



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

Evaluación del efecto de la combinación de bioestimulantes  
microbianos y no microbianos en la respuesta de tomate al  
estrés salino.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Sánchez Bettini, Valeria

Tutor/a: Porcel Roldán, Rosa Caridad

Director/a Experimental: BENITO SANTANO, PATRICIA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

# **Evaluación del efecto de la combinación de bioestimulantes microbianos y no microbianos en la respuesta de tomate al estrés salino.**

## **I. Resumen**

**Español:** El cambio climático antropogénico está teniendo un impacto en la variabilidad climática. Esto provoca una mayor frecuencia de eventos extremos como largos periodos de altas temperaturas, sequías e inundaciones, que pueden dañar y reducir los rendimientos de los cultivos. Entre los factores que limitan la productividad de los cultivos, la alta salinidad del suelo y la sequía se consideran dos de las circunstancias con mayor incidencia. La búsqueda de nuevas alternativas para alcanzar una agricultura más sostenible debido a la pérdida de suelos fértiles está provocando un creciente interés por el uso de bioestimulantes como alternativas a los fertilizantes sintéticos. Los bioestimulantes son sustancias y/o microorganismos cuya función, cuando se aplica a los cultivos o a la rizosfera, es estimular los procesos naturales para mejorar la absorción o la eficiencia de los nutrientes, la tolerancia al estrés abiótico y la calidad de los cultivos. Al ser productos agrícolas de origen natural son aptos para su uso en la agricultura convencional y ecológica. La investigación en combinaciones de bioestimulantes microbianos y no microbianos es muy escasa, es por ello que, el objetivo de nuestro trabajo es evaluar el efecto de un formulado de diferentes bioestimulantes botánicos junto con bacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos micorrízicos arbusculares en plantas de tomate variedad Microtom, en condiciones normales y bajo estrés salino. Se realizaron 12 tratamientos diferentes de los cuales se ensayaron 20 plantas por tratamiento. En total 240 plantas fueron evaluadas por ensayo. El efecto beneficioso de la combinación de bioestimulantes microbianos y no microbianos se evaluó mediante análisis de parámetros fisiológicos como la biomasa, y a nivel bioquímico mediante los osmolitos (prolina y azúcares totales), antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT, GR, APX) y no enzimáticos (flavonoides y fenoles totales).

**English:** Anthropogenic climate change is having an impact on climate variability. This is causing a higher frequency of extreme events such as long periods of high temperatures, drought and floods, which damage and reduce crop yield. Among all the factors limiting crop yield, high salinity and drought are considered two of the most important abiotic stresses. Searching for new alternatives to achieve more sustainable agriculture due to the loss of fertile soils is causing a growing interest in the use of biostimulants as an alternative to synthetic fertilizers. Biostimulants are substances and/or microorganisms whose function, when applied to crops or the rhizosphere, is to stimulate natural processes to improve nutrient absorption, nutrient efficiency, abiotic stress tolerance and crops quality. These agricultural products have a natural origin and are suitable for sustainable agriculture. Research on the use of combinations of microbial biostimulants and non-microbial biostimulants is scarce. The aim of this project is to evaluate the effect of a formulation of different botanical biostimulants along with plant growth-promoting bacteria or arbuscular mycorrhizal fungi in Microtom tomato variety, in normal conditions and under saline stress. 12 different treatments were carried out, of which 20 plants were tested per treatment. In total 240 plants were evaluated per test. The beneficial effect of the combination of microbial and non-microbial biostimulants was evaluated through the analysis of osmolytes (proline and total soluble sugars), enzymatic antioxidants (SOD, CAT, GR, APX) and non-enzymatic antioxidants (flavonoids and total phenols), ions, hormones, and primary metabolites analysis.

**Palabras clave/ Key words:** Bioestimulantes microbianos; bioestimulantes no microbianos; estrés salino; estrés abiótico; marcadores de estrés; tomate; enzimas antioxidantes; micorrizas; simbiosis micorrícico-arbuscular; PGPR / Microbial biostimulants; non-microbial biostimulants; salt stress; abiotic stress; stress markers; tomato; antioxidant enzymes; mycorrhizae; arbuscular mycorrhizal symbiosis; PGPR

Este trabajo está relacionado con los objetivos de desarrollo sostenible (ODS) 2, hambre cero, y con el objetivo 13, acción por el clima.

Alumno: Valeria Sánchez Bettini

Tutora: Dra. Rosa Porcel Roldán

Valencia, julio 2023

## II. Agradecimientos

A Rosa y Patricia, por darme la oportunidad de trabajar con ellas y dedicar su tiempo a este trabajo.

A mi familia, por el apoyo incondicional en todo lo que hago. Gracias por ofrecerme la oportunidad de estudiar esta carrera incluso lejos de casa.

A mi pareja, por ser mi gran apoyo emocional estos últimos años que han sido tan difíciles para mí.

No tengo suficientes palabras para mostrar lo agradecida que estoy con todos vosotros.

### III. Índice

1.	Introducción .....	1
1.1.	El estrés abiótico en las plantas: la problemática de la salinidad .....	1
1.2.	Efectos de la salinidad en plantas. El tomate .....	2
1.3.	Sistema de defensa en plantas .....	2
1.3.1.	Respuestas fisiológicas.....	3
1.3.2.	Respuestas bioquímicas.....	4
1.3.2.1.	Papel osmoprotector de azúcares y prolina .....	4
1.3.2.2.	Antioxidantes no enzimáticos: Fenoles y flavonoides .....	5
1.3.2.3.	Función de enzimas antioxidantes frente al estrés osmótico.....	5
1.4.	Uso de bioestimulantes como mecanismos naturales contra el estrés.....	6
1.4.1.	Bioestimulantes no microbiológicos .....	7
1.4.2.	Bioestimulantes microbiológicos .....	7
2.	Objetivos .....	8
3.	Materiales y métodos .....	8
3.1.	Material Vegetal.....	8
3.2.	Bioestimulantes microbianos y no microbianos.....	8
3.3.	Diseño experimental y condiciones de cultivo .....	9
3.3.1.	Diseño experimental.....	9
3.3.2.	Condiciones de cultivo .....	9
3.4.	Parámetros medidos .....	10
3.4.1.	Extracción y medida de pigmentos fotosintéticos .....	10
3.4.3.	Contenido hídrico relativo (CHR) y eficiencia del uso del agua.....	11
3.4.4.	Conductividad eléctrica foliar .....	11
3.4.5.	Obtención del extracto para la determinación de prolina, azúcares totales, fenoles y flavonoides. ....	12
3.4.6.	Determinación de azúcares totales (TSS).....	12
3.4.7.	Determinación de prolina .....	12
3.4.8.	Determinación de fenoles totales .....	13
3.4.9.	Determinación de flavonoides totales .....	13
3.4.10.	Extracción de actividades antioxidantes.....	13
3.4.11.	Determinación de daño oxidativo a lípidos (DOL) .....	14
3.4.12.	Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD).....	14
3.4.13.	Determinación de la actividad de ascorbato peroxidasa (APX) .....	14
3.4.14.	Determinación de catalasa (CAT) .....	15
3.4.15.	Determinación de glutatión reductasa (GR) .....	15

3.4.16.	Cuantificación de proteínas .....	15
3.5.	Análisis estadístico .....	15
4.	Resultados .....	16
4.1.	Producción y tamaño de planta .....	16
4.2.	Pigmentos fotosintéticos y rendimiento del fotosistema II .....	17
4.3.	Contenido hídrico relativo y eficiencia del uso del agua .....	18
4.4.	Conductividad eléctrica.....	20
4.5.	Osmolitos osmoprotectores .....	21
4.5.1.	Azúcares solubles totales (TSS).....	21
4.5.2.	Prolina .....	21
4.6.	Antioxidantes no enzimáticos .....	22
4.6.1.	Fenoles totales .....	22
4.6.2.	Flavonoides totales.....	23
4.6.3.	Daño oxidativo a lípidos (DOL).....	23
4.7.	Enzimas antioxidantes.....	24
5.	Discusión.....	25
6.	Conclusión .....	27
7.	Bibliografía .....	28

#### IV. Índice de figuras

Figura 1. Imagen de la distribución de las macetas en el invernadero .....	10
Figura 2. Producción total de fruto (tomate) .....	17
Figura 3. Tamaño de la parte aérea en plantas de tomate.....	17
Figura 4. Medida de la actividad fotosintética .....	18
Figura 5. Contenido relativo de agua (CHR) de hojas de plantas de tomate.....	19
Figura 6. Eficiencia en el uso del agua de hojas de plantas de tomate.....	20
Figura 7. Conductividad eléctrica en hojas de tomate.....	20
Figura 8. Acumulación de azúcares totales (TSS) en hojas de tomate.....	21
Figura 9. Producción de prolina en hoja de tomate .....	22
Figura 10. Concentración de fenoles totales en hoja de tomate .....	22
Figura 11. Cantidad de flavonoides totales en hoja.....	23
Figura 12. Daño oxidativo a lípidos en hoja de tomate.....	24
Figura 13. Actividades de las enzimas antioxidantes.....	25

## V. Abreviaturas

AEMET - Agencia Estatal de Meteorología

APX - Ascorbato peroxidasa

ATP - Adenosín trifosfato

BHT - Hidroxitolueno butilado

BS - Bioestimulante CalBio

BSA - Albúmina de suero bovino

CAT - Catalasa

CHR - Contenido hídrico relativo

CN - Control

EDTA – Etilendiaminotetraacetato de sodio.

FSII - Fotosistema II

GR - Glutación reductasa

GSH - L-glutación reducido

GSSG - L (-)-glutación oxidado

HMA - Hongo micorrícico arbuscular

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

MDA - Malondialdehido

NADPH - Nicotinamida -Adenina Dinucleótido Fosfato

NBT - Azul de nitro-tetrazolio

DOL - Daño oxidativo a lípidos

ODS - Objetivos de Desarrollo Sostenible

PF - Peso fresco

PGPB - Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

PK - Fosfato potásico

PS - Peso seco

PVPP - Polivinilpirrolidona

ROS - Especies reactivas del oxígeno

SOD - Superóxido dismutasa

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TCA - Ácido tricloroacético

TSS - Azúcares solubles totales

UFC - Unidades formadoras de colonias

# 1. Introducción

## 1.1. El estrés abiótico en las plantas: la problemática de la salinidad

La población mundial sigue aumentando exponencialmente, y con ello, la necesidad de una mayor producción de alimentos. Los recursos, como el agua y la tierra cultivable, son esenciales para asegurar la producción, pero cada vez son más escasos. Para evitar la subnutrición y la inseguridad alimentaria es necesario aplicar políticas y prácticas efectivas para aumentar la producción agrícola, manteniendo unas condiciones medioambientalmente sostenibles y eficientes.

Uno de los factores que actualmente está limitando la producción agrícola es el estrés abiótico. El estrés abiótico se define como el efecto negativo de factores sin vida sobre organismos vivos en un ambiente específico. Entre estos se incluyen la sequía, la salinidad, las temperaturas extremas y otros factores ambientales. Entre los factores abióticos perjudiciales destacan especialmente la elevada salinidad y sequía, los cuales son la causa primaria de la pérdida de los cultivos (Ben-Ari & Lavi, 2011). El estrés abiótico afecta al crecimiento, fotosíntesis, metabolismo de lípidos y carbohidratos, homeóstasis osmótica, síntesis de proteínas y expresión de genes.

Uno de los factores que limitan la producción agrícola es la salinización de los suelos. Las tierras de cultivo se consideran salinas cuando poseen una elevada concentración de sales como el sodio ( $\text{Na}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) (AEFA, 2023). Un suelo se considera salino cuando presenta una conductividad eléctrica superior 4,5 dS/m. Estas condiciones limitan la asimilación de los nutrientes por las plantas y la actividad microbiana del suelo, teniendo efectos negativos en el ecosistema, biodiversidad del suelo, producción agrícola y en la economía (FAO, 2023). Las causas de la salinidad en el suelo se pueden clasificar en primarias y secundarias. En el caso de las primeras, corresponde a causas naturales entre las que se incluyen a los materiales precursores salinos, el clima y el agua; mientras que las secundarias son producidas principalmente por el ser humano debido a la irrigación con aguas de alta conductividad eléctrica, aplicación de fertilizantes de forma inapropiada, manejo inadecuado del suelo y agua, entre otros factores (Christian *et al.*, 2021).

La salinización del suelo ya afecta al 20 % de las superficies cultivadas en el planeta. En España, se estima que el 3 % de los 3,5 millones de hectáreas de suelo irrigado están afectados de forma severa por la salinidad (Machado & Serralheiro, 2017). En terrenos semiáridos como el mediterráneo, debido a la escasez de agua, es necesario el uso de aguas de menor calidad como aquellas que proceden de acuíferos salinizados. La elevada concentración de sales produce deficiencia de agua y, desequilibrio iónico, lo que conlleva a la toxicidad iónica en los cultivos (Karaca *et al.*, 2023). La mayoría de los cultivos agrícolas son sensibles o moderadamente sensibles a la salinidad, reduciendo los rendimientos de las cosechas.

La elevada salinidad de los suelos lleva a la deshidratación celular, la cual, causa estrés osmótico por la reducción del contenido de agua citoplasmática, disminuyendo así el tamaño del citosol y las vacuolas. Este genera estreses iónico y osmótico, el cual altera muchos procesos metabólicos de las plantas (Ramakrishna & Ravishankar, 2011). Esto conlleva a que el estrés salino tenga efectos negativos en procesos esenciales de las plantas como la fotosíntesis, la síntesis de proteínas y el metabolismo primario. Bajo este estrés las plantas deben activar mecanismos fisiológicos y químicos para paliar las consecuencias causadas por el estrés, mecanismos que afectan a la morfología de las estructuras de la planta y a la producción de metabolitos como hormonas, azúcares, prolina, fenoles, entre otros (Kausar & Komatsu, 2023).

## 1.2. Efectos de la salinidad en plantas. El tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las solanáceas, originaria del centro y sur de América. Es una de las hortalizas más consumidas en el mundo por su sabor y su valor nutricional, ya que es una fuente de antioxidantes, fibra, minerales y vitaminas (Liu *et al.*, 2022). El fruto de esta planta puede cultivarse tanto en campo abierto, requiriendo un clima cálido y soleado, como en invernadero, donde su cultivo se puede desarrollar durante todo el año. Su corto ciclo de vida hace que sea un cultivo muy productivo y rentable para los agricultores. A lo largo de los años, se han realizado numerosos estudios sobre el tomate con el fin de mejorar la producción y su valor nutricional, además de para ajustarse a los gustos de los consumidores (Li *et al.*, 2020). La demanda de este aumenta cada año y con ello su cultivo, producción y comercio. La producción de esta hortaliza en España se encuentra en continuo aumento. Solo en el país, de las 401 mil hectáreas dedicadas al cultivo de hortalizas, 34 mil corresponden únicamente al cultivo de tomate (MAPA, 2021). En la campaña de 2021/2022 se exportaron 651 millones de kilos, principalmente a Alemania, Francia y Países Bajos (Hortoinfo, 2023).

Las pérdidas de producción de tomate pueden producirse por enfermedades y plagas o por condiciones climáticas desfavorables. La reducción en la producción de tomate, debido a la calidad del agua, puede ser de hasta un 40 % cuando la conductividad del suelo supera los 4,5 mS/cm (FAO, 2023). Esta disminución tendrá repercusiones principalmente económicas en el país, por lo que es necesario investigar maneras para paliar los efectos del estrés en las plantas y evitar así la pérdida de cosechas.

## 1.3. Sistema de defensa en plantas

Las plantas para sobrevivir en la naturaleza, en un ambiente cambiante y bajo el efecto del estrés abiótico, han desarrollado diversas estrategias de adaptación para paliar estos eventos. Las respuestas a un estrés varían según el genotipo, pero algunas reacciones son comunes entre las especies vegetales (Rosa *et al.*, 2009).

