



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
FACULTAD DE AGRONOMÍA E INGENIERÍA FORESTAL
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
MAGISTER EN FISIOLOGÍA Y PRODUCCIÓN VEGETAL

RESPUESTA DE PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*) CULTIVAR
MONEYMAKER A ESTRÉS SALINO PROVOCADO POR DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE NaCl

Tesis presentada como requisito para optar al grado de

Magister en Fisiología y Producción Vegetal

por:

Paola Rivera Ulloa

Comité de Tesis
Profesor Guía: José O'Brien
Profesores Informantes:
Claudia Bonomelli

Agosto 2018
Santiago-Chile

Agradecimientos

Al laboratorio del profesor José O'Brien de la facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal de la Pontificia Universidad Católica de Chile por permitirme realizar mi trabajo de investigación.

A mi profesor José O'Brien cuyo aporte y conocimiento fue fundamental para la realización de este proyecto. A mi profesora informante Claudia Bonomelli por su contribución a esta investigación.

A mis compañeros de laboratorio y a los de magister, a mis amigas que hice durante todo este tiempo Massi, María Ignacia, Cami, Caro y Dani porque fueron un aporte fundamental en el ámbito académico y además emocional, lo cual hizo este magister mucho más fácil valioso para mi.

Agradezco infinitamente a Dios y a mi familia, principalmente mis padres y hermanas porque son los que me apoyan para cumplir cada reto propuesto.

A mis padres, hermanas y sobrinas

ÍNDICE

1. Introducción.....	3
2. Materiales y Métodos	8
a) Material Vegetal y Tratamientos	8
b) Concentración de iones	8
c) Extracción de RNA y qRT-PCR	9
3. Resultados y discusiones.....	10
a) Caracterización de plantas	10
b) Concentración de Na ⁺	17
c) Efecto del estrés salino en peso fresco y peso seco de las plántulas	18
d) Distribución de la biomasa	19
e) Expresión de genes que responden a hormonas	21
4. Conclusiones.....	23
5. Bibliografía	26

Figuras

Figura 1: Efecto de la concentración de NaCl en <i>S. lycopersicum</i>	10
Figura 2: Caracterización de plántulas de <i>S. lycopersicum</i> en NaCl.....	13
Figura 3: Respuesta fisiológica de brotes y raíces en respuesta a diferentes intensidades de estrés salino.....	14
Figura 5: Concentración de iones de Na ⁺	17
Figura 6: Peso fresco de plántulas expuestas a NaCl.....	18
Figura 7: Acumulación de biomasa en tejido aéreo y tejido radicular	21
Figura 8: Expresión de los genes <i>RCAR1</i> , <i>PP2Ca</i> y <i>JAR1</i>	21

RESPUESTA DE PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*) CULTIVAR
MONEYMAKER A ESTRÉS SALINO PROVOCADO POR DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE NaCl

Paola Rivera

Pontificia Universidad Católica de Chile

Abstract

Excessive fertilization, climatic change and the use of poorer quality water exacerbate abiotic stress conditions for plants. These factors induce salinity stress that is a limit factor for plant growth. Tomato is a crop with the greatest economic importance in the world and the capacity of some cultivars to tolerate salinity is determined by physiological mechanisms in relation to phytohormone profiling adjustment. Therefore, this study aims to show that mild salt stress could stimulate the increase in shoot length, primary root length and proliferation of lateral roots in *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker. Tomato seeds were grown by tissue culture technique in MS medium, the seedlings were further cultivated in the same medium and MS medium supplied with different NaCl concentrations (0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 and 200 mM). After 10 days of treatment, the results suggest that treatments with higher NaCl concentrations (175 mM) reduced plant growth by approximately 21% of the shoot length and 34% of the primary root length. On the other hand, treatments with non-toxic salt concentrations (25 mM) increased plant growth by 17% and 45% of the shoot and root length, respectively. The results of biomass and Na⁺ concentrations changed with salt stress treatments; only the fresh weight was not affected. Expression of *RCAR1*, *PP2Ca* and *JAR1* genes was analyzed using the real-time PCR method. Salt stress induced up-regulation expression of stress-responsive genes.

