2010). Flavonoids: Antioxidants against atherosclerosis. *Nutrients*, 2:889–902.
- GRIEVE, C.M. & GRATTAN, S.R. (1983). Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant Soil* 70:303–307.
- GUL, Z.; TANG, Z.-H.; ARIF, M. & YE, Z. (2022) An Insight into Abiotic Stress and Influx Tolerance Mechanisms in Plants to Cope in Saline Environments. *Biology*, 11:597.

GULEN, H.; ÇETINKAYA, C.; KADIOĞLU, M.; T KESICI, M.; CANSEV, A. & ERIS, A. (2008). Peroxidase activity and lipid peroxidation in strawberry (*Fragaria X ananassa*) plants under low temperature. *J. biol. environ. sci.* 2:95-100.

HANIN, M.; EBEL, C.; NGOM, M.; LAPLAZE, L. & MASMOUDI, K. (2016) New Insights on Plant Salt Tolerance Mechanisms and Their Potential Use for Breeding. *Front. Plant Sci.* 7:1787.

HANLON, P. R., & BARNES, D. M. (2011). Phytochemical composition and biological activity of 8 varieties of radish (*Raphanus sativus* L.) sprouts and mature taproots. *Journal of food science*, 76(1):185–192.

HAQUE, M.A.; RAFII, M.Y.; YUSOFF, M.M.; ALI, N.S.; YUSUFF, O.; DATTA, D.R.; ANISUZZAMAN, M. & IKBAL, M.F (2021). Advanced Breeding Strategies and Future perspectives of Salinity Tolerance in Rice. *Agronomy*, 11:1631.

HASANUZZAMAN, M.; BHUYAN, M. B.; ZULFIQAR, F.; RAZA, A.; MOHSIN, S. M.; MAHMUD, J. A. & FOTOPOULOS, V. (2020). Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, 9(8):681.

HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A; ZHU, J.K. & BOHNERT, H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 51:463-499.

HE, M.; HEM C.Q. & DING, N.Z. (2018). Abiotic Stresses: General Defenses of Land Plants and Chances for Engineering Multistress Tolerance. *Front. Plant Sci.* 9:1771.

HODGES, D.M.; DELONG, J.M.; FORNEY, C. & PRANGE, R.K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207:604–611.

HOFFMAN, G.J. & RAWLINS, S.L. (1971). Growth and water potential of root crops as influenced by salinity and relative humidity. *Agronomy Journal*, 63:877-880.

HORIE, T.; KARAHARA, I., & KATSUHARA, M. (2012). Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus on rice plants. *Rice*, 5(1):11.

HOSSAIN, M. A.; HASANUZZAMAN, M.; & FUJITA, M. (2011). Coordinate induction of antioxidant defense and glyoxalase system by exogenous proline and glycine betaine is correlated with salt tolerance in mung bean. *Front. Agric.* 5:1–14.

HOSSEINI, S.; SHABANI, L.; SABZALIAN, M. R.; & GHARIBI, S. (2022). Foliar spray of commercial seaweed and amino acid-derived biostimulants promoted phytoremediation potential and salinity stress tolerance in halophytic grass, *Puccinellia distans*. *International journal of phytoremediation* 1:1–15.

INNOVAKGLOBAL (2022). *Ficha técnica Balox*. 1pp. Recuperado 1 de septiembre de 2022, de <https://www.innovakglobal.com/bioestimulantes/balox/#popmake-2558>

ISAYENKOV, S.V. & MAATHUIS, F.J.M. (2019). Plant Salinity Stress: Many Unanswered Questions Remain. *Front. Plant Sci.* 10:80.

JANDA, T.; KHALIL, R.; TAJTI, J.; PÁL, M.; SZALAI, G.; RUDNÓY, S., RACZ, I.; KÁTAY, G.; MOLNÁR, A.; LEJMEI, M.; MARČEK, T.; GELL, G.; BIRINYI, Z. & DARKÓ, E. (2018). The newly synthesized plant growth regulator S-methylmethionine salicylate may provide protection against high salinity in wheat. *Plant Growth Regul.* 85:305–315.

JENKS, M. A. & HASEGAWA, P. M. (2005) *Plant Abiotic Stress*. Ed. Blackwell, India. 270 pp.

JI, H.; PARDO, J. M.; BATELLI, G.; VAN OOSTEN, M. J.; BRESSAN, R. A., & LI, X. (2013). The Salt Overly Sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. *Molecular plant*, 6(2):275–286.

KANEKO, Y.; KIMIZUKA-TAKAGI, C.; BANG S.W. & MATSUZAWA, Y. (2007) Radish. *Genome mapping and molecular breeding in plants*. Ed. Springer, New York. 141–160 pp.