En general, el efecto de la salinidad se reporta en la germinación de la semilla y en el establecimiento, crecimiento y desarrollo de las plantas, alterando los procesos fisiológicos y bioquímicos normales. Lo primero que se observa es la inhibición del crecimiento debido a la inhibición de la síntesis de enzimas, proteínas y macromoléculas, así como de la fotosíntesis y respiración (Fahad Shah *et al.*, 2020). También produce un desequilibrio nutricional debido a la reducción del transporte de los nutrientes desde la raíz hasta el resto de los tejidos (Porcel *et al.*, 2012).

Cuando las plantas experimentan diferentes estreses abióticos como el estrés por salinidad se activan un conjunto complejo de vías de señalización. La respuesta al estrés salino se activa cuando se detecta un aumento en la concentración de  $\text{Na}^+$  en el suelo, que induce una alteración en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). La elevada salinidad finalmente provoca un estrés iónico y osmótico que lleva a las plantas a activar respuestas contra dicho estrés, ya sea, manteniendo el balance osmótico o iónico, produciendo fitohormonas como el ácido abscísico o regulando la dinámica del citoesqueleto y la pared celular. El efecto final es la reducción del crecimiento celular y activación del metabolismo para enfrentarse al estrés (S. Zhao *et al.*, 2021).

### 1.3.1. Respuestas fisiológicas

Los efectos de la salinidad en la respuesta fisiológica de las plantas varían en función de la especie vegetal y la concentración de la misma. Por ejemplo, una concentración de 50 mM de NaCl es suficiente para observar una reducción del tamaño y peso seco en tomate. Diferentes autores han demostrado que, a concentraciones de más 200 mM, las plantas de tomate dejan de crecer (Soltabayeva *et al.*, 2021). Una de las respuestas fisiológicas que producen las plantas ante estrés salino es el ajuste osmótico, el cual, permite a su vez regular la presión de turgencia, el contenido hídrico relativo, la conductividad estomática y ciertas funciones celulares.

Entre los parámetros fisiológicos que se ven afectados por el estrés salino se encuentra el contenido hídrico y la eficiencia del uso del agua. Por lo general, en condiciones de elevada salinidad en el suelo se dificulta la absorción de agua por parte de las raíces y aumenta la pérdida de agua. Esto finalmente lleva a un estrés hiperosmótico, desbalance nutricional y desorden fisiológico (Chandrasekaran *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2020). Las plantas estresadas sufren una reducción del contenido hídrico relativo debido al gradiente osmótico desfavorable del suelo. También se produce una pérdida de agua y la consecuente deshidratación provocando la reducción del crecimiento y desarrollo (S. Zhao *et al.*, 2021). Estas modificaciones en el contenido hídrico también afectan a la conductividad eléctrica foliar, ya que la baja absorción de agua por parte de las raíces y la elevada salinidad llevan a la acumulación de sales en los órganos de las plantas, indicativo del daño tisular por parte del estrés sufrido (Ji *et al.*, 2022).

#### 1.3.1.1. Consecuencias de la salinidad en la actividad fotosintética

Los pigmentos fotosintéticos son esenciales para la captura de energía lumínica y con ello, para la fotosíntesis. Entre los pigmentos fotosintéticos encontramos clorofilas a y b, y carotenoides. La clorofila a es el pigmento esencial para la fotosíntesis y se encarga de la absorción de la luz roja y azul del espectro visible. Además, es el encargado de transferir la energía lumínica a los fotosistemas I y II (Sayyad-Amin *et al.*, 2016). La clorofila b también se encarga de la absorción de la luz roja y azul, tiene un pico de absorción distinto al de la clorofila a. Este pigmento no solo permite ampliar el rango de absorción, sino que también protege a las plantas del daño producido por la luz. Por último, los carotenoides, además de absorber otras longitudes de ondas distintas a las clorofilas, se encargan de proteger a estas de los radicales libres producidos durante la fotosíntesis y de disipar el exceso de energía en forma de calor (Kuczynska *et al.*, 2015). Bajo condiciones de estrés salino, se ha descrito una reducción en la actividad de las enzimas encargadas de la síntesis de pigmentos fotosintéticos, cambios en la proporción de los pigmentos y daño oxidativo en los pigmentos y otras estructuras celulares. Concentraciones de sal de entre 50-250 mM son suficientes para reducir el contenido de clorofila en la mayoría de las plantas de cultivo (Soltabayeva *et al.*, 2021). La baja concentración de los pigmentos puede deberse a una baja absorción de  $Mg^{2+}$ , la destrucción de los complejos pigmento-proteína y la reducción de la síntesis *de novo* (Evelin *et al.*, 2019).

Por otro lado, el fotosistema II (PSII) es uno de los componentes más susceptibles de la maquinaria fotosintética durante el estrés abiótico. Este fotosistema es clave en la fotosíntesis, ya que se encarga de tomar la energía lumínica y de generar energía química para producir ATP y NADPH. La presencia de ROS, que se producen ante las condiciones de estrés, puede dañar el PSII, lo cual lleva a la inhibición fotosintética y de los sistemas de reparación del propio fotosistema (Sasi *et al.*, 2018). Esto es debido a que, mediante la absorción de energía solar, el PSII es el encargado de separar las moléculas de agua y liberar moléculas de oxígeno en los pasos iniciales de la cadena de transporte de electrones en la fotosíntesis. Estas reacciones llevan una

elevada producción de ROS, incluyendo peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilos, oxígeno monoatómico y anión superóxido, que pueden dañar la maquinaria fotosintética. La eficiencia del fotosistema se verá afectada por el estrés debido a que el daño producido por ROS no podrá ser reparado por el sistema específico (Gururani *et al.*, 2015).

### 1.3.2. Respuestas bioquímicas

El estrés salino es capaz de desencadenar mecanismos de adaptación y supervivencia de las plantas a nivel bioquímico. La acumulación de metabolitos como prolina, fenoles y azúcares tienen un papel importante a la hora de mantener un bajo potencial osmótico intracelular y prevenir los efectos negativos que pueda provocar la salinidad. También se activan los sistemas de defensa antioxidante y el ajuste en el metabolismo de lípidos (Deinlein *et al.*, 2014).

#### 1.3.2.1. Papel osmoprotector de azúcares y prolina

Los azúcares y la prolina se consideran los principales osmoprotectores cuya producción es inducida en las plantas en condiciones de estrés. Son osmolitos de bajo peso molecular y de carga neutra que tienen un papel importante en la protección y estabilización de las membranas y de las proteínas ante estas condiciones, y además de intervenir en los mecanismos de señalización (Roychoudhury & Tripathi, 2020).

Los azúcares actúan tanto de nutrientes como de moléculas reguladoras o de defensa en la fisiología de la planta (Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2010). Actúan como principal forma de transporte de energía y carbono desde los órganos fuente hasta los órganos sumidero. Además, son osmolitos solubles, regulados por el estrés abiótico ya que modifican su concentración o metabolismo dentro de la célula. Por otro lado, ante el estrés, tienden a acumularse principalmente en las hojas de las plantas, aunque no todos los azúcares tienen el mismo papel frente al estrés abiótico. En general, estos tienen un papel fundamental en el mantenimiento de la estructura celular, la capacidad fotosintética y la desintoxicación de ROS, además de que ayudan a ejercer ciertas respuestas fisiológicas como fortalecer la integridad de la membrana, armonizar la actividad enzimática antioxidante y cumplir con los requisitos de agua bajo tensiones abióticas (Roychoudhury & Tripathi, 2020). Frente al estrés, el metabolismo de estos azúcares es dinámico, pues se producen eventos de degradación y síntesis de manera simultánea. Los cambios en el contenido de azúcares solubles también afectan a la asimilación de CO<sub>2</sub>, el reparto fuente-sumidero, la actividad de enzimas y la expresión de genes específicos (Rosa *et al.*, 2009).

Por otro lado, la acumulación de prolina ante estreses abióticos es una respuesta común entre las plantas, aunque la cantidad depende de la especie. Los niveles de este metabolito son resultado de una combinación de biosíntesis, catabolismo y transporte (Wang *et al.*, 2015). Se trata un aminoácido con un papel importante ante condiciones de estrés salino, pues una de sus funciones es mantener el equilibrio osmótico de las células vegetales. Además, es capaz de regular la división y muerte celular, la actividad enzimática, así como la expresión de genes implicados en la respuesta a estrés (Deinlein *et al.*, 2014). También se ha visto su contribución en la lucha contra las ROS, estabilizar las estructuras celulares, modular la homeóstasis redox e interactuar con otros metabolitos bajo estrés (Wang *et al.*, 2015).

### 1.3.2.2. Antioxidantes no enzimáticos: Fenoles y flavonoides

Los factores externos afectan a procesos de crecimiento y desarrollo en las plantas que llevan a la síntesis de metabolitos secundarios, entre los que se incluyen los fenoles y flavonoides. Esta acumulación está relacionada con un incremento de actividad de enzimas como la fenilalanina amonio liasa y chalcona liasa (Mohammed *et al.*, 2023). Las vías de síntesis de estos compuestos se activan cuando la planta es expuesta a daño o estrés. Los fenoles y flavonoides, que se incluyen en el grupo de polifenoles, son moléculas que se acumulan ante condiciones de estrés y que están implicadas en los mecanismos de defensa en las plantas como un proceso de adaptación y supervivencia en respuesta a los distintos estímulos externos (Yang *et al.*, 2018). Poseen propiedades antioxidantes, pudiendo eliminar las ROS producidas ante estrés, tanto biótico como abiótico, y reduciendo el daño oxidativo. Además, interactúan con las enzimas y proteínas para proteger las estructuras celulares y minimizar los daños provocados por el estrés. Otro de los papeles fundamentales que desempeñan es la regulación de la expresión de genes implicados en la respuesta contra el estrés abiótico (Šamec *et al.*, 2021; Shomali *et al.*, 2022).

### 1.3.2.3. Función de enzimas antioxidantes frente al estrés osmótico

Un desbalance en la disponibilidad del agua en el suelo o en la concentración de solutos del medio lleva a un desequilibrio en el contenido hídrico de las células lo que puede desencadenar la producción de ROS. Las ROS como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radicales hidroxilos ( $OH^\cdot$ ) u oxígeno monoatómico producen daño en estructuras como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

El desequilibrio entre las ROS y los sistemas de defensa antioxidantes produce daño oxidativo en los lípidos. Especies, como el  $H_2O_2$  y los radicales libres, atacan a los lípidos de las membranas celulares produciendo la peroxidación lipídica, alterando la integridad, fluidez y permeabilidad de estas. La peroxidación de los lípidos insaturados produce malondialdehído (MDA), una molécula utilizada como indicadora del daño oxidativo de lípidos (Hampel *et al.*, 2016). Otra consecuencia de esta modificación de las membranas es la alteración de su función, afectando al transporte y permeabilidad de sustancias como el agua o los nutrientes. Estas modificaciones de las membranas afectan a la función celular, el metabolismo, así como la señalización y la respuesta a otros estímulos.

Las enzimas antioxidantes juegan un papel fundamental en la protección de las células vegetales contra el daño oxidativo provocado por la acumulación de ROS durante la exposición al estrés abiótico. Estas enzimas se encuentran en la primera línea de defensa ante las ROS y principalmente se encargan de neutralizarlas y prevenir el daño oxidativo. Entre estas enzimas encontramos la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión reductasa (GR) y la ascorbato peroxidasa (APX) (Mishra *et al.*, 2023). Su función principal es mantener el equilibrio redox, y su función se ve acentuada ante condiciones de estrés. La actividad SOD es la encargada de convertir el superóxido ( $O_2^\cdot$ ) en  $H_2O_2$  y  $O_2$  para poder así reducir el daño oxidativo. La CAT en cambio tiene como función descomponer el  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$ . Con ello evita la acumulación de peróxido en el interior celular. La enzima APX utiliza el ascorbato o vitamina C como donante de electrones para la reducción del peróxido en agua. En cambio, la GR se encarga de regenerar el glutatión reducido (GSH) a partir de glutatión oxidado (GSSG), necesario para mantener el sistema antioxidante durante el estrés (Rajput *et al.*, 2021; Jardim-Messeder *et al.*, 2022). De esta manera, estas enzimas son capaces de proteger las estructuras y la integridad celular.

En *S. lycopersicum* se ha observado que el estrés salino aumenta la actividad SOD, e incluso la actividad se ve incrementada conforme se aumenta la cantidad de salinidad a la que se expone la

planta, mientras que la actividad CAT se ve reducida. La actividad APX y GPX también sufren un incremento cuando existe estrés salino. La disminución en la actividad CAT, a pesar de ser una de las enzimas encargadas de eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, supone un aumento en el daño oxidativo que sufren las plantas de tomate en estas condiciones (Parvin *et al.*, 2019).

#### 1.4. Uso de bioestimulantes como mecanismos naturales contra el estrés

El interés por los bioestimulantes ha ido aumentando con los años, principalmente debido a las políticas agrícolas y ambientales, que tienen como propósito combatir el cambio climático y reducir el uso de pesticidas y compuestos químicos que dañan las tierras de cultivo. En el año 2022, el sector de los bioestimulantes vegetales recibió hasta un 3 % de inversión en Europa para la investigación y desarrollo (Pandey *et al.*, 2022).

Un bioestimulante es cualquier sustancia o microorganismo que se aplica a las plantas con el fin de mejorar la eficiencia nutricional, la tolerancia al estrés y/o la calidad del cultivo, independientemente de su contenido nutricional. A la vez, se pueden incluir como bioestimulantes a aquellos productos comerciales que contienen mezclas de dichas sustancias y/o microorganismos (du Jardin, 2015). Los bioestimulantes son compuestos naturales o combinaciones de estos, de origen orgánico o inorgánico. Son una solución sostenible a los problemas que pueden causar los estreses abióticos a las plantas. Su método de aplicación varía según si se encuentran en formato *spray*, granular o líquido y se pueden aplicar en hojas, raíces o en la tierra donde se encuentra la planta (Ma *et al.*, 2022).

Los bioestimulantes no microbianos incluyen las sustancias húmicas y fúlvicas, hidrolizados de proteínas y aminoácidos, y extractos de alga y botánicos, derivados de quitina y quitosano, y antitranspirantes (Kumari *et al.*, 2023). Estos han demostrado su capacidad de mejorar el crecimiento de raíces, tallos, así como la germinación de semillas (Benito *et al.*, 2023). En el caso de bioestimulantes microbianos, encontramos inoculantes microbianos como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Plant Growth Promoting Bacteria*, PGPB) y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) (Kumari *et al.*, 2023). La aplicación de este tipo de bioestimulantes generalmente mejora la eficiencia fotosintética y la retención de agua, la producción de enzimas clave y metabolitos con actividad similar a las hormonas, la promoción de transportadores de amonio, fosfato y nitrato, la acumulación de osmoprotectores y antioxidantes, y la modulación de la arquitectura de la raíz (Rouphael *et al.*, 2020).

Los bioestimulantes activan y regulan algunos mecanismos de defensa mediante distintas formas, pues son capaces de modular la actividad de las plantas a nivel fisiológico, bioquímico y anatómico (Bhupenchandra *et al.*, 2022). Los basados en aminoácidos pueden ser absorbidos por el tejido foliar y entrar en la célula directamente. Los hidrolizados de proteínas entran en las células mediante difusión a través de los poros de membrana. En el caso de bioestimulantes basados en microorganismos, las hifas de los hongos micorrízicos son capaces de penetrar en las células radicales y establecer simbiosis mutualista con la planta, y las bacterias rizosféricas son capaces de crear relaciones simbióticas con la planta mediante la formación de orgánulos como los nódulos fijadores de nitrógeno (Ma *et al.*, 2022). Los bioestimulantes son particularmente interesantes en los cultivos ecológicos, aunque los mejores resultados se observan en combinación con fertilizantes químicos. Hoy día, hay una amplia gama de bioestimulantes en el mercado, aunque no se han caracterizado todos sus efectos en el cultivo, ya que varían según el tipo de suelo, los factores medioambientales, la durabilidad del cultivo, el rango de aplicación, y la especie vegetal (Nephali *et al.*, 2020). A pesar de ello, todavía existe desconocimiento en el modo de acción molecular y celular de muchos de estos productos, lo que supone una limitación en el desarrollo de la industria de los bioestimulantes.