Key words: Salt stress, lateral root, *Solanum lycopersicum*, hormone signalling

1. Introducción

La demanda por alimentación de una población en constante crecimiento es uno de los mayores desafíos en la actualidad debido a los cambios climáticos que han puesto en peligro la sustentabilidad y productividad de los sistemas de producción agrícola. La agricultura moderna se enfrenta a diferentes desafíos, uno de ellos es el estrés abiótico, a los cuales se les atribuye más del 50% de la reducción en la producción de los cultivos de mayor importancia alrededor del mundo (Fahad et al., 2015).

Los estreses abióticos causantes de pérdidas en la producción agrícola incluyen factores como la salinidad, sequía, inundaciones y temperaturas extremas. Una de las técnicas que se plantea como posible solución para incrementar la tolerancia al estrés abiótico de las plantas es el uso de herramientas biotecnológicas junto con métodos de mejoramiento genético. No obstante, para poder llevar a cabo esta combinación es necesario comprender detalladamente los mecanismos de tolerancia y susceptibilidad de la plantas a los factores adversos (Suárez et al., 2012).

La salinidad de los suelos y aguas es un problema que se presenta generalmente en el norte de Chile donde se encuentran zonas áridas y semiáridas, generalmente en el norte de Chile (Sierra, 2015). La alta concentración de sales causa estrés hiperosmótico en las plantas reduciendo la capacidad de las mismas para utilizar el agua y cambiando los procesos metabólicos (Tomescu et al., 2017). Actualmente, existen varios estudios que demuestran la capacidad de tolerancia al estrés salino de algunas especies o cultivares específicos, esta respuesta es genético dependiente y lo que se ha determinado es que existen ciertas especies capaces de prevenir la entrada de sal a la célula y otras que pueden minimizar la concentración de este soluto en el citoplasma, compartimentalizando la sal en vacuolas y de esta manera evitar los efectos tóxicos en la fotosíntesis y otros procesos metabólicos (Chaves et al., 2009).

La salinidad perturba las relaciones minerales-nutrientes en las planta ya que afecta la disponibilidad, el transporte y la distribución de los nutrientes en las plantas. Adicionalmente el estrés causado por NaCl induce la deficiencia y desequilibrio de iones debido a la competencia de nutrientes como el K^+ , Ca^{2+} y NO_3^- con los iones

tóxicos Na^+ y Cl^- (Hu and Schmidhalter, 2005). La salinidad reduce significativamente el crecimiento, la productividad y la calidad de los cultivos afectando su fisiología y características bioquímicas. En *Lycopersicon esculentum*, la alta salinidad reduce la concentración de proteínas, carotenoides, clorofila, sólidos solubles, almidón y contenidos fenólicos (Bonomelli et al., 2018).

Las plantas responden a través de diferentes mecanismos ante el estrés ambiental y uno de ellos es la asignación de nueva biomasa a los órganos afectados. Bajo concentraciones tóxicas de sal, las plantas tienden a asignar más biomasa a los órganos que se inhibieron más severamente debido a las tensiones abióticas, especialmente raíces. Estos órganos actúan como primera línea de defensa para combatir el estrés y por lo tanto ajustan su crecimiento y mantienen la homeostasis, de manera que los órganos superiores se afectan menos (Ma et al., 2017).

Sin embargo, la presencia o ausencia de nutrientes también tiene un efecto en la respuesta de distribución de biomasa ante un estrés (Poorter and Nagel, 2000). Por ejemplo, en varios estudios se ha determinado que la tasa de aplicación moderada de nitrógeno acelera la acumulación de biomasa en brote y raíces bajo niveles tóxicos de sal, sin embargo si se aplica en etapa de floración los efectos del estrés salino se agravan y se inhibe el crecimiento (Ma et al., 2017). Cuando existe poca disponibilidad de nutrientes y agua, las raíces utilizan relativamente más estos recursos y dejan menos para el tejido aéreo, por lo tanto el crecimiento de la hoja se limita (Poorter and Nagel, 2000).