KAUR, H. & GARG, H. (2014). Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies, en *Pesticides-Toxic Effects*. Ed. Intech. 187-230 pp.

KIM, J.; AHN, M.; KIM, S.E.; LEE.; KIM, H.; KIM, G. & SHIN, T. (2017). Hepatoprotective effect of fermented black radish (*Raphanus sativus* L. var *niger*) in CCl₄ induced liver injury in rats. *Journal of the Preventive Veterinary Medicine*, 41:143-149.

KRISHNAMURTHY, R. (1991). Amelioration of salinity effect in salt tolerant rice (*Oryza sativa* L.) by foliar application of putrescine. *Plant Cell Physiol.* 32:699–703.

LAMZ, A. & GONZÁLEZ, M. C. (2013). La salinidad como problema en la agricultura: la mejora vegetal una solución inmediata. *Cultivos Tropicales*, 34(4):31- 42.

LEI, P.; XU, Z.; LIANG, J.; LUO, X.; ZHANG, Y.; FENG, X., & XU, H. (2015). Poly(γ -glutamic acid) enhanced tolerance to salt stress by promoting proline accumulation in *Brassica napus* L. *Plant Growth Regul.* 78:233–241.

LICHTENTHALER, H.K. & WELLBURN A.R (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11:591 - 592.

MALCOLM, C V. (1962) Water for agriculture. 2. Plants for salty water. *Journal of the Department of Agriculture*, 3(10):6.

MANIVANNAN, A.; KIM, J. H.; KIM, D. S.; LEE, E. S. & LEE, H. E. (2019). Deciphering the Nutraceutical Potential of *Raphanus sativus*-A Comprehensive Overview. *Nutrients*, 11(2): 402.

MARCELIS, L. & VAN HOOIJDONK, J. (1999). Effect of salinity on growth, water use and nutrient use in radish (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil* 215:57–64.

MATERA, R.; GABBANINI, S.; DE NICOLA, G. R.; IORI, R.; PETRILLO, G. & VALGIMIGLI, L. (2012). Identification and analysis of isothiocyanates and new acylated anthocyanins in the juice of *Raphanus sativus* cv. Sango sprouts. *Food Chemistry*, 133: 563–572.

MBINDA, W. & MUKAMI, A. (2021). A Review of Recent Advances and Future Directions in the Management of Salinity Stress in Finger Millet. *Front. Plant Sci.* 12: 734798.

MRID, R.; BENMRID, B.; HAFSA, J.; BOUKCIM, H.; SOBEH, M. & YASRI, A. (2021). Secondary metabolites as biostimulant and bioprotectant agents: A review. *Science of The Total Environment*, 777:146204

MUNNS, R. & TESTER, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol.* 59:651–681

MUNNS, R.; JAMES, R. & LÄUCHLI, A. (2006). Approaches to Increasing the Salt Tolerance of Wheat and Other Cereals. *Journal of experimental botany.* 57(5):1025–1043

NADARAJAH K. K. (2020). ROS Homeostasis in Abiotic Stress Tolerance in Plants. *International journal of molecular sciences*, 21(15):5208.

NAKAMURA, Y.; IWAHASHI, T.; TANAKA, A.; KOUTANI, J.; MATSUO, T.; OKAMOTO, S.; SATO, K. & OHTSUKI, K. (2001). 4-(Methylthio)-3-butenyl isothiocyanate, a principal antimutagen in daikon (*Raphanus sativus*; Japanese white radish). *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(12):5755–5760.

NASIBI, F.; KALANTARI, K. M.; & BARAND, A. (2014). Effect of seed pre-treatment with L-arginine on improvement of seedling growth and alleviation of oxidative damage in canola plants subjected to salt stress. *Iran. J. Plant Physiol.* 5:1217–1224

NGUYEN, H. C.; LIN, K. H.; HO, S. L.; CHIANG, C. M. & YANG, C. M. (2018). Enhancing the abiotic stress tolerance of plants: from chemical treatment to biotechnological approaches. *Physiologia plantarum*, 164(4):452–466.

NOREEN, Z. & ASHRAF, M. (2009). Changes in antioxidant enzymes and some key metabolites in some genetically diverse cultivars of radish (*Raphanus sativus* L.). *Environmental and experimental Botany*, 67(2):395–402.

ONDRASEK, G.; RATHOD, S.; MANOHARA, K.K.; GIREESH, C.; ANANTHA, M.S.; SAKHARE, A.S.; PARMAR, B.; YADAV, B.K.; BANDUMULA, N.; RAIHAN, F. ZIELIŃSKA-CHMIELEWSKA, A.; MERIÑO-GERGICHEVICH, C.; REYES-DÍAZ, M.; KHAN, A.; PANFILOVA, O.; SEGUEL FUENTEALBA, A.; ROMERO, S.M.; NABIL, B.; WAN, C.; SHEPHERD, J. & HORVATINEC, J. (2022). Salt Stress in Plants and Mitigation Approaches. *Plants*, 11:717.