#### 1.4.1. Bioestimulantes no microbiológicos

Como se ha mencionado anteriormente, existen distintos tipos de bioestimulantes no microbianos, entre los que encontramos los extractos de alga, utilizados principalmente para mejorar la tolerancia al estrés abiótico en plantas. Esto es debido a que son capaces de actuar sobre las vías metabólicas centrales, también pueden involucrarse en la fotosíntesis, la activación de los sistemas de defensa y promocionar la eliminación de las ROS. En estrés salino, en concreto aumentan la cantidad de biomasa, promueve el metabolismo de carbohidratos y crecimiento, la fotosíntesis y la defensa antioxidante (Ma *et al.*, 2022).

Otras sustancias, como los hidrolizados de proteínas, mejoran la fotosíntesis y el sistema antioxidante. Algunos derivados de plantas regulan los niveles de expresión de la fenilalanina amonio liasa y promueven la producción de metabolitos implicados en la respuesta de defensa como flavonoides, terpenos, carbohidratos, esteroides y aminoácidos. En tomate, algunos de estos hidrolizados de origen vegetal pueden activar enzimas como la SOD o APX, enzimas antioxidantes, o estimular la síntesis de ácido salicílico, carotenoides y quinona para mejorar la tolerancia a las ROS (Ma *et al.*, 2022).

Las sustancias húmicas son un producto del metabolismo anaerobio de los microorganismos encargados de la descomposición de la materia orgánica. Se clasifican en ácido fúlvico, ácidos húmicos y *humins* dependiendo de su solubilidad y su acidez o alcalinidad. Son una mezcla compleja de compuestos orgánicos como azúcares, ácidos grasos y compuestos alifáticos y aromáticos. Las sustancias húmicas son los bioestimulantes más utilizados y efectivos contra el estrés tanto abiótico como biótico. Mejoran el crecimiento y la producción vegetal mediante la modulación de las características fisicoquímicas de la tierra de cultivo y la fisiología de la planta. Están implicados en el crecimiento, modulación de la síntesis de proteínas implicadas en la homeostasis redox y metabolismo energético (Bhupenchandra *et al.*, 2022).

#### 1.4.2. Bioestimulantes microbiológicos

Los bioestimulantes microbianos incluyen microorganismos beneficiosos como bacterias y hongos que colonizan las raíces y establecen relaciones con las plantas. Los beneficios que supone para estas las relaciones planta-microorganismo incluyen mejora en el desarrollo y producción, y el aumento en la disponibilidad y/o toma y asimilación de nutrientes incluso en condiciones de estrés abiótico (Hasanuzzaman *et al.*, 2021). Estos beneficios son posibles gracias a que participan en la regulación del metabolismo primario y secundario.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), incluyen rizobacterias, las cuales pueden tener la capacidad de colonizar la rizosfera, el rizoplano y/o la endosfera de la raíz. Entre los géneros más importantes de este grupo se encuentran *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Rhizobium*, *Streptomyces* y *Ochrotratum* (Y. Ma *et al.*, 2022). La inoculación de PGPB en plantas se ha demostrado que es una buena estrategia para estimular la producción agrícola y mejorar la resistencia al estrés abiótico. Esto ha permitido generar múltiples formulaciones de PGPB para la agricultura comercial con un bajo coste (Backer *et al.*, 2018).

Entre los hongos micorrícicos, los de mayor interés y los que más interactúan con plantas son los HMA (Fusco *et al.*, 2022). Este tipo de hongos beneficiosos son comúnmente utilizados como bioestimulantes microbianos. Entre ellos encontramos los géneros *Rhizophagus spp.*, *Septoglycus*

*viscosum*, *Claroideoglopus etunicatum* y *Claroideoglopus claroideum* (Ma *et al.*, 2022). Las asociaciones, planta-hongo micorrícico, mejoran la eficiencia nutricional, especialmente en el intercambio de fosfato, amonio, nitrato, calcio, zinc y hierro en condiciones de baja disponibilidad o deficiencia de estos nutrientes. Las hifas externas constituyen una red que consigue aumentar la superficie para la absorción de nutrientes y secreción de metabolitos orgánicos capaces de solubilizar nutrientes. Ante estrés abiótico, como por ejemplo sequía, actúan mejorando la captación de agua en la raíz (Porcel & Ruiz-Lozano, 2004).

## 2. Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es caracterizar a nivel fisiológico y bioquímico el efecto de la interacción de bioestimulantes, microbianos y no microbianos, en tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) bajo condiciones de estrés salino. Para ello, se han planteado los siguientes objetivos:

1. Evaluar la posible sinergia del bioestimulante CalBio, desarrollado en nuestro grupo de investigación, con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) en condiciones de estrés salino.
2. Cuantificar el mencionado efecto bioestimulante mediante medidas fisiológicas.
3. Cuantificar el mencionado efecto bioestimulante mediante medidas bioquímicas.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Material Vegetal

La especie vegetal seleccionada para realizar los ensayos fue tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom). Se trata de una variedad vegetal enana cuyo fin inicial era su utilización como planta ornamental. Sus características específicas, pequeño tamaño y ciclo de vida corto, así como el conocimiento de su genoma, hacen posible su utilización en este estudio (Li *et al.*, 2020).

### 3.2. Bioestimulantes microbianos y no microbianos

En los ensayos realizados en el presente estudio, se utilizaron tanto bioestimulantes microbianos como no microbianos, y la combinación de ambos tipos. El tratamiento con bioestimulante no microbiano estuvo compuesto por una combinación de cuatro extractos naturales (CalBio) obtenido de un trabajo anterior realizado en nuestro laboratorio (Benito *et al.*, 2022). Se utilizó una concentración de 50 µg/mL de cada uno de los cuatro compuestos que forman el formulado: extracto de levadura, extracto del alga *Ascophyllum nodosum*, extracto de raíz de regaliz y extracto de raíz de sauce. Como bioestimulantes microbianos se utilizaron una cepa de un hongo micorrícico arbuscular (HMA) y de una bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPB). En el caso de los HMA, se utilizó la muestra comercial RI6E6 proporcionada por la empresa Caldic Ibérica S.L.U (Barcelona), que contenía tierra, esporas, micelio y fragmentos de raíces infectadas. Por otro lado, como bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPB) se utilizó la muestra BM08 proporcionada por la empresa Caldic Ibérica S.L.U (Barcelona), que contenía la cepa

bacteriana liofilizada. El inóculo bacteriano consistió en una suspensión bacteriana a partir de material liofilizado a una concentración de  $1,8 \times 10^9$  UFC/mL.

### 3.3. Diseño experimental y condiciones de cultivo

#### 3.3.1. Diseño experimental

Para este trabajo, se realizaron un total de 6 tratamientos bajo dos condiciones: sin estrés y estrés salino (inducido mediante la aplicación de una solución de NaCl 100 mM). El experimento constó de un total de 20 plantas por tratamiento ( $n = 240$  plantas). Los tratamientos consistieron en (1) plantas control (C); (2) plantas tratadas con el formulado CalBio no microbiano (BS); (3) plantas tratadas con un bioestimulante microbiano basado en micorrizas arbusculares (HMA); (4) plantas tratadas con un bioestimulante microbiano basado en una cepa bacteriana promotora del crecimiento vegetal (PGPB); (5) plantas tratadas con la combinación de CalBio y la micorriza (BS+HMA); y (6) plantas tratadas con la combinación de CalBio y el producto bacteriano (BS+PGPB).

El tratamiento con bioestimulantes no microbianos se aplicó, una sola vez, a los 2 y 15 días después del trasplante. Se suministraron 10 mL de bioestimulante alrededor de la base del tallo de cada planta para garantizar su correcta disponibilidad por el sistema radicular.

El tratamiento con productos microbiológicos fue distinto dependiendo del organismo utilizado. Para la HMA se aplicaron 5 g de inóculo a cada maceta en el momento del trasplante con aproximadamente 600 propágulos infecciosos por gramo de producto. En el caso de los tratamientos con PGPB, a cada planta se inocularon 5 mL de la suspensión bacteriana ( $1,8 \times 10^9$  UFC/mL) en el base del tallo una semana después del trasplante.

El inicio de la aplicación del estrés salino se realizó un mes después del trasplante de las plántulas de tomate, para asegurar el correcto establecimiento de la simbiosis planta-microorganismo. Se añadieron 70 mL a cada maceta de una solución salina de 100 mM preparada con agua destilada. El riego con NaCl se fue incrementando gradualmente en 20 mM en días alternativos para evitar el choque osmótico hasta alcanzar la concentración de riego deseada de 100 mM. Esta concentración se alcanzó a los 10 días del inicio del tratamiento. Estas condiciones se mantuvieron hasta la finalización del ensayo. Las plantas controles, que no crecieron en condiciones de estrés salino, recibieron la misma cantidad, es decir, 70 mL de agua destilada. Los días en los cuales se realizó el tratamiento con estrés, se suspendió el riego habitual.

#### 3.3.2. Condiciones de cultivo

Los experimentos de invernadero se realizaron en el Centro de Experiencias Cajamar ubicado en Paiporta (Valencia) ( $39^{\circ}25'01''$  N,  $0^{\circ}25'04''$  W) entre los meses de junio y agosto de 2022. El invernadero donde se realizaron los experimentos era de malla donde las condiciones de luz, temperatura y humedad no fueron reguladas, sino que dependieron de las condiciones climáticas que se dieron durante el ensayo. La temperatura media fue de  $24^{\circ}\text{C}$ , con una humedad del 70 % y una precipitación media de  $9,7 \text{ L/m}^2$  según los datos climatológicos recogidos por la Agencia Estatal de Meteorología (AEMET, 2022).

Previamente a la preparación de semillero para la obtención de plántulas adecuadas para el ensayo, las semillas de tomate fueron esterilizadas en superficie con una solución diluida (1:1) de hipoclorito de sodio al 3 % durante 15 minutos y posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril cuatro veces. Los semilleros de tomate se prepararon en CUCALA AGRICOLA S.L. (38°56'42" N, 0°25'42" W) en alveolos de fibra de coco entre mayo y junio de 2022. El trasplante de los plantones, de un mes de edad y con un tamaño homogéneo, se realizó en junio de 2022 en una mezcla de sustrato pasteurizado comercial /arena lavada de río en proporción 2:1. El sustrato, conocido como *Terra Vagiota* fue proporcionado por la empresa Grupo Valagussa (Italia). Las macetas utilizadas tenían un volumen de 5 L y unas dimensiones de 20x20x25cm. Dichas macetas se colocaron con una separación mínima de 15 cm y en zigzag para evitar la inhibición de crecimiento por competencia y facilitar el riego (Figura 8).



Figura 1. Imagen de la distribución de las macetas en el invernadero

El riego se suministró diariamente, mediante goteo, durante todo el ciclo de crecimiento de las plantas. Durante todo el ensayo, salvo los días de aplicación del estrés, se suministró una solución nutritiva cuya composición fue la siguiente (en mM): 13 de  $\text{NO}_3^-$ , 0,3 de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , 3,24 de  $\text{SO}_4^{2-}$ , 1 de  $\text{HCO}_3^-$ , 4,8 de  $\text{Cl}^-$ , 1,6 de  $\text{NH}_4^+$ , 6,1 de  $\text{K}^+$ , 4,6 de  $\text{Ca}^{+2}$ , 2,8 de  $\text{Mg}^{+2}$  y 2,3 de  $\text{Na}^+$ . El valor de conductividad eléctrica era de 2,5 mS/cm y un pH de 6. La solución nutritiva fue preparada por la Fundación Cajamar con una concentración de 25 % de P para evitar la inhibición de la colonización de la raíz por parte de los hongos micorrícicos arbusculares.

La cosecha se llevó a cabo 45 días después del inicio de la aplicación del estrés salino, contando con una edad aproximada de cuatro meses desde el momento de la germinación. En el momento de la cosecha se recogieron muestras que fueron congeladas y almacenadas a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso.

### 3.4. Parámetros medidos

#### 3.4.1. Extracción y medida de pigmentos fotosintéticos

Para la extracción y medida de pigmentos fotosintéticos se utilizó el método de Lichtenthaler, (1987). Se tomó 100 mg de hoja congelada y se machacó con pistilo y nitrógeno líquido. A continuación, se añadieron 1,5 mL de metanol (100 %, v/v). Las muestras se agitaron 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron a 17700 g durante 5 minutos a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Se

recuperó el sobrenadante y se pasó a nuevos tubos. El extracto fue diluido 1:25 y utilizado para determinar el contenido de clorofila a, clorofila b, clorofilas totales y carotenoides midiendo la absorbancia en un lector de microplacas TECAN Infinite® 200 PRO a una longitud de onda de 665,2 nm, 652,4 nm y 470 nm. El pellet residual de material vegetal se secó en horno a 65 °C durante 4 días para la obtención del peso seco.

Los resultados se expresaron en µg de pigmento /g de peso seco.

### 3.4.2. Eficiencia del fotosistema II

La eficiencia del fotosistema II se midió con un fluorímetro HandyPEA (Hansatech, Pentney, Inglaterra) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se recogieron los datos relativos al ratio Fv/Fm, también conocido como el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (FSII). Con esto, se obtuvo la eficiencia de los centros de reacción del FSII que se encuentran abiertos. Previamente a la medida del rendimiento fotosintético, las hojas fueron expuestas a oscuridad durante 40 minutos colocando pinzas de exclusión de luz en la superficie del haz de la hoja evitando la vena central. Posteriormente, la fluorescencia máxima se midió tras la exposición de las hojas a un *flash* intenso de luz.

Los resultados se expresaron como fluorescencia variable/fluorescencia máxima (Fv/Fm).

### 3.4.3. Contenido hídrico relativo (CHR) y eficiencia del uso del agua

Para la obtención del contenido hídrico relativo y la eficiencia del uso del agua, se tomó un disco de hoja de 1 cm de diámetro y se pesó para la obtención del peso fresco. Tras ello, se pasó a una placa de Petri con papel de filtro humedecido y se incubó durante 24 horas a 4 °C. Trascurrido este tiempo, el disco se pesó de nuevo para obtener el peso de turgencia y posteriormente se llevó a secado en estufa a 65 °C durante 4 días para obtener el peso seco. El contenido hídrico relativo se obtuvo según la siguiente fórmula:

$$CHR (\%) = \frac{\text{peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{peso turgencia} - \text{peso seco}} \times 100$$

La eficiencia del uso de agua se obtuvo mediante el siguiente cálculo:

$$\text{Eficiencia uso del agua} = \frac{\text{peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{peso fresco}}$$

Los resultados de la eficiencia del uso de agua se expresaron en g de H<sub>2</sub>O/g de peso fresco.

### 3.4.4. Conductividad eléctrica foliar

La conductividad eléctrica es un parámetro que determina la facilidad con que una corriente eléctrica pasa a través del agua. En este caso, esta medida nos facilita datos sobre el posible daño celular que sufre la hoja tras la exposición al estrés. Cuanto más elevada sea la conductividad mayor será el daño celular. Se utilizó un disco de hoja de 1 cm de diámetro, que previamente fue pesado (peso fresco, PF) y posteriormente sumergido en 5 mL de agua destilada estéril durante 2

días. Se midió la conductividad eléctrica en el agua mediante un conductímetro de sobremesa BASIC-30 (CRISON®).

Los resultados se expresaron en  $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{mg}$  de PF.