Dentro del género *Solanum*, el tomate es uno de los cultivos más importantes alrededor del mundo, se ha destinado un número de recursos considerablemente alto para la producción de este. Sin embargo, una gran parte de los cultivos se ve afectado por el estrés salino causando reducción en la cantidad, calidad y por lo tanto rendimiento de la producción. La capacidad de la planta para tolerar el estrés salino está determinado por mecanismos bioquímicos y fisiológicos, especialmente a través de la generación de ROS y el reajuste del estado redox de la célula (de la Torre-González et al., 2017b).

El tomate, *Solanum lycopersicum*, es moderadamente sensible a la salinidad en todas las etapas del desarrollo de la planta incluyendo la germinación, el crecimiento de la planta, calidad de fruta y rendimiento del cultivo (Tomescu et al., 2017). Debido a que el estrés salino provoca grandes pérdidas a nivel mundial uno de los objetivos en la actualidad es obtener híbridos capaces de tolerar el estrés salino o que sean más resistentes a este tipo de estrés abiótico, para lo cual es necesario saber los efectos que este estrés tiene en las plantas no solamente a nivel fisiológico, sino también a nivel molecular.

Las hormonas vegetales juegan un rol vital en el crecimiento y desarrollo de las plantas, controlan varios procesos importantes como el patrón de desarrollo de las raíces, formación lateral y adventicia de raíces, floración y ramificación (Raja et al., 2017). Adicionalmente, estos compuestos tienen un papel clave en la aclimatación de las plantas ante el estrés abiótico y se rigen en una compleja red de señales hormonales que empieza con un estímulo, recepción del estímulo por parte de una molécula receptora y la ejecución de respuestas ante ese estímulo (Suárez et al., 2012).

Se ha observado que en plantas de tomate expuestas al estrés salino existe un decaimiento en la concentración de auxinas, lo cual puede desencadenar senescencia debido a que las auxinas ayudan a detoxificar ROS (de la Torre-González et al., 2017b). Varios estudios han demostrado que existe una clara interacción entre las fitohormonas y las especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la respuesta de la planta al estrés por sal. La producción de ROS durante el estrés abiótico altera los gradientes de auxina que a su vez reduce la señalización mediada por auxina, ya que estas pueden inducir la producción de ROS regulando la homeostasis (Raja et al., 2017).

Por otro lado, se ha demostrado que los elevados niveles de ROS regulan el transporte de las auxinas modulando la expresión de los genes *PIN*, relocalizando los exportadores de auxinas y mediante la conjugación de las auxinas (Raja et al., 2017). Las auxinas son transportadas en las plantas tanto por mecanismos pasivos como activos, el transporte polar de las auxinas crea un gradiente auxínico a través de los

tejidos para establecer centros de máxima acumulación de auxina que determinan el crecimiento polar de las células y la morfogénesis (de la Torre-González et al., 2017a). Esto ocurre gracias a la localización diferencial de las proteínas PIN (encargadas del transporte de salida de las auxinas), y su función clave reside en su localización polar en la membrana plasmática, cuya retroalimentación esta regulada por las auxinas (Xia et al., 2015).

Los jasmonatos (JAs), por otro lado, son reguladores clave en las respuestas de las plantas ante estrés biótico o abiótico, además de estar involucrados en procesos de desarrollo como el crecimiento de raíz, tuberización, maduración de fruto, desarrollo reproductivo y senescencia (Chini et al., 2007). La biosíntesis de jasmonatos ocurre en las hojas principalmente, y se ha descubierto una vía similar en raíces. La aplicación exógena de jasmonato da como resultado la inducción de genes de respuesta ante patógenos y respuesta de genes relacionados con estrés. La alta salinidad incrementa los niveles de jasmonatos en las plantas provocando la inducción de genes de biosíntesis de esta hormona así como también las proteínas en respuesta a estrés (Fahad et al., 2015).