PANTA, S., FLOWERS, T., LANE, P. A., DOYLE, R., HAROS, G., & SHABALA, S. N. (2014). Halophyte agriculture: Success stories. *Environmental and Experimental Botany*, 107:71-83.

QIU, Q. S.; GUO, Y.; DIETRICH, M. A.; SCHUMAKER, K. S. & ZHU, J. K. (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12):8436–8441.

RASOOL, S.; HAMEED, A.; AZOOZ, M.M. SIDDIQI, T.O & AHMAD, P. (2013). Salt stress: causes, types and responses of plants, en *Ecophysiology and responses of plants under salt stress*. Ed. Springer, New York. 1–24 pp

RICCI, M.; TILBURY, L.; DARIDON, B. & SUKALAC, K. (2019). General Principles to Justify Plant Biostimulant Claims. *Frontiers in plant science*, 10:494.

RICHHARIA, R.H. (1937) Cytological Investigations of *Raphanus Sativus*, *Brassica Oleracea* and Their F1 Hybrids. *Journal of Genetics*, 34, 45-55.

ROUPHAEL, Y., & COLLA, G. (2018). Synergistic biostimulatory action: designing the next generation of plant biostimulants for sustainable agriculture. *Front. Plant Sci.* 9: 1655.

ROY, D.; BASU, N.; BHUNIA, A. & BANERJEE, S. K. (1993). Counteraction of exogenous L-proline with NaCl in salt-sensitive cultivar of rice. *Biol. Plant* 35:69.

ROY, P.; NIYOGI, K.; SENGUPTA, D. N.; & GHOSH, B. (2005). Spermidine treatment to rice seedlings recovers salinity stress-induced damage of plasma membrane and PM-bound H⁺-ATPase in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. *Plant Sci.* 168:583–591.

SADIQ, Y.; ZAID, A. & KHAN, M. M. A. (2020). Adaptive physiological responses of plants under abiotic stresses: Role of phytohormones. *Plant ecophysiology and adaptation under climate change: Mechanisms and perspectives I*. Ed. Springer, Singapore. pp. 797-824.

SCIALABBA, A. & MELATI, M.R. (1990). The effect of NaCl on growth and xylem differentiation of radish seedlings. *Bot. Gaz.* 151:516-521.

SELYUTINA, G. & GAPONTSEVA, O. (2016). Component composition of radish root essential oil. *Ukrainian Food Journal*, 5:653–666.

SHAMS, M.; YILDIRIM, E.; EKINCI, M.; TURAN, M.; DURSUN, A., PARLAKOVA, F.; & KUL, R. (2016). Exogenously applied glycine betaine regulates some chemical characteristics and antioxidative defence systems in lettuce under salt stress. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 57:225–231.

SHANNON, M.C. & GRIEVE, C.M. (1999) Tolerance of Vegetable Crops to Salinity. *Scientia Horticulturae*, 78:5-38.

SHIMOSE, N. & HAYASHI, N. (1983) Salt tolerance of parsley, welsh onion, radish, and cabbage. *Bullet. Okayama Univ.* 62:25-30.

SINGH, B. (2021). *Radish (Raphanus sativus L.): Breeding for Higher Yield, Better Quality and Wider Adaptability*. Ed. Springer. 275-304 pp.

SLAMA, I.; ABDELLEY, C.; BOUCHEREAU, A.; FLOWERS, T. & SAVOURÉ, A. (2015). Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Annals of botany*, 115(3):433–447.

SOFY, M. R.; ELHAWAT, N.; & ALSHAAL, T. (2020). Glycine betaine counters salinity stress by maintaining high K⁺/Na⁺ ratio and antioxidant defense via limiting Na⁺ uptake in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 200:110732.

SONNEVELD, C. & VAN DEN BOS, A.L. (1995) Effects of nutrient levels on growth and quality of radish (*Raphanus sativus* L.) grown on different substrates, *Journal of Plant Nutrition*, 18:3:501-513.

STAAL, M.; MAATHUIS, F.J.M.; ELZENGA, J.T.M.; OVERBEEK, J.H.M. & PRINS, H.B.A. (1991), Na⁺/H⁺ antiport activity in tonoplast vesicles from roots of the salt-tolerant

Plantago maritima and the salt-sensitive *Plantago media*. *Physiologia Plantarum*, 82: 179-184.