#### 3.4.5. Obtención del extracto para la determinación de prolina, azúcares totales, fenoles y flavonoides.

Para obtener el extracto empleado en las determinaciones de azúcares totales, prolina, fenoles y flavonoides totales, se utilizó el método de Bligh & Dyer, (1959) modificado. Se tomaron 100 mg de peso fresco de hoja que, posteriormente, fue molida con pistilo utilizando nitrógeno líquido. Se añadieron 375  $\mu\text{L}$  de metanol grado HPLC y se homogeneizó durante 1 minuto con vórtex. Tras este tiempo, se repitió el paso anterior. A continuación, se añadió 750  $\mu\text{L}$  de cloroformo y se homogeneizó con vórtex durante 1 minuto. Seguidamente se añadieron 375  $\mu\text{L}$  de NaCl al 0,88 % (p/v) y se repitió el paso de homogeneización. Por último, las muestras se centrifugaron a 12300 g a una temperatura de 0 °C durante 10 minutos para la separación de las dos fases: la fase metanólica (fase superior) y la clorofórmica (fase inferior). La fase superior (fase metanólica) fue transferida a un nuevo tubo y todas las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

#### 3.4.6. Determinación de azúcares totales (TSS)

La determinación de azúcares se llevó a cabo siguiendo el protocolo planteado por Irigoyen *et al.*, (1992). En primer lugar, se preparó el reactivo de antrona añadiendo 0,2 g de antrona a 100 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 72 % (v/v). Para el análisis se hizo reaccionar 100  $\mu\text{L}$  de extracto (ver 3.4.1.) con 3 mL de reactivo de antrona. Tras hervir a 100 °C durante 10 minutos, se dejó enfriar en cama de hielo. Finalmente se midió la absorbancia en el lector de microplacas TECAN Infinite® 200 PRO a 620 nm en placas de 96 pocillos utilizándose como blanco el reactivo de antrona sin extracto. La curva patrón se hizo usando glucosa en un rango de 20 – 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Los resultados se expresaron en mg TSS/g de peso fresco.

#### 3.4.7. Determinación de prolina

La prolina se determinó según el protocolo descrito por Bates *et al.*, (1973). Se preparó el reactivo de ninhidrina de forma extemporánea con 20 mL ácido fosfórico 6 M, 30 mL de ácido acético glacial y 1,25 g de ninhidrina. Para cada muestra se fue adicionando de manera consecutiva 200  $\mu\text{L}$  de ácido acético, 100  $\mu\text{L}$  de metanol, 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de ninhidrina y 100  $\mu\text{L}$  de extracto. Los tubos se incubaron en un termobloque a 96 °C durante 1 hora. Posteriormente, se enfriaron en cama de hielo y se adicionó 1 mL de tolueno, se mezcló con vórtex y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Por último, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 520 nm usando tolueno como blanco.

La curva patrón se realizó utilizando concentraciones de 0-300  $\mu\text{M}$  de prolina partiendo de una solución madre de 1 mM.

Los resultados se obtuvieron en nmol de prolina/g peso fresco.

#### 3.4.8. Determinación de fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales, se utilizó el ensayo propuesto por Blainski *et al.*, (2013), optimizado para llevar a cabo la reacción y medición en microplaca. Para ello, se diluyeron 10  $\mu\text{L}$  de extracto en 140  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ. Después se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  del reactivo Folin-Ciocalteu y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Tras la incubación, se añadieron 35  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 15 % (p/v) y las muestras se incubaron en oscuridad durante 90 minutos. Posteriormente, se midió la absorbancia a 765 nm. Para determinar la concentración de polifenoles fue necesario realizar una curva patrón con ácido gálico en un rango de concentraciones de 0-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a partir de una solución stock al 0,2  $\text{mg}/\text{mL}$  (p/v).

El contenido de fenoles totales se expresó en mg de ácido gálico/g peso seco.

#### 3.4.9. Determinación de flavonoides totales

En la determinación de flavonoides se utilizó la metodología descrita por Zhishen *et al.*, (1999) optimizado para llevar a cabo la reacción y medición directamente en microplaca. Se adicionaron 60  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ a 80  $\mu\text{L}$  de muestra y, después se añadieron 8  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaNO}_2$  al 5 % (p/v) y se dejó reaccionar durante 5 minutos. Posteriormente, se adicionaron 8  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  al 10 % (p/v) y se incubó durante 6 minutos. Transcurrido este tiempo, se agregaron 60  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  1 M. Finalmente, se midió la absorbancia a 510 nm. Para la determinación de los flavonoides se realizó una curva patrón en concentraciones de 0-90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a partir de un stock catequina al 0,1  $\text{mg}/\text{mL}$  disuelto en metanol.

El contenido de flavonoides se expresó como mg de catequina/g peso seco.

#### 3.4.10. Extracción de actividades antioxidantes

El extracto necesario para la medición de enzimas antioxidantes se basó en el protocolo descrito por Gogorcena *et al.*, (1995). Para ello, se usó tampón de fosfato de potasio (PK) 50 mM a pH 7,8, que contenía EDTA 0,1 mM y polivinilpirrolidona insoluble (PVPP) 1 % (p/v). Para la obtención del extracto, se partió de 300 mg de material vegetal congelado y se homogeneizó mediante el uso de pistilo con nitrógeno líquido. A cada muestra fueron adicionados 3 mL de tampón PK antes descrito (con EDTA y PVPP) y, posteriormente, se homogeneizó con vórtex durante 1 minuto y se incubaron en hielo previa a la centrifugación. Las muestras se centrifugaron a 4420 g durante 20 min a 4 °C.

El sobrenadante resultante de cada muestra se dividió según el análisis posterior a realizar. A los sobrenadantes destinados a la medición de ascorbato peroxidasa (APX) se le adicionó ácido ascórbico 4 mM, mientras que los sobrenadantes destinados a glutatión reductasa (GR) se les fue añadido  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM. La fracción de sobrenadante destinada a la medición de daño oxidativo a lípidos (DOL), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y cuantificación de

proteínas no fue necesario añadir ningún reactivo adicional. Todas las muestras se conservaron a -20 °C hasta su uso.

#### 3.4.11. Determinación de daño oxidativo a lípidos (DOL)

Para la determinación el daño oxidativo a lípidos debido a la exposición a estrés salino, se preparó, de forma extemporánea, un reactivo con ácido tricloroacético (TCA) al 20 % (p/v), ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,5 % (p/v) y HCl 0,25 N. Por último, se añadió hidroxitolueno butilado (BHT) al 0,01 % (p/v). A 100 µL de extracto (ver 1.5.1), se añadió 1 mL del reactivo y se mezcló con vórtex. Las muestras se incubaron a 95 °C durante 30 minutos. Trascurrido este tiempo, se enfriaron en cama de hielo y se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos. Por último, se midió la absorbancia a 535 nm en placas de 96 pocillos.

Los resultados se expresaron en nmol malondialdehído (MDA)/g peso fresco.

#### 3.4.12. Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD)

La determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1) se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Beyer & Fridovich, (1987), basado en la capacidad del SOD de inhibir la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) por los radicales superóxidos generados fotoquímicamente. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima requerido para inhibir la reducción del NBT un 50 % a 25 °C. El reactivo utilizado estaba compuesto por tampón PK 50 mM pH 7,8 al que se le adicionó NBT 65 µM, metionina 13,32 µM y riboflavina 1,33 µM. La preparación se protegió de la luz para evitar posibles reacciones por exposición lumínica. Para esta determinación se utilizaron 2 placas multipocillo: a ambas se le añadió 200 µL de tampón PK 50 mM pH 7,8 con NBT, metionina y riboflavina, y 5 µL de extracto de actividades antioxidantes. Una de las placas se iluminó con luz directa (muestra problema) durante 30 minutos hasta que el reactivo sin extracto tomó coloración morada, mientras que la otra placa se mantuvo en oscuridad (blanco). La absorbancia se midió a 560 nm.

La actividad del superóxido dismutasa se expresó como unidades de SOD/min mg proteína.

#### 3.4.13. Determinación de la actividad de ascorbato peroxidasa (APX)

La determinación de la actividad ascorbato peroxidasa (APX) (EC 1.11.1.11) se realizó siguiendo el protocolo descrito por Nakano & Asada, (1981). Este método está basado en la oxidación del ácido ascórbico, cuya disminución va asociada a una caída de la absorbancia a 290 nm. Se preparó el tampón PK 50 mM a pH 7 al que se le adicionó ácido ascórbico 0,5 mM y EDTA 0,1 mM. Para la lectura en microplaca se utilizaron dos placas, donde el blanco contuvo 195 µL de tampón PK con ascórbico y EDTA junto con 5 µL de extracto. En el caso de las muestras, se adicionaron 175 µL del mismo tampón, 5 µL de extracto y 20 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12 mM. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se añadió a la reacción justo antes de la medición. La lectura de las placas se realizó a 290 nm en intervalos de 30 segundos durante 3 minutos.

Los resultados se expresaron en µmol APX/min mg proteína.

#### 3.4.14. Determinación de catalasa (CAT)

La actividad catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6) se midió mediante la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub> (Aebi, 1984). Para la lectura de las muestras, se adicionaron 2 µL de extracto de actividades antioxidantes junto con 200 µL de tampón PK 50 mM a pH 7 y, justo antes de la lectura, se adicionó 10,6 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM. En cuanto a los blancos, se añadieron únicamente 200 µL de tampón pK 50mM pH 7 sin adicionar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ni muestra. La medición se realizó en intervalos de 30 segundos durante 3 minutos a 240 nm.

Los resultados se expresaron en µmol CAT/min mg proteína.

#### 3.4.15. Determinación de glutatión reductasa (GR)

Para la determinación de glutatión reductasa (GR) (EC 1.8.1.7), se siguió el ensayo propuesto por Foyer & Halliwell, (1976), en el que se determina la actividad por la caída de la absorbancia a 340 nm al ser oxidado el NADPH. En primer lugar, se preparó un tampón HEPES 0,1 M pH 7,8 al que se le añadió EDTA 1 mM y MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 3 mM. A partir de este tampón, se dividió en dos volúmenes iguales. En uno de ellos se le adicionó 0,5 mM de glutatión disulfuro (GSSG) y en otro no se le añadió ningún sustrato. Para la determinación de la enzima GR, se utilizaron dos microplacas. Una de ellas (blanco) contenía 240 µL de tampón sin GSSG, 50 µL de extracto y 10 µL de NADPH 4 mM, mientras que a la otra placa (problema) se le añadió 250 µL de tampón con GSSG, 50 µL de extracto y 10 µL de NADPH 4 mM. En todos los casos, el NADPH se adicionó justo antes de la medición debido a que la actividad enzimática se determina midiendo la oxidación de este compuesto en una cinética de 3 minutos a intervalos de 30 segundos.

Los resultados se expresaron en µmol GR/min mg proteína.

#### 3.4.16. Cuantificación de proteínas

Todas las actividades antioxidantes (SOD, APX, GR y CAT) se normalizaron según la cantidad de proteína presente en la muestra. Para la cuantificación de proteínas se llevó a cabo la reacción de Bradford (Bradford, 1976), la cual, se optimizó para microplaca. La mezcla de reacción contenía 4 µL de muestra junto con 156 µL de H<sub>2</sub>O MilliQ y 40 µL de reactivo de Bradford. En cuanto a la curva patrón, se tomó un stock de albúmina de suero bovino (BSA) (0,1 mg/mL (p/v)) y se prepararon concentraciones de 0-20 µg/mL. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm.

La concentración de proteínas se obtuvo en mg proteína/g de peso fresco.

### 3.5. Análisis estadístico

La prueba de t-Student se realizó utilizando el software R. Estas pruebas se calcularon con respecto al aumento o disminución de la muestra en comparación con el control. Las medias se

consideran significativamente diferentes a  $p < 0,05$ . En todas las determinaciones se realizaron tres réplicas técnicas y tres biológicas.

## 4. Resultados

Durante el presente trabajo, se sometió a plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) a condiciones normales y de estrés salino (NaCl 100 mM). Con el objetivo de comprobar el efecto bioestimulante de diferentes productos y la respuesta de las plantas a estos productos, se aplicaron diversos tratamientos evaluando individualmente cada producto y las combinaciones entre ellos. Los tratamientos fueron: control sin tratamiento (CN), bioestimulante CalBio (BS), hongos micorrícicos arbusculares (HMA), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), bioestimulante CalBio en combinación con hongos micorrícicos arbusculares (BS+HMA), y bioestimulante CalBio junto con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). Para ver el efecto de los tratamientos se analizó la producción de fruto, tamaño de la planta, así como su peso húmedo y seco. También se realizó un análisis de la eficiencia fotosintética, de metabolitos como azúcares totales, prolina, fenoles y flavonoides totales, y de actividades enzimáticas de CAT, SOD, APX y GR, y el daño oxidativo a lípidos.

### 4.1. Producción y tamaño de planta

Algunos de los efectos, a nivel fisiológico, del estrés salino es la reducción en tamaño y peso de la planta, así como en la producción de fruto. En el momento de la cosecha, se midieron tamaño y peso de la parte aérea de la planta. La recolección de tomates se realizó durante 4 semanas y se determinó la producción total (Figura 2) por el total de plantas ensayadas (20 plantas por tratamiento). Se observó que el tratamiento bioestimulante CalBio junto con PGPB (BS+PGPB) era el que mayor producción de fruto mostró tanto en condiciones control como de estrés (Figura 2).

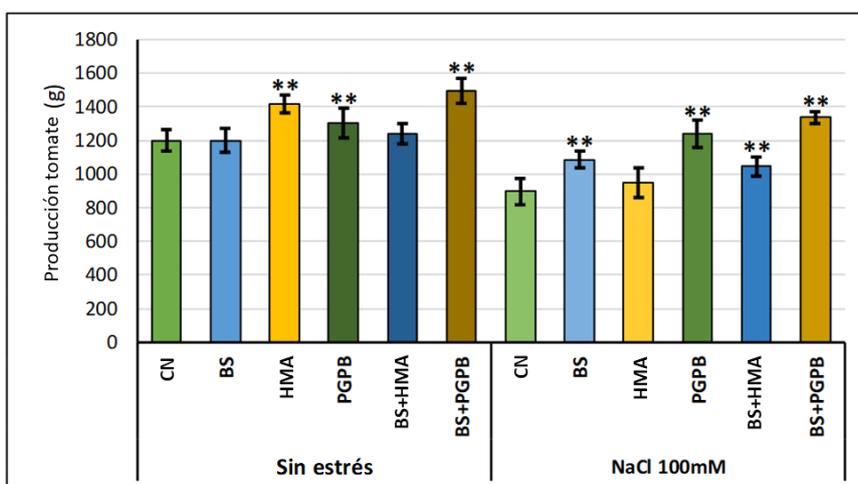


Figura 2. Producción total de fruto (tomate) tras el tratamiento radicular de bioestimulantes microbianos y no microbianos, y la combinación de ambos, bajo condiciones normales y de estrés salino (n=20). Tratamientos: muestras control sin tratamiento (CN), bioestimulante CalBio (BS), hongos micorrícicos arbusculares (HMA), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), CalBio con hongos micorrícicos arbusculares (BS+HMA) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). El eje X representa los distritos tratamientos y condiciones ensayadas, mientras que el eje Y la producción de tomate en gramos (g). Las barras representan el error estándar. \*\* p < 0,01 representan la significancia según las pruebas de Student del tratamiento con respecto al control.

En cuanto a la altura de la planta, se observó un aumento en aquellas plantas tratadas con BS y HMA en condiciones normales. En cambio, ante el estrés abiótico generado por la salinidad, todas las plantas a las que se aplicó tratamiento aumentaron su altura significativamente, sobre todo en el caso de los tratamientos BS y BS+PGPB (Figura 3).

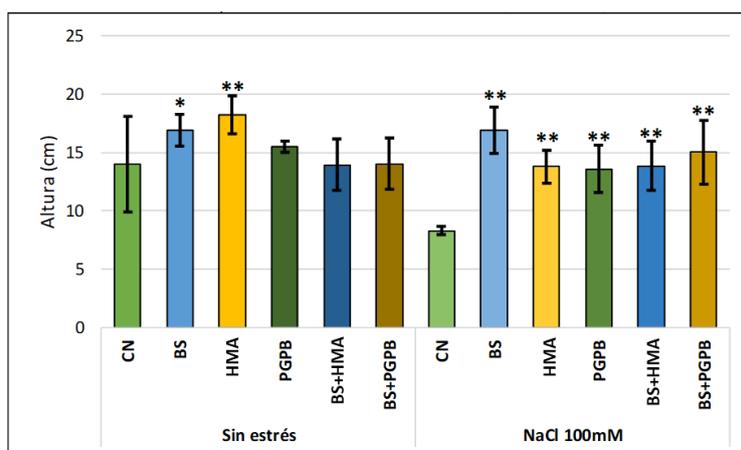


Figura 3. Altura de la parte aérea en plantas de tomate tras el tratamiento radicular de bioestimulantes microbianos y no microbianos, y la combinación de ambos, bajo condiciones normales y de estrés salino (n=20). Tratamientos: muestras control sin tratamiento (CN), bioestimulante CalBio (BS), hongos micorrícicos arbusculares (HMA), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), CalBio con hongos micorrícicos arbusculares (BS+HMA) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). El eje X representa los distritos tratamientos y condiciones ensayados, y el eje Y representa la altura en centímetros (cm). Las barras representan un error estándar \* p < 0,05 y \*\* p < 0,01 según las pruebas de Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra de control.