El JA se forma a partir de α -ácido linoleico (α -LeA) de las membranas de los cloroplastos mediante procesos oxidativos que ocurren en diferentes ramas de la ruta de la lipoxigenasa, por lo cual los JAs forman parte de la familia de las oxylipinas (Wasternack and Song, 2017). Las enzimas que se consideran mas importantes en la biosíntesis de JA son: aleno oxido ciclasa (AOC), OPDA reductasa3 (OPR3) y jasmonyl isoleucina sintetasa (JAR1). Por lo cual estas tres proteínas representan un buen objetivo de estudio para conocer las respuestas de la planta mediada por JA, ante un tipo de estrés (Wasternack and Song, 2017).

El ácido abscísico (ABA) juega un papel importante en las respuestas de la planta ante estrés y adaptación. Además, participa en algunos procesos de la planta como el desarrollo de la semilla, dormancia, y respuesta a estímulos ambientales (Xia et al., 2015). Se ha reportado hasta el momento que la exposición de plantas a un estrés salino incrementa la concentración de ABA. La concentración de esta hormona

aumenta de forma proporcional a medida que crece la raíz lo que sugiere que este tejido puede tener diferentes respuestas a la restricción de la concentración de ABA endógeno o exógeno (Fahad et al., 2015).

Se ha demostrado que el papel de los receptores de ABA, PYR/PYL/RCAR es clave para la expresión de los genes en respuesta a esta hormona. Estos receptores pueden interactuar con la membrana plasmática de forma dependiente de calcio gracias a unas proteínas con dominio C2 que están relacionadas con la ruta de señalización de ABA denominadas CAR (Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki, 2013). Incluso se han realizado estudios en los que se demuestra que los receptores PYL actúan de forma específica con las proteínas CAR, por ejemplo se sabe que PYL4 actúa de forma específica con CAR1. Esta interacción es clave para permitir la cascada de señalización, por lo cual estos genes suelen ser de gran importancia para el estudio de análisis de expresión de genes que responden a ABA (Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki, 2013).

Investigaciones en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* sugieren que el efecto de la salinidad en las plantas es concentración-dependiente. De esta manera, el estrés salino a una concentración no tóxica podría promover la acumulación de auxinas en primordios en desarrollo, evitando la detención del desarrollo de la planta, lo cual desencadena una cascada de señales que involucra expresión de genes de respuesta a otras fitohormonas relacionadas con el estrés abiótico como ABA, JAs, auxinas y etileno (Zolla et al., 2010). Por lo tanto la importancia de este estudio radica en encontrar el mismo estímulo positivo de la salinidad, o similar, en plantas de *Solanum lycopersicum*, midiendo el tamaño de las plantas tanto de la parte aérea como de la parte radicular, obteniendo el peso fresco, biomasa, concentración de Na⁺ y evaluando la expresión de genes que responden a hormonas con el fin de relacionarlo al fenotipo obtenido.

2. Materiales y Métodos

a) Material Vegetal y Tratamientos

Las plantas de tomate (*S. lycopersicum*) cultivar Moneymaker fueron germinadas *in vitro* en medio de cultivo MS (Murashige and Skoog, 1962). Previo a la germinación se esterilizaron las semillas con una solución de tritón al 0,1% e hipoclorito de sodio al 2,5%. Se incubó en agitación por 10 minutos, seguidos de 3 lavados con agua destilada estéril. Posteriormente se colocaron las semillas en placas Petri que contienen medio MS sólido (0,8 %) Se crecieron durante 10 días en una cámara de crecimiento con condiciones controladas (25°C, 16h fotoperiodo). A los 7 días las plantas se traspasaron a frascos de vidrio (6 cm de diámetro y 12 cm de altura) medio MS sólido con tres diferentes concentraciones de NaCl (0, 25 y 175 mM). Se colocaron 3 plantas por cada frasco (unidad experimental) y se realizaron 10 frascos por cada tratamiento. Se dejó en los tratamientos con NaCl durante 10 días en la cámara de crecimiento. Después de los 10 días se procedió a sacar las plantas para su caracterización fisiológica. Esta consistió en medir el largo del brote, el largo de la raíz principal, contar el número de raíces secundarias para calcular la densidad de raíces. El análisis estadístico que se aplicó para determinar la diferencia significativa entre un tratamiento y otro fue ANOVA de una vía y posteriormente Tukey test ($p < 0.05$).