SUGIMOTO, K. (2009). Evaluation of salt tolerance in Japanese wild radishes (*Raphanus sativus* f. *raphanistroides* Makino). *Bull. Minamikyushu Univ.* 39: 79-88.

TEKLIĆ, T. ; PARADIKOVIĆ, N.; ŠPOLJAREVIĆ, M.; ZELJKOVIĆ, S.; LONČARIĆ, Z. & LISJAK, M. (2020). Linking abiotic stress, plant metabolites, biostimulants and functional food. *Annals of Applied Biology*, 178(2):169-191.

TUTEJA N. (2007). Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods in enzymology*, 428:419–438.

UNITED NATIONS (2019). *Growing at a slower pace, world population is expected to reach 9.7 billion in 2050 and could peak at nearly 11 billion around 2100*. Recuperado el 30 de Agosto de 2022 de <https://www.un.org/development/desa/en/news/population/world-population-prospects-2019.html>

MCGEORGE, W.T. (1954), Diagnosis and Improvement of Saline and Alkaline Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 18: 348-348.

VUSHKIN, K.; BARTHOLOMEUS, H.; BREGT, A. K.; PULATOV, A.; KEMPEN, B., & DE SOUSA, L. (2019). Global mapping of soil salinity change. *Remote Sensing of Environment*, 231:111260.

WASEL, Y. & BRECKLE, S.W. (1987). Differences in responses of various radish roots to salinity. *Plant Soil* 104:191-194

WAKEEL, A. (2013), Potassium–sodium interactions in soil and plant under saline-sodic conditions. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, 176:344-354.

WANG, L.S.; SUN, X.D.; CAO, Y.; WANG, L.; LI, F.J. & WANG, Y.F. (2010). Antioxidant and prooxidant properties of acylated pelargonidin derivatives extracted from red radish (*Raphanus sativus* var. *niger*, Brassicaceae). *Food Chem. Toxicol*, 48:2712–2718.

WANG, X.; LIU, L.; WANG, B.; DINGXUAN, Q. & ZHOU, G. (2021). Variations in ion transportation and accumulation in alfalfa plants under NaCl and Na₂HCO₃ stresses with different pH levels. *Grassl Sci*; 67:258– 266.

WANI, S.; KUMAR, V.; SHRIRAM, V. & SAH, S. (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal*. 4: 162.

WANIA, S. H.; KUMAR, V.; SHRIRAM, V. & SAH, S. K. (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop J.* 4:162–176.

WEIMBERG, R. (1987). Solute adjustments in leaves of two species of wheat at two different stages of growth in response to salinity. *Physiologia plantarum* 70(3):381– 388.

WU, G.; YAN, Y.; ZHOU, Y.; DUAN, Y.; ZENG, S.; WANG, X.; LIN, W.; OU, C.; ZHOU, J. & XU, Z. (2020). Sulforaphane: Expected to Become a Novel Antitumor Compound. *Oncology research*, 28(4):439–446.

XIAO, Z.; LESTER, G. E.; LUO, Y. & WANG, Q. (2012). Assessment of vitamin and carotenoid concentrations of emerging food products: Edible microgreens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:7644–7651.

YAMANE, K.; LÜ, N. & OHNISHI, O. (2009). Multiple origins and high genetic diversity of cultivated radish inferred from polymorphism in chloroplast simple sequence repeats. *Breed Sci* 59:55–65

YEO, A.R. & FLOWERS, T.J. (1980). Salt tolerance in the halophyte *Suaeda maritima* (L.) Dum.: evaluation of the effect of salinity upon growth. *Journal of Experimental Botany* 31:1171–1183

YEO, A.R. & FLOWERS, T.J. (1986). Ion transport in *Suaeda maritima*: its relation to growth and implications for the pathway of radial transport of ions across the root. *Journal of Experimental Botany* 37:143–159

ZAHEDI, S. M.; HOSSEINI, M. S.; ABADÍA, J. & MARJANI, M. (2020). Melatonin foliar sprays elicit salinity stress tolerance and enhance fruit yield and quality in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). *Plant Physiol. Biochem.* 149:313–323.

ZAKI, H. E. M.; TAKAHATA, Y. & YOKOI, S. (2012) Analysis of the morphological and anatomical characteristics of roots in three radish (*Raphanus sativus*) cultivars that differ in root shape. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 87(2):172-178

ZHENG, Q.; LIU, L.; LIU, Z.; CHEN, J. & ZHAO, G. (2009). Comparison of the response of ion distribution in the tissues and cells of the succulent plants *Aloe vera* and *Salicornia europaea* to saline stress. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 172(6): 875– 883.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T. & JIANMING, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.*, 64:555–559.