#### 4.2. Pigmentos fotosintéticos y rendimiento del fotosistema II

Uno de los efectos del estrés salino en plantas es la reducción de la síntesis de los pigmentos fotosintéticos, entre los que se incluyen clorofilas a y b, y carotenoides. En este caso, en condiciones normales (sin estrés), se observó una mayor producción de clorofila a en plantas tratadas con BS+HMA y BS+PGPB con respecto al resto de tratamientos evaluados (Figura 4A). En las mismas condiciones, la cantidad de clorofila b aumentó de nuevo con BS+HMA y BS+PGPB, mientras que se produjo una reducción de la misma en el resto de los tratamientos, incluso más baja que en el control (Figura 4B). En el contenido de carotenoides para estas condiciones, el comportamiento fue similar: aumentó en aquellas tratadas con BS+HMA y BS+PGPB, sin embargo, en el resto de los tratamientos disminuyó (Figura 4C).

En condiciones de estrés salino, la producción de los pigmentos fotosintéticos también se vio afectada siendo muy similar el resultado entre los distintos pigmentos. En cuanto a clorofila a se dio una reducción significativa con respecto al control en aquellas a las que se les aplicó

BS+HMA y BS+PGPB (Figura 4A). Este mismo comportamiento se observó en clorofila b y carotenoides, siendo la producción de estos pigmentos significativamente menor en aquellas inoculadas con BS+HMA y BS+PGPB (Figura 4B y C).

Otra de las determinaciones que se llevó a cabo fue el rendimiento del fotosistema II (FSII) para observar el efecto del estrés salino y de los distintos bioestimulantes aplicados. El FSII es una de las estructuras más sensibles al estrés, por lo que el rendimiento de este fotosistema es un buen indicativo de los efectos dañinos del estrés sobre la fotosíntesis. En el caso de condiciones no estresantes, el rendimiento se vio aumentado significativamente en aquellas plantas a las que se les aplicó el bioestimulante no microbiano (BS), mientras que el resto de los tratamientos no tuvieron un efecto significativo en el rendimiento. En el caso de la exposición a salinidad, el tratamiento más relevante fue HMA, el cual, presentaba un rendimiento superior, no solo al control sino al resto de tratamientos. Hay que destacar que, aunque los resultados no eran significativos, el resto de los tratamientos en salinidad presentaban rendimientos superiores que el control (Figura 4D).

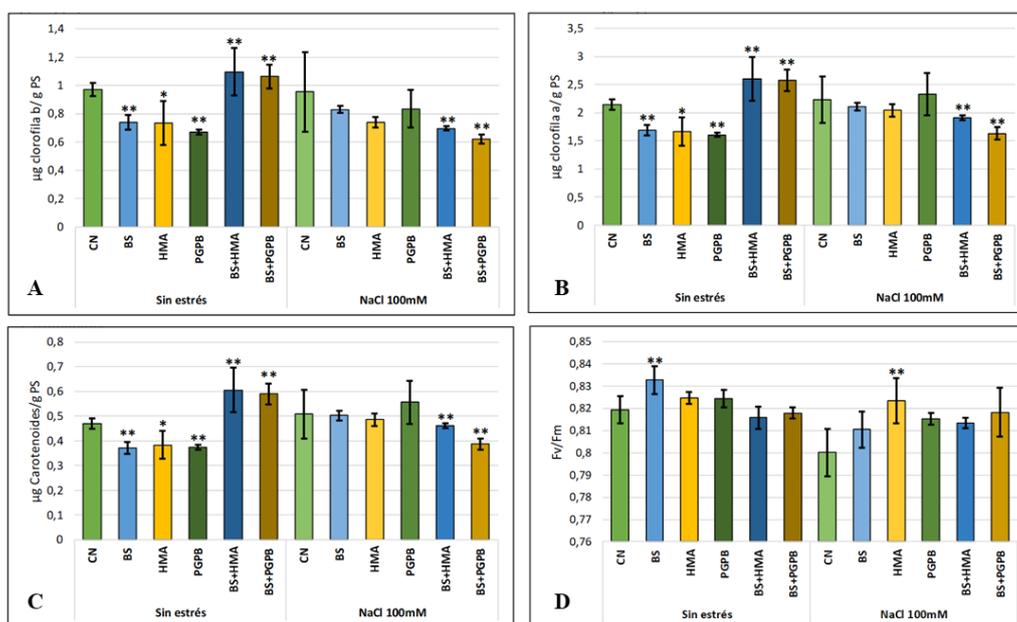


Figura 4. Medida de la actividad fotosintética en plantas de tomate tras el tratamiento radicular de bioestimulantes microbianos y no microbianos, y la combinación de ambos, bajo condiciones normales y de estrés salino (NaCl 100mM) (n=20): (A) Contenido de clorofila a (B) contenido de clorofila b, (C) contenido de carotenoides y (D) rendimiento fotosintético. El eje X indica los diferentes tratamientos realizados: muestras control sin tratamiento (CN), bioestimulante CalBio (BS), hongos micorrícicos arbusculares (AMF), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), CalBio con hongos micorrícicos arbusculares (BS+AMF) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). El eje X representa los tratamientos y condiciones ensayadas, mientras que el eje Y representa (A, B, C) µg de pigmento fotosintético por gramo de peso seco (PS) y (D) el índice de producción de clorofila a (Fv/Fm) se muestra como una proporción de fluorescencia variable (Fv) sobre el valor máximo de fluorescencia (Fm)). Las barras representan el error estándar. \* p < 0,05 y \*\* p < 0,01 representan la significancia según las pruebas de Student del tratamiento con respecto al control.

#### 4.3. Contenido hídrico relativo y eficiencia del uso del agua

El contenido hídrico relativo (CHR) es un parámetro comúnmente utilizado para estudiar la tolerancia al estrés en las plantas, pues informa sobre el contenido de agua presente en el tejido con respecto al estado de hidratación óptimo. En este estudio, de las plantas que se cultivaron en

condiciones sin estrés, aquellas que fueron tratadas con BS, BS+HMA y BS+PGPB presentaron un CHR superior al resto de tratamiento. Sin embargo, en el caso de aquellas plantas que se trataron con HMA, el contenido hídrico se redujo con respecto al control. Aquellas plantas que estuvieron expuestas a estrés salino y fueron tratadas con BS, redujeron significativamente su contenido hídrico relativo. Por el contrario, las plantas a las que se aplicó los tratamientos HMA y BS+PGPB experimentaron un aumento del mismo (Figura 5).

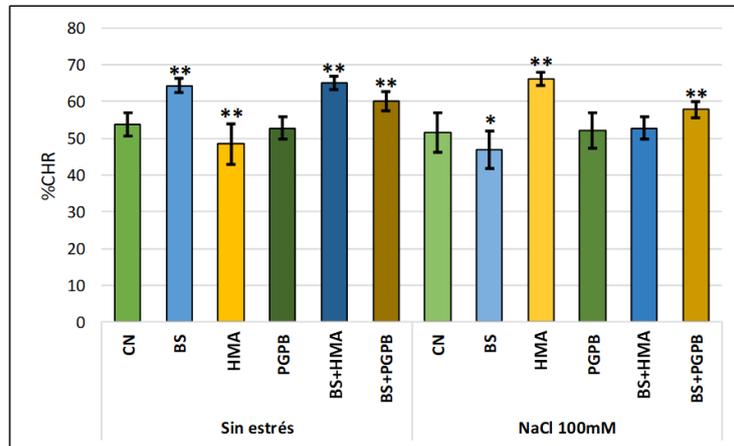


Figura 5. Contenido relativo de agua (CHR) en hoja de tomate tras el tratamiento radicular de bioestimulantes microbianos y no microbianos, y la combinación de ambos, bajo condiciones normales y de estrés salino (n=20). En la gráfica quedan representados los distintos tratamientos: control (CN), bioestimulante (BS), hongos micorrícicos arbusculares (HMA), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), bioestimulante con hongos micorrícicos arbusculares (BS+HMA) y bioestimulante con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB) en ambas condiciones. El eje X los distintos tratamientos y condiciones, y el eje Y representa el porcentaje de contenido hídrico relativo (CHR). Las barras representan un error estándar. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$  según las pruebas de Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra de control.

La eficiencia del uso del agua es otro de los factores que se utiliza para evaluar el estado de hidratación de las plantas, similar al CHR. En este caso, se observó que, en plantas cultivadas en condiciones sin estrés, la eficiencia aumentó en aquellas tratadas con BS, BS+HMA y BS+PGPB. Sin embargo, en estas mismas condiciones, se observó una reducción significativa de este parámetro en las plantas a las que se inoculó únicamente PGPB. Bajo estrés salino, se produjo un aumento significativo de la eficiencia en aquellas plantas que fueron tratadas con HMA, PGPB, BS+HMA, BS+PGPB, sin embargo, las plantas a las que se les aplicó únicamente BS no sufrieron ningún cambio significativo en este aspecto (Figura 6).

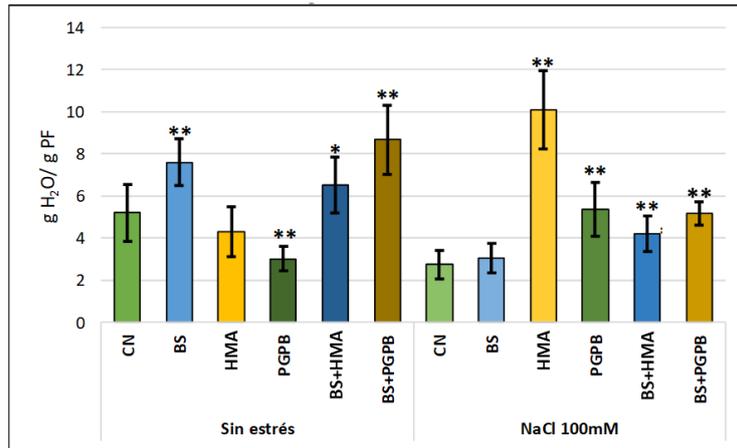


Figura 6. Eficiencia en el uso del agua de hojas de plantas de tomate, tras el tratamiento radicular de bioestimulantes microbianos y no microbianos, y la combinación de ambos, bajo condiciones normales y de estrés salino (n=20). En la gráfica quedan representados los distintos tratamientos: control (CN), bioestimulante (BS), hongos micorrícicos arbusculares (HMA), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), bioestimulante con hongos micorrícicos arbusculares (BS+HMA) y bioestimulante con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB) en ambas condiciones. El eje X representa los distintos tratamientos y condiciones mientras que, el eje Y representa la turgencia en g de agua por gramo de peso fresco. Las barras representan el error estándar. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$  según las pruebas de Student para el tratamiento en comparación con la muestra de control.

#### 4.4. Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica ofrece una idea del daño celular en las hojas debido a la exposición al estrés salino. En condiciones sin estrés, la conductividad se vio notablemente disminuida en las plantas tratadas con cualquiera de los tratamientos. Un comportamiento similar se observó en las plantas que se expusieron a estrés salino: la aplicación de los tratamientos produjo una reducción de la conductividad eléctrica en todas las plantas independientemente del tratamiento y condiciones (Figura 7). Destacó el tratamiento BS debido al mostrar una menor conductividad eléctrica con respecto al resto de tratamientos.

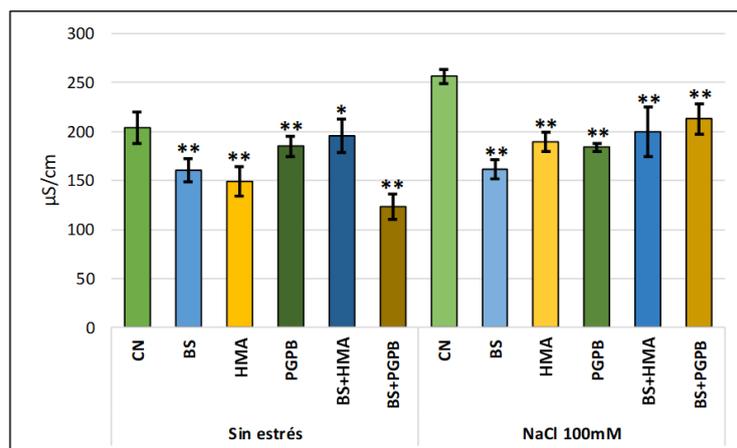


Figura 7. Conductividad eléctrica en hojas de tomate, tras el tratamiento radicular de bioestimulantes microbianos y no microbianos, y la combinación de ambos, bajo condiciones normales y de estrés salino (n=20). En la gráfica quedan representados los distintos tratamientos: control (CN), bioestimulante (BS), hongos micorrícicos arbusculares (HMA), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), bioestimulante con hongos micorrícicos arbusculares (BS+HMA) y bioestimulante con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB) en ambas condiciones. El eje X representa las muestras y condiciones ensayadas, mientras que el eje Y representa conductividad eléctrica en microsiemens (µS) por centímetro (cm) de hoja. Las barras representan un error estándar. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$  según las pruebas de Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra de control.

## 4.5. Análisis de Osmolitos

### 4.5.1. Azúcares solubles totales (TSS)

A nivel bioquímico, un indicador de estrés es la acumulación de azúcares que, aparte de utilizarse como moléculas de energía, también son necesarios para otros procesos como la asimilación de CO<sub>2</sub> o la expresión de ciertos genes, así como su uso por la planta como soluto protector de las tensiones osmóticas. En cuanto a los azúcares totales analizados en hoja, la mayor acumulación se obtuvo en las plantas tratadas con BS+HMA y PGPB bajo condiciones no estresantes, aunque se observaron diferencias significativas con respecto al control también en los tratamientos con HMA y BS+PGPB. En el caso de las plantas que se expusieron a condiciones de estrés salino, una mayor producción de azúcares totales se observó en aquellas plantas que fueron tratadas con HMA, PGPB y BS+HMA (Figura 8).

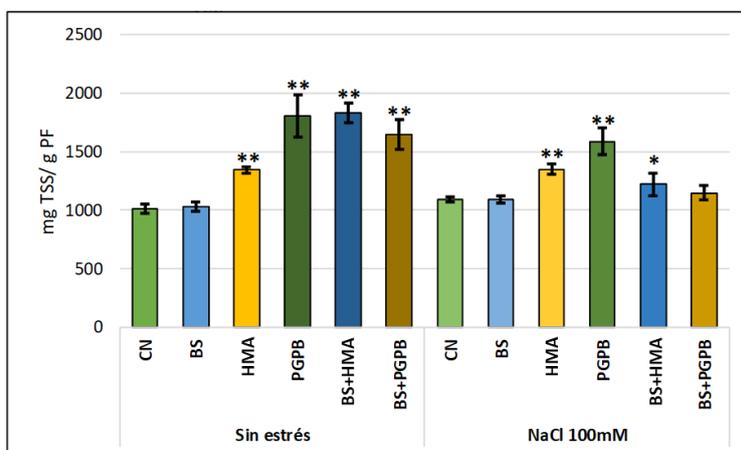


Figura 8. Acumulación de azúcares totales (TSS) en hojas de tomate, por el total de unidades experimentales ensayadas (20 plantas por tratamiento), tras el tratamiento radicular de bioestimulantes microbianos y no microbianos, y la combinación de ambos, bajo condiciones normales y de estrés salino. El eje X representa los distintos tratamientos y condiciones: control (CN), bioestimulante (BS), hongos micorrícicos arbusculares (HMA), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), bioestimulante con hongos micorrícicos arbusculares (BS+HMA) y bioestimulante con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). El eje Y representa los mg de azúcares totales por g de peso fresco. Las barras representan un error estándar. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$  según las pruebas de Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra de control.

### 4.5.2. Prolina

Otro de los mecanismos de resistencia de las plantas para combatir el estrés abiótico es aumentar la producción de prolina, un aminoácido que aumenta su concentración en la planta en condiciones de estrés abiótico. En condiciones sin estrés, el análisis de la prolina en los diferentes tratamientos permitió observar una mayor producción estadísticamente significativa en aquellas plantas tratadas con HMA. Esta concentración fue notablemente superior al resto de tratamientos, pues se observó una reducción en la producción de la misma en aquellas que se trataron con BS, PGPB y BS+PGPB. Bajo condiciones de estrés salino, un aumento en la producción de prolina se observó en aquellas a las que se les aplicó BS, BS+HMA y BS+PGPB, mientras que, a las que se les inoculó PGPB mostraron una reducción significativa del aminoácido (Figura 9).

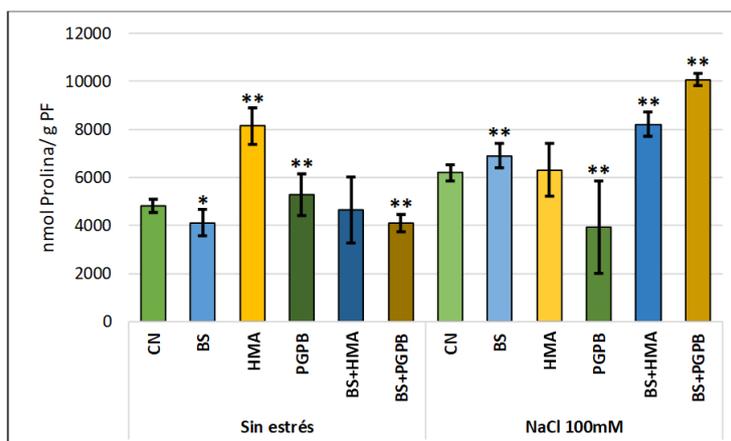


Figura 9. Producción de prolina en hoja de tomate en nanomoles (nmol) de prolina por gramo (g) de peso fresco, tras el tratamiento radicular de bioestimulantes microbianos y no microbianos, y la combinación de ambos, bajo condiciones normales y de estrés salino (n=20) El eje X representa las muestras y condiciones: control (CN), bioestimulante (BS), hongos micorrícicos arbusculares (HMA), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), bioestimulante con hongos micorrícicos arbusculares (BS+HMA) y bioestimulante con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB) en ambas condiciones. El eje Y muestra los nmoles de prolina por g de peso fresco mientras. Las barras representan el error estándar. \* p < 0,05 y \*\* p < 0,01 según las pruebas de Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra de control.

## 4.6. Antioxidantes no enzimáticos

### 4.6.1. Fenoles totales

Se determinó la acumulación de antioxidantes no enzimáticos durante la exposición al estrés abiótico, como los flavonoides y fenoles totales. Estos son productos del metabolismo secundario sintetizados como respuesta a los cambios que se producen en el entorno. En cuanto al análisis de fenoles totales en hoja de tomate de plantas sin estrés, se observó un cambio significativo en aquellas plantas tratadas con PGPB, BS+PGPB, y especialmente en BS+HMA. Sin embargo, en las plantas expuestas a estrés salino, se produjo una reducción notable de los fenoles totales en todos los tratamientos aplicados (Figura 10). Las plantas tratadas solamente con BS fueron los que menos concentración de fenoles mostraron.

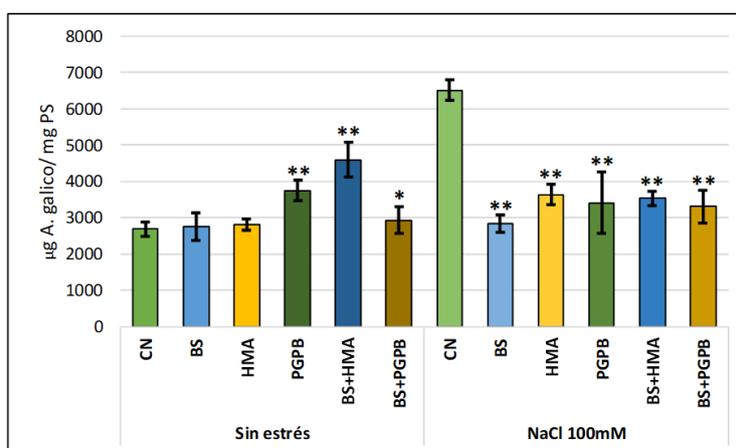


Figura 10. Concentración de fenoles totales en hoja de tomate medidos en microgramos (µg) de ácido gálico por miligramos (mg) de peso seco por el total de unidades experimentales ensayadas (20 plantas por tratamiento) tras el tratamiento radicular de bioestimulantes microbianos y no microbianos, y la combinación de ambos, bajo condiciones normales y de estrés salino. En la gráfica quedan representados los distintos tratamientos: control (CN), bioestimulante

(BS), hongos micorrícicos arbusculares (HMA), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), bioestimulante con hongos micorrícicos arbusculares (BS+HMA) y bioestimulante con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB) en ambas condiciones. El eje X representa las distintas condiciones y tratamientos. El eje Y representa la cantidad de fenoles totales en  $\mu\text{g}$  de ácido gálico por cada  $\text{mg}$  de peso seco. Las barras representan un error estándar. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$  según las pruebas de Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra de control.

#### 4.6.2. Flavonoides totales

En el caso de flavonoides, las condiciones sin estrés mostraron un aumento relevante en la cantidad de flavonoides totales en aquellas plantas tratadas con BS, PGPB, BS+HMA, y BS+PGPB. Por otra parte, los tratamientos con bioestimulantes provocaron una reducción notable de los flavonoides en todas las plantas, sobre todo, en aquellas con BS y HMA bajo condiciones de estrés salino. Hay que destacar que los tratamientos BS+AMF y BS+PGPB fueron los que mayor concentración de estos compuestos tuvieron con respecto al resto de tratamientos, pero no superior al control (Figura 11).

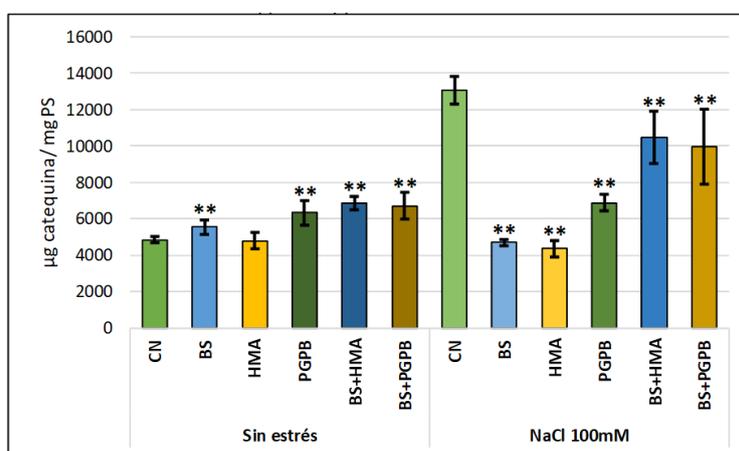


Figura 11. Cantidad de flavonoides totales en hoja, tras el tratamiento radicular de bioestimulantes microbianos y no microbianos, y la combinación de ambos, bajo condiciones normales y de estrés salino ( $n=20$ ). En el eje X quedan representados las distintas condiciones y tratamientos: control (CN), bioestimulante (BS), hongos micorrícicos arbusculares (HMA), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), bioestimulante con hongos micorrícicos arbusculares (BS+HMA) y bioestimulante con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB) en ambas condiciones. El eje Y muestra los flavonoides totales representados en microgramos ( $\mu\text{g}$ ) de catequina por miligramo ( $\text{mg}$ ) de peso seco. Las barras representan un error estándar. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$  según las pruebas de Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra de control.

#### 4.6.3. Daño oxidativo a lípidos (DOL)

Otro de los efectos del estrés por salinidad es el daño oxidativo a lípidos y la modificación en el contenido de MDA. El contenido de MDA fue significativamente superior en todas las plantas, independientemente del tratamiento con respecto al control, bajo condiciones normales. Por otra parte, bajo estrés salino, este marcador de la peroxidación lipídica disminuyó con respecto al control en todos los tratamientos, siendo muy notable la diferencia entre el control y los tratamientos (Figura 12).

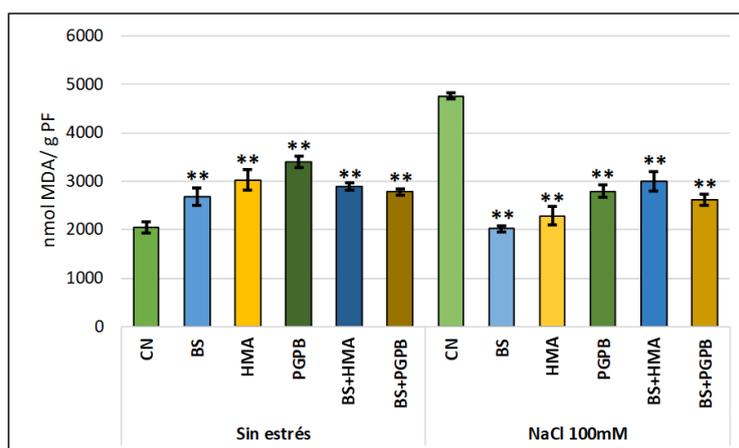


Figura 12. Daño oxidativo a lípidos en hoja de tomate, medido en nanomoles (nm) de MDA por gramo (g) de peso fresco, tras el tratamiento radicular de bioestimulantes microbianos y no microbianos, y la combinación de ambos, bajo condiciones normales y de estrés salino (n=20). En la gráfica quedan representados los distintos tratamientos: control (CN), bioestimulante (BS), hongos micorrícicos arbusculares (HMA), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), bioestimulante con hongos micorrícicos arbusculares (BS+HMA) y bioestimulante con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB) en ambas condiciones. El eje X las distintas condiciones y tratamientos, mientras que el eje Y representa los nmol de MDA por mg de peso fresco. Las barras representan un error estándar. \*\* p < 0,01 según las pruebas de Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra de control.

#### 4.7. Enzimas antioxidantes

La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) es uno de los parámetros enzimáticos que se ven afectados cuando las plantas se ven afectadas a un estrés, aumentando su actividad para combatir las especies reactivas de oxígeno (ROS). En el análisis de la enzima SOD en condiciones sin estrés, se observó un aumento en su actividad en plantas que fueron tratadas con BS+HMA y BS+PGPB. En el caso de aquellas que se encontraban bajo estrés salino las diferencias de actividad fueron significativas en todas las plantas tratadas, pues todas mostraron una menor actividad SOD ante el estrés con respecto al control (Figura 13A). Destaca el tratamiento BS, el cual, fue el que menos unidades de SOD mostró en las hojas.

Entre los parámetros medidos en el presente trabajo, también se analizó la actividad de la enzima antioxidante catalasa (CAT). Esta enzima es esencial para la eliminación de moléculas como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En los datos analizados en este trabajo se observó que la actividad CAT aumentó de forma sustancial en plantas a las que se les inoculó PGPB y BS+PGPB en condiciones normales (Figura 13B). En el caso de las plantas crecidas bajo estrés salino, el tratamiento PGPB presentó una actividad de CAT mucho mayor que el resto de los tratamientos o controles, sobresaliendo notablemente sobre las demás (Figura 13B). El resto de los tratamientos bajo condiciones salinas mostraron una actividad de la enzima evaluada por debajo del control.

Otra de las enzimas cuya actividad se ve afectada por el estrés es la del ascorbato peroxidasa (APX). En plantas sin estrés, la actividad APX fue distinta según el tratamiento analizado: tanto el tratamiento con BS como el tratamiento BS+HMA produjeron un aumento significativo en la actividad de la enzima (Figura 13C). Sin embargo, aquellas que fueron tratadas con HMA y PGPB sufrieron una disminución. Por otro lado, la actividad APX se redujo en todos los tratamientos bajo estrés salino, aunque la reducción más notable de la actividad se observó en aquellas hojas a las que se les aplicó BS (Figura 13C).

Por último, otra de las enzimas antioxidantes que se analizó en este estudio fue la enzima glutatión reductasa (GR). Esta actividad, en condiciones normales, se vio aumentada en el caso de aquellas muestras tratadas con BS, pero disminuyó su actividad de manera significativa solo en las plantas inoculadas con HMA. En el caso de las plantas expuestas a estrés salino, las plantas tratadas sufrieron una reducción de la actividad GR, siendo la más notable en aquellas plantas tratadas con BS y aquellas inoculadas con BS+PGPB (Figura 13D).

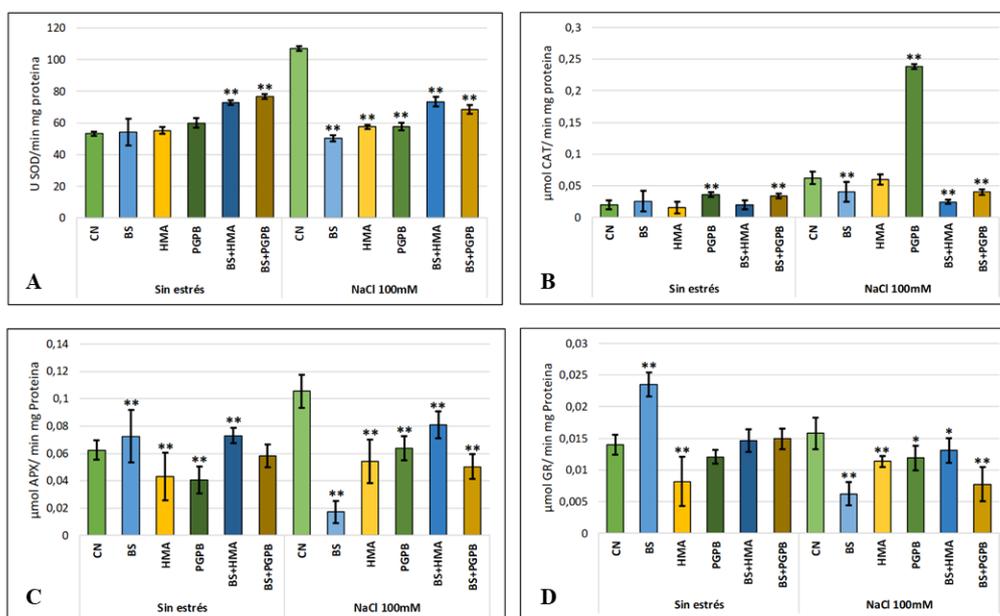


Figura 13. Actividades antioxidantes tras el tratamiento radicular de bioestimulantes microbianos y no microbianos, y la combinación de ambos, bajo condiciones normales y de estrés salino (n=20). El eje X representa los tratamientos: control (CN), bioestimulante (BS), hongos micorrícicos arbusculares (HMA), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), bioestimulante con hongos micorrícicos arbusculares (BS+HMA) y bioestimulante con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). El eje Y representa las actividades: (A) superóxido dismutasa (SOD), en unidades (U) de SOD por minutos y miligramo (mg) de proteína; (B) catalasa (CAT), en micromoles ( $\mu\text{mol}$ ) de CAT por minuto y miligramo (mg) de proteína; (C) ascorbato peroxidasa (APX), en micromoles ( $\mu\text{mol}$ ) de APX por minuto y miligramo (mg) de proteína; (D) glutatión reductasa (GR) en micromol ( $\mu\text{mol}$ ) de GR por minuto y miligramo (mg) de proteína. Las barras representan un error estándar. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$  según las pruebas de Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra de control.

## 5. Discusión

El fin de este trabajo fue evaluar los efectos de los bioestimulantes de forma individual y combinada en plantas de tomate, en condiciones de estrés salino, situación cada vez más común en zonas de la cuenca mediterránea. (Abou-Sreea *et al.*, 2021; Soltabayeva *et al.*, 2021) y el uso de bioestimulantes microbianos y no microbianos como forma de tolerar dicho estrés (Rouphael & Colla, 2018; Gupta *et al.*, 2021; Benito *et al.*, 2022; Parlakova Karagöz, 2023). Recientemente, se ha sugerido que el uso combinado de estos podría consolidar una segunda generación de bioestimulantes vegetales (Rouphael & Colla, 2018). Nuestra estrategia permite la identificación de efectos sinérgicos.

Lo primero que hay que destacar son los valores que se obtuvieron en la producción de fruto. En ausencia de estrés, se observaron mejoras significativas de productividad en aquellas plantas de tomate que fueron inoculadas con bioestimulantes microbianos, lo que incluye a aquellas a las que se les aplicaron los tratamientos combinados (Figura 2). Además, bajo las condiciones de estrés salino, todos los tratamientos aumentaron la producción de tomate respecto al control. En

los estudios de Rana *et al.*, (2022) y Sassine *et al.*, (2022) se ha visto que la aplicación de bioestimulantes mejora la producción de tomate, tanto en condiciones normales como en condiciones de elevada salinidad ha demostrado ser eficiente en tomate. Además, algunos microorganismos estimulan la floración y el cuajado del fruto, aumentando la calidad y cantidad del mismo (Fusco *et al.*, 2022). Esto confirmaría la eficacia de los bioestimulantes utilizados en el presente estudio.

Los bioestimulantes utilizados también fueron eficaces en el aumento de la biomasa total. Los resultados obtenidos en nuestro estudio demostraron un aumento en la altura de aquellas plantas a las que se les inoculó el bioestimulante y las HMA de forma individual en condiciones sin estrés. En cambio, todas las plantas expuestas a estrés salino, tratadas con bioestimulantes, experimentaron un aumento significativo en este parámetro (Figura 3). El aumento de la biomasa está estrechamente relacionado con la fotosíntesis, pues los azúcares obtenidos mediante este proceso son utilizados por las plantas para el crecimiento y desarrollo. A pesar de la reducción en el contenido de pigmentos fotosintéticos en condiciones normales, en las plantas tratadas con bioestimulantes de forma individual (Figura 4A, B y C), ni la eficiencia del fotosistema II ni el crecimiento se vieron reducidos. Cabe destacar la acción del bioestimulante CalBio, que presenta resultados significativos en la altura y eficiencia del fotosistema a pesar de la reducción notable en el contenido de pigmentos. Previamente, en nuestro grupo de investigación, demostraron la eficacia del extracto de CalBio para mejorar el crecimiento vegetal en condiciones de estrés salino Benito *et al.*, (2022).

El contenido relativo de agua y la eficiencia en el uso de la misma, utilizados para evaluar la capacidad de las plantas de retener agua en condiciones de estrés, mostraron valores similares en ambas condiciones. En condiciones normales, las plantas a las cuales se les aplicaron los tratamientos BS, BS+HMA y BS+PGPB mostraron valores elevados de estos parámetros, mientras que aquellas tratadas con HMA y PGPB exhibieron resultados disminuidos. En estrés salino, las tratadas con BS sufrieron disminución del CHR, y las tratadas con HMA y BS+PGPB un aumento del mismo (Figuras 5 y 6). En estas condiciones, estos últimos consiguieron una mejor absorción y retención de agua por parte de las plantas. Las razones por las que se pudieron observar estos resultados coinciden con otros trabajos en los que se ha descrito que bioestimulantes no microbianos, principalmente los hidrolizados de proteínas, y microbianos, como HMA, mejoraban el contenido hídrico y la eficiencia del uso de agua en las plantas (Porcel & Ruiz-Lozano, 2004).

Normalmente, una mayor conductividad eléctrica foliar se asocia a un mayor daño celular, pues este parámetro es directamente proporcional al daño en la membrana que posibilita la salida de electrolitos (Alsamir *et al.*, 2021). Nosotros hemos visto que nuestros tratamientos disminuyen este parámetro, lo que indica una protección de las plantas (Figura 7). También hemos observado una correlación entre este parámetro y el daño oxidativo a lípidos, lo cual es lógico si tenemos en cuenta que ambos están relacionados con el daño de las membranas celulares. (Kashyap *et al.*, 2020). En condiciones de estrés salino, la cantidad de MDA se redujo notablemente en todos los tratamientos (Figura 12). Este resultado también concuerda con los de conductividad, lo que indicaría que el principal efecto de los tratamientos sería a este nivel.

Los resultados obtenidos para prolina fueron muy distintos entre condiciones: las plantas que crecieron con tratamiento de BS en condiciones normales experimentaron una reducción de prolina, al igual que aquellas a las que se les inoculó BS+PGPB. En cambio, en condiciones de estrés salino, la aplicación de los tratamientos BS y BS+PGPB aumentó la prolina. La acumulación de prolina como forma para aliviar el estrés abiótico está bien estudiado y se conoce que este metabolito está también implicado en la protección del ciclo glutatión-ascorbato y en la promoción de las enzimas antioxidantes (Dikilitas *et al.*, 2020). En tomate, la acumulación de prolina está asociada a estrés (Gedeon *et al.*, 2022) para mejorar las actividades antioxidantes.

La producción de fenoles y flavonoides en condiciones de estrés se producen como una respuesta secundaria al estrés abiótico. En condiciones normales, la producción de estos metabolitos se vio aumentada en los tratamientos con PGPB, BS+HMA y BS+PGPB. En condiciones de estrés salino, la producción de estos compuestos se redujo notablemente con todos los tratamientos (Figuras 10 y 11), sugiriendo que la aplicación de bioestimulantes puede estar ayudando a las plantas a superar mejor el estrés pues no tuvieron la necesidad de sintetizar elevadas cantidades de estos, apuntando a un efecto de alivio del estrés más que a un aumento de las defensas.

Con respecto a la actividad de las enzimas antioxidantes analizadas en este trabajo, se observó que todas las actividades se redujeron gracias a la aplicación de los bioestimulantes, con excepción de la actividad CAT (Figura 13B). En condiciones normales, el tratamiento con BS aumentó todas las actividades, mientras que el tratamiento HMA las disminuyó. El resto de los tratamientos afectaron a las actividades de forma distinta: el tratamiento con PGPB aumentó la actividad CAT, pero disminuyó la APX, el tratamiento BS+HMA aumentó las actividades SOD y APX, y el tratamiento BS+PGPB aumentó las de SOD y CAT. Las actividades antioxidantes son las principales encargadas de la eliminación de las especies ROS. Estas especies tienen como finalidad la señalización molecular, pero, si el equilibrio entre las actividades antioxidantes y la producción de ROS se ve alterado, se produce la acumulación de estos y con ello, el daño celular e incluso la muerte celular. Los tratamientos redujeron el estrés oxidativo que produce el estrés por salinidad. Es por ello que las actividades de estas enzimas se redujeron significativamente. Otro de los indicativos de que los tratamientos redujeron el efecto del estrés fue la reducción en la conductividad eléctrica y del DOL, parámetros que normalmente se ven aumentados debido a los efectos de las ROS, en especial, la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Porcel & Ruiz-Lozano, 2004). Cabe destacar que la cosecha se realizó en el mes de agosto del 2022, por lo que no podemos descartar algún efecto debido al estrés por calor (J. Zhao *et al.*, 2021).

En resumen, podemos decir que el objetivo principal de este trabajo era evaluar el efecto combinado de los bioestimulantes CalBio con HMA y PGPB y su efecto en plantas expuestas a estrés salino. Lo que se observa en la figura 2 del anexo I es que, en estas condiciones, aquellas plantas tratadas con las combinaciones de bioestimulantes muestran valores de menor estrés comparado con su respectivo control: mayor altura, contenido hídrico relativo y mayor eficiencia en el uso de agua, menor producción de osmolitos, menor daño oxidativo a lípidos, menor producción de compuestos fenólicos y menor actividad de las enzimas antioxidantes. Por lo tanto, se confirma la hipótesis de partido y hemos demostrado que el uso combinado de estos productos ayuda a mantener la producción de tomates en condiciones de salinidad.

## 6. Conclusión

Las conclusiones del presente estudio son:

1. La aplicación individual de bioestimulantes microbianos y no microbianos dio buenos resultados en condiciones control y en condiciones de estrés parámetros fisiológicos como la altura, producción, la eficiencia del fotosistema, la conductividad y la eficiencia en el uso del agua. La más efectiva fue la aplicación de BS y HMA de forma individual.
2. Bajo estrés salino el tratamiento individual con BS redujo la cantidad de fenoles, flavonoides y actividades antioxidantes, aunque el resto de los tratamientos también mostraron efectos positivos (alivio de los efectos del estrés).

3. La aplicación combinada en condiciones de estrés salino dio buenos resultados en los parámetros fisiológicos y bioquímicos, pero cuantitativamente los resultados fueron, en la mayoría de los casos, peores que los tratamientos individuales con BS o HMA.

## 7. Bibliografía

- Ahmad, F., Singh, A., & Kamal, A. (2020). Osmoprotective Role of Sugar in Mitigating Abiotic Stress in Plants. In *Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress* (pp. 53–70). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119552154.ch3>
- Agencia Estatal de Meteorología (AEMET). (2022). Estudio de verano 2022. [https://repositorio.aemet.es/bitstream/20.500.11765/13966/1/Est\\_verano\\_22.pdf](https://repositorio.aemet.es/bitstream/20.500.11765/13966/1/Est_verano_22.pdf)
- Alsamir, M., Mahmood, T., Trethowan, R., & Ahmad, N. (2021). An overview of heat stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). In *Saudi Journal of Biological Sciences* (Vol. 28, Issue 3, pp. 1654–1663). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.088>
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 871). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). *Rapid determination of free proline for water-stress studies* (Vol. 39, Issue 1).
- Ben-Ari, G., & Lavi, U. (2011). Marker-assisted selection in plant breeding. In *Plant Biotechnology and Agriculture: Prospects for the 21st Century* (pp. 163–184). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381466-1.00011-0>
- Benito, P., Ligorio, D., Bellón, J., Yenush, L., & Mulet, J. M. (2022). A fast method to evaluate in a combinatorial manner the synergistic effect of different biostimulants for promoting growth or tolerance against abiotic stress. *Plant Methods*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s13007-022-00943-6>
- Benito, P., Ligorio, D., Bellón, J., Yenush, L., & Mulet, J. M. (2023). Use of *Yucca schidigera* Extracts as Biostimulants to Promote Germination and Early Vigor and as Natural Fungicides. *Plants*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/plants12020274>
- Beyer, W. F., & Fridovich, I. (1987). Assaying for Superoxide Dismutase Activity: Some Large Consequences of Minor Changes in Conditions\*,'. In *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* (Vol. 161).
- Bhupenchandra, I., Chongtham, S. K., Devi, E. L., Ramesh, R., Choudhary, A. K., Salam, M. D., Sahoo, M. R., Bhutia, T. L., Devi, S. H., Thounaojam, A. S., Behera, C., Harish, M. N., Kumar, A., Dasgupta, M., Devi, Y. P., Singh, D., Bhagowati, S., Devi, C. P., Singh, H. R., & Khaba, C. I. (2022). Role of biostimulants in mitigating the effects of climate change on crop performance. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.967665>
- Blainski, A., Lopes, G. C., & De 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(6), 6852–6865. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>

- Bligh E. G., & Dyer W. J. (1959). *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology Issued by THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION*. www.nrcresearchpress.com
- Bolouri-Moghaddam, M. R., Le Roy, K., Xiang, L., Rolland, F., & Van Den Ende, W. (2010). Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. In *FEBS Journal* (Vol. 277, Issue 9, pp. 2022–2037). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07633.x>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. In *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* (Vol. 72).
- Chandrasekaran, M., Chanratana, M., Kim, K., Seshadri, S., & Sa, T. (2019). Impact of arbuscular mycorrhizal fungi on photosynthesis, water status, and gas exchange of plants under salt stress—a meta-analysis. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00457>
- Deinlein, U., Stephan, A. B., Horie, T., Luo, W., Xu, G., & Schroeder, J. I. (2014). Plant salt-tolerance mechanisms. In *Trends in Plant Science* (Vol. 19, Issue 6, pp. 371–379). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.02.001>
- Dikilitas, M., Simsek, E., & Roychoudhury, A. (2020). Role of Proline and Glycine Betaine in Overcoming Abiotic Stresses. In *Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress* (pp. 1–23). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119552154.ch1>
- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. In *Scientia Horticulturae* (Vol. 196, pp. 3–14). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Evelin, H., Devi, T. S., Gupta, S., & Kapoor, R. (2019). Mitigation of salinity stress in plants by arbuscular mycorrhizal symbiosis: Current understanding and new challenges. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00470>
- Fahad Shah, Hasanuzzaman Mirza, Alam Mukhatar, Ullah Hidayat, Saeed Muhammad, Ali Khan Imtiaz, & Adnan Muhammad. (2020). Environment, Climate, Plant and Vegetation Growth. In *Environment, Climate, Plant and Vegetation Growth*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-49732-3>
- Foyer, C. H., & Halliwell, B. (1976). The Presence of Glutathione and Glutathione Reductase in Chloroplasts: A Proposed Role in Ascorbic Acid Metabolism. In *Planta* (Vol. 133).
- Fusco, G. M., Nicastro, R., Roupheal, Y., & Carillo, P. (2022). The Effects of the Microbial Biostimulants Approved by EU Regulation 2019/1009 on Yield and Quality of Vegetable Crops. In *Foods* (Vol. 11, Issue 17). MDPI. <https://doi.org/10.3390/foods11172656>
- Gedeon, S., Ioannou, A., Balestrini, R., Fotopoulos, V., & Antoniou, C. (2022). Application of Biostimulants in Tomato Plants (*Solanum lycopersicum*) to Enhance Plant Growth and Salt Stress Tolerance. *Plants*, 11(22). <https://doi.org/10.3390/plants11223082>
- Gogorcena, Y., Iturbe-Ormaetxe, Iñaki, Escuredo, P. R., & Becana, M. (1995). Antioxidant Defenses against Activated Oxygen in Pea Nodules Subjected to Water Stress'. In *Plant Physiol* (Vol. 108).
- Gupta, S., Stirk, W. A., Plačková, L., Kulkarni, M. G., Doležal, K., & Van Staden, J. (2021). Interactive effects of plant growth-promoting rhizobacteria and a seaweed extract on the

- growth and physiology of *Allium cepa* L. (onion). *Journal of Plant Physiology*, 262. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153437>
- Gururani, M. A., Venkatesh, J., & Tran, L. S. P. (2015). Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. In *Molecular Plant* (Vol. 8, Issue 9, pp. 1304–1320). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.05.005>
- H. Aebi. (1984). *Catalase in vitro*. *Methods in Enzymology* 105. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
- Hampel, M., Blasco, J., & Martín Díaz, M. L. (2016). Biomarkers and Effects. In *Marine Ecotoxicology: Current Knowledge and Future Issues* (pp. 121–165). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803371-5.00005-9>
- Hasanuzzaman, M., Parvin, K., Bardhan, K., Nahar, K., Anee, T. I., Masud, A. A. C., & Fotopoulos, V. (2021). Biostimulants for the regulation of reactive oxygen species metabolism in plants under abiotic stress. In *Cells* (Vol. 10, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10102537>
- Hortoinfo. (2023). Record ingresos exportación tomate España. <https://hortoinfo.es/record-ingresos-exportacion-tomate-espana/#:~:text=Con%20respecto%20a%20la%20campa%C3%B1a,exportados%20en%20la%202021%2F2022>
- Irigoyen, J. J., Einerich, D. W., & Sánchez-Díaz, M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum*, 84(1), 55–60. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb08764.x>
- Jardim-Messeder, D., Caverzan, A., Bastos, G. A., Galhego, V., de Souza-Vieira, Y., Lazzarotto, F., Felix-Mendes, E., Lavaquial, L., Junior, J. N., Margis-Pinheiro, M., & Sachetto-Martins, G. (2022). Genome-wide, evolutionary, and functional analyses of ascorbate peroxidase (APX) family in Poaceae species. *Genetics and Molecular Biology*, 46(1). <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2022-0153>
- Ji, X., Tang, J., & Zhang, J. (2022). Effects of Salt Stress on the Morphology, Growth and Physiological Parameters of *Juglans microcarpa* L. Seedlings. *Plants*, 11(18). <https://doi.org/10.3390/plants11182381>
- Karaca, C., Aslan, G. E., Buyuktas, D., Kurunc, A., Bastug, R., & Navarro, A. (2023). Effects of Salinity Stress on Drip-Irrigated Tomatoes Grown under Mediterranean-Type Greenhouse Conditions. *Agronomy*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/agronomy13010036>
- Kashyap, S. P., Kumari, N., Mishra, P., Prasad Moharana, D., Aamir, M., Singh, B., & Prasanna, H. C. (2020). Transcriptional regulation-mediating ROS homeostasis and physio-biochemical changes in wild tomato (*Solanum chilense*) and cultivated tomato (*Solanum lycopersicum*) under high salinity. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(8), 1999–2009. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.06.032>
- Kausar, R., & Komatsu, S. (2023). Proteomic Approaches to Uncover Salt Stress Response Mechanisms in Crops. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms24010518>
- Kuczynska, P., Jemiola-Rzeminska, M., & Strzalka, K. (2015). Photosynthetic pigments in diatoms. In *Marine Drugs* (Vol. 13, Issue 9, pp. 5847–5881). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md13095847>

- Kumari, M., Swarupa, P., Kesari, K. K., & Kumar, A. (2023). Microbial Inoculants as Plant Biostimulants: A Review on Risk Status. In *Life* (Vol. 13, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/life13010012>
- Li, Y., Chen, Y., Zhou, L., You, S., Deng, H., Chen, Y., Alseikh, S., Yuan, Y., Fu, R., Zhang, Z., Su, D., Fernie, A. R., Bouzayen, M., Ma, T., Liu, M., & Zhang, Y. (2020). MicroTom Metabolic Network: Rewiring Tomato Metabolic Regulatory Network throughout the Growth Cycle. *Molecular Plant*, *13*(8), 1203–1218. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.06.005>
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*, *148*(C), 350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Liu, W., Liu, K., Chen, D., Zhang, Z., Li, B., El-Mogy, M. M., Tian, S., & Chen, T. (2022). Solanum lycopersicum, a Model Plant for the Studies in Developmental Biology, Stress Biology and Food Science. In *Foods* (Vol. 11, Issue 16). MDPI. <https://doi.org/10.3390/foods11162402>
- Ma, Y., Dias, M. C., & Freitas, H. (2020). Drought and Salinity Stress Responses and Microbe-Induced Tolerance in Plants. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.591911>
- Ma, Y., Freitas, H., & Dias, M. C. (2022). Strategies and prospects for biostimulants to alleviate abiotic stress in plants. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1024243>
- Machado, R. M. A., & Serralheiro, R. P. (2017). Soil salinity: Effect on vegetable crop growth. Management practices to prevent and mitigate soil salinization. In *Horticulturae* (Vol. 3, Issue 2). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/horticulturae3020030>
- Mishra, N., Jiang, C., Chen, L., Paul, A., Chatterjee, A., & Shen, G. (2023). Achieving abiotic stress tolerance in plants through antioxidative defense mechanisms. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1110622>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). (2021). Memoria MAPA 2021: Agricultura. [https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/publicaciones/memoriama2021\\_1\\_a\\_agricultura\\_tcm30-626571.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/publicaciones/memoriama2021_1_a_agricultura_tcm30-626571.pdf)
- Mohammed, H. A., Emwas, A.-H., & Khan, R. A. (2023). Salt-Tolerant Plants, Halophytes, as Renewable Natural Resources for Cancer Prevention and Treatment: Roles of Phenolics and Flavonoids in Immunomodulation and Suppression of Oxidative Stress towards Cancer Management. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(6), 5171. <https://doi.org/10.3390/ijms24065171>
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. In *Plant & Cell Physiol* (Vol. 22, Issue 5). <https://academic.oup.com/pcp/article-abstract/22/5/867/1835201>
- Nephali, L., Piater, L. A., Dubery, I. A., Patterson, V., Huyser, J., Burgess, K., & Tugizimana, F. (2020). Biostimulants for plant growth and mitigation of abiotic stresses: A metabolomics perspective. In *Metabolites* (Vol. 10, Issue 12, pp. 1–26). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/metabo10120505>

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (s.f.). CAPÍTULO 2: FACTORES QUE CONDICIONAN LA PRODUCCIÓN. <https://www.fao.org/3/s8630s/s8630s04.htm>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (consultado 14-7-2023). More information on salt-affected soils. <https://www.fao.org/soils-portal/soil-management/manejo-de-suelos-problematicos/suelos-afectados-por-salinidad/more-information-on-salt-affected-soils/es/>
- Pandey, B., Bhardwaj, V., & Ramawat, N. (2022). *The Role of Biostimulants in Plant Growth, Development, and Abiotic Stress Management: Recent Insights* (pp. 221–238). [https://doi.org/10.1007/978-981-16-7080-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-16-7080-0_9)
- Parlakova Karagöz, F. (2023). Impact of PGPR Formulations Combined with Exogenous IBA Levels to Enhance Root Capacity in Poinsettia Cuttings. *Agronomy*, 13(3), 878. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030878>
- Parvin, K., Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Nahar, K., Mohsin, S. M., & Fujita, M. (2019). Comparative physiological and biochemical changes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under salt stress and recovery: Role of antioxidant defense and glyoxalase systems. *Antioxidants*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/antiox8090350>
- Porcel, R., Aroca, R., & Ruiz-Lozano, J. M. (2012). Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. In *Agronomy for Sustainable Development* (Vol. 32, Issue 1, pp. 181–200). <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0029-x>
- Porcel, R., & Ruiz-Lozano, J. M. (2004). Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 55(403), 1743–1750. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh188>
- Rajput, V. D., Harish, Singh, R. K., Verma, K. K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F. R., Meena, M., Gour, V. S., Minkina, T., Sushkova, S., & Mandzhieva, S. (2021). Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. In *Biology* (Vol. 10, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biology10040267>
- Ramakrishna, A., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. In *Plant Signaling and Behavior* (Vol. 6, Issue 11, pp. 1720–1731). <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>
- Rana, V. S., Sharma, S., Rana, N., & Sharma, U. (2022). Sustainable production through biostimulants under fruit orchards. *CABI Agriculture and Bioscience*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/s43170-022-00102-w>
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J. A., Hilal, M., & Prado, F. E. (2009). Soluble sugars-metabolism, sensing and abiotic stress a complex network in the life of plants. *Plant Signaling and Behavior*, 4(5), 388–393. <https://doi.org/10.4161/psb.4.5.8294>
- Rouphael, Y., & Colla, G. (2018). Synergistic biostimulatory action: Designing the next generation of plant biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 871. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01655>
- Rouphael, Y., Lucini, L., Miras-Moreno, B., Colla, G., Bonini, P., & Cardarelli, M. (2020). Metabolomic Responses of Maize Shoots and Roots Elicited by Combinatorial Seed

- Treatments With Microbial and Non-microbial Biostimulants. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00664>
- Roychoudhury, A., & Tripathi, D. K. (2020). *Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress Biochemical and Molecular Perspectives*. <http://www.wiley.com/go/permissions>.
- Šamec, D., Karalija, E., Šola, I., Vujčić Bok, V., & Salopek-Sondi, B. (2021). The role of polyphenols in abiotic stress response: The influence of molecular structure. In *Plants* (Vol. 10, Issue 1, pp. 1–24). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/plants10010118>
- Sasi, S., Venkatesh, J., Daneshi, R. F., & Gururani, M. A. (2018). Photosystem ii extrinsic proteins and their putative role in abiotic stress tolerance in higher plants. *Plants*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/plants7040100>
- Sassine, Y. N., Sajyan, T. K., El Zarzour, A., Abdelmawgoud, A. M. R., Germanos, M., & Alturki, S. M. (2022). Integrative effects of biostimulants and salinity on vegetables: Contribution of bioumik and Lithovit®-urea50 to improve salt-tolerance of tomato. *Agronomy Research*, 20(4), 793–804. <https://doi.org/10.15159/AR.22.074>
- Sayyad-Amin, P., Jahansooz, M. R., Borzouei, A., & Ajili, F. (2016). Changes in photosynthetic pigments and chlorophyll-a fluorescence attributes of sweet-forage and grain sorghum cultivars under salt stress. *Journal of Biological Physics*, 42(4), 601–620. <https://doi.org/10.1007/s10867-016-9428-1>
- Shomali, A., Das, S., Arif, N., Sarraf, M., Zahra, N., Yadav, V., Aliniaiefard, S., Chauhan, D. K., & Hasanuzzaman, M. (2022). Diverse Physiological Roles of Flavonoids in Plant Environmental Stress Responses and Tolerance. In *Plants* (Vol. 11, Issue 22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants11223158>
- Soltabayeva, A., Ongaltay, A., Omondi, J. O., & Srivastava, S. (2021). Morphological, physiological and molecular markers for salt-stressed plants. In *Plants* (Vol. 10, Issue 2, pp. 1–18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/plants10020243>
- T. Omuto Christian, Ronald Vargas, Kostiantyn Viatkin, Yusuf Yigini, El Mobarak Abdelmagid, & Nuha Abdalla Mohamed Khamis. (2021). Mapeo de suelos afectados por salinidad - Manual técnico. In *Mapeo de suelos afectados por salinidad - Manual técnico*. FAO. <https://doi.org/10.4060/ca9215es>
- Wang, H., Tang, X., Wang, H., & Shao, H. B. (2015). Proline accumulation and metabolism-related genes expression profiles in *Kosteletzkya virginica* seedlings under salt stress. *Frontiers in Plant Science*, 6(SEPTEMBER). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00792>
- Yang, L., Wen, K. S., Ruan, X., Zhao, Y. X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. In *Molecules* (Vol. 23, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>
- Zhao, J., Lu, Z., Wang, L., & Jin, B. (2021). Plant responses to heat stress: Physiology, transcription, noncoding rnas, and epigenetics. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 1, pp. 1–14). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22010117>
- Zhao, S., Zhang, Q., Liu, M., Zhou, H., Ma, C., & Wang, P. (2021). Regulation of plant responses to salt stress. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22094609>

Zhishen Jia, MengCheng Tang, & Jianming Wu. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)

## Anexo I. Material complementario

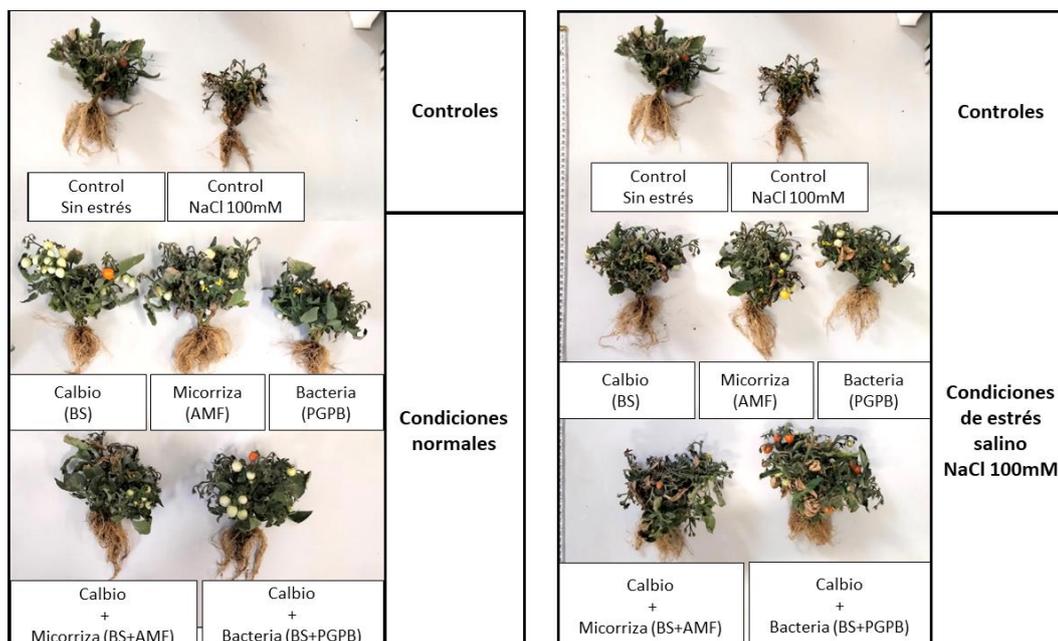


Figura 1 del Anexo I. Imágenes de las plantas tras la recolección. En la parte superior se encuentran los controles tanto sin estrés (izquierda) como control de estrés salino (derecha). En la imagen de la derecha se muestran las plantas que crecieron en condiciones normales tras la recolección, y a la izquierda las que crecieron bajo condiciones de estrés salino NaCl 100 mM tras la recolecta.

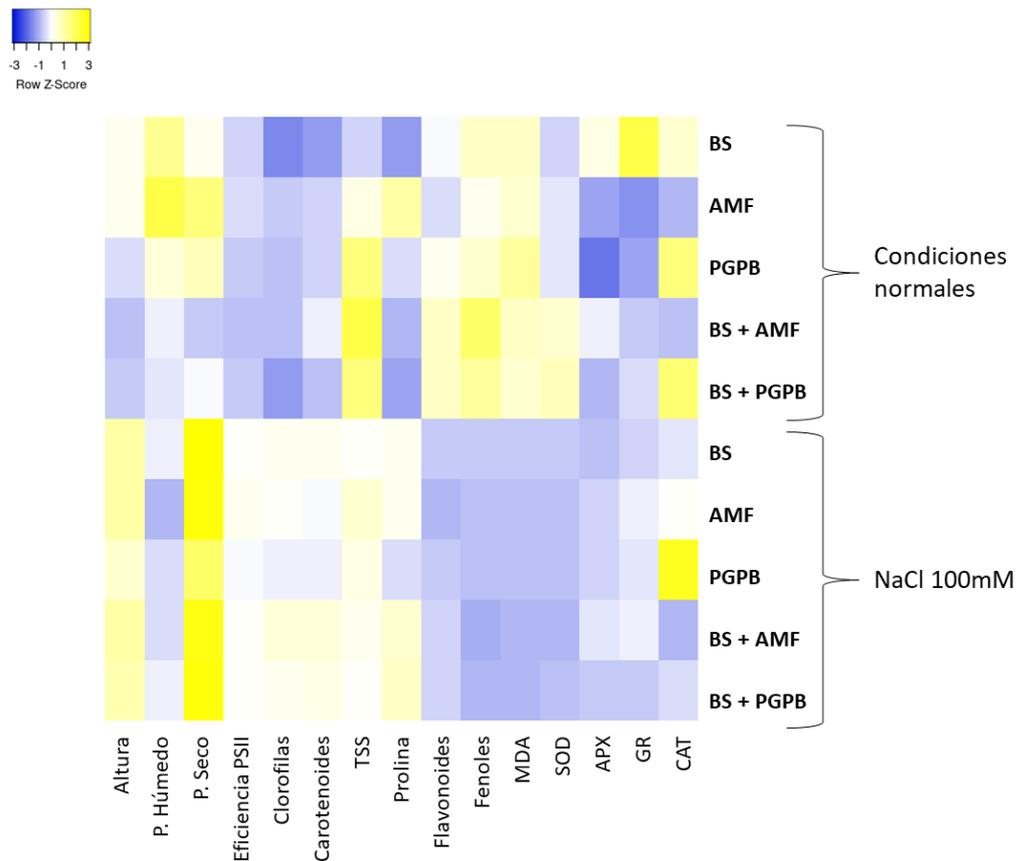


Figura 2 del Anexo I. Mapa de calor de los resultados con respecto al control correspondiente para cada condición de los parámetros analizados en el estudio, comparando los tratamientos con el control. En azul queda representado la reducción del Row Z-score de cada tratamiento con respecto al control pertinente de 0 a -3, mientras que en amarillo se representa el aumento del Row Z-score del tratamiento con el correspondiente control de 0 a 3. Los parámetros medidos, de izquierda a derecha, fueron: altura, peso húmedo, peso seco, eficiencia del fotosistema II, clorofilas totales, carotenoides, azúcares solubles totales (TSS), prolina, flavonoides, fenoles, malondialdehído (MDA), y actividades superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR) y catalasa (CAT).