b) Concentración de iones

A los 10 días de tratamiento se recolectó material tanto raíces como brote/hojas por separado. Para la obtención de estos datos se tomaron 8 frascos con 3 plantas cada uno, para un total de 24 plantas por tratamiento. Se separaron las raíces de la parte aérea y se pesó cada material con una balanza (LX220A Precisa, USA). Las muestras vegetales se secaron al horno durante 48 hrs. 65°C hasta peso constante. Las concentraciones de cationes se determinaron mediante combustión en seco a 500° C hasta que los componentes orgánicos se convirtieron en cenizas. Las muestras de tejido de ceniza se disolvieron en HCl (2M) y las concentraciones se determinaron con

un espectrofotómetro de absorción atómica (Varian SpectraAA 220 FS, Varian Techtron Pty. Limited, Victoria, Australia).

c) Extracción de RNA y qRT-PCR

La expresión de los genes en respuesta a hormonas después de los tratamientos fue analizado mediante la reacción en cadena de la polimerasa reversa y cuantitativa (qRT-PCR). El RNA fue extraído con el reactivo TRIzol (Thermo Scientific, <https://www.thermofisher.com>) y posteriormente se purificó utilizando LiCl (Wang et al., 2009) se utilizó 1 µg para la síntesis de cDNA con el kit Verso cDNA Synthesis (Thermo Scientific, <https://www.thermofisher.com>). El qRT-PCR se realizó con el instrumento ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, <https://www.appliedbiosystems.com>) utilizando cDNA 5 veces diluido, 1 x master mix SYBR Green y una solución 10 mM de cada uno de los primers específicos para cada gen, en un volumen final de 20 µL. El programa del termociclador consistió en 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C (depende del partidor) y 30 segundos a 72°C. Se verificó la amplificación de un solo producto a través de las curvas de disociación y el gel de electroforesis. Los valores CT se calcularon usando el software SDS2 y para la normalización se utilizó el gen *UBIQUITINA (UBI3)* (Pattison and Catalá, 2012) como gen de referencia con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Los genes que se analizaron en este trabajo fueron *RCAR1 (REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR 1)*, *PP2Ca (2C-TYPE PROTEIN PHOSPHATASE)* y *JAR1 (JASMONIC ACID-AMIDO SYNTHETASE)* que responden a ácido abscísico y jasmonato respectivamente, sus secuencias se muestran en el anexo 1.

3. Resultados y discusión

a) Caracterización fisiológica de plantas



Figura 1: Efecto de la concentración de NaCl en *S. lycopersicum*.

Efecto de la concentración de NaCl en el crecimiento de plántulas de *S. lycopersicum* cultivar Moneymaker 10 días después de tratamiento. Izquierda 0 mM, centro 25 mM y derecha 175 mM.

Para analizar el efecto del estrés salino se caracterizó la respuesta de las plántulas de *Solanum lycopersicum* cultivar Moneymaker ante diferentes concentraciones de NaCl (estrés bajo, moderado y alto), midiendo el largo del brote, largo de la raíz y número de raíces secundarias, con lo cual se pudo obtener la densidad de raíces por planta. Como se observa en la Figura 1, el aumento de los niveles de NaCl hasta 25 mM estimulan el crecimiento tanto de la parte aérea así como también la parte radicular de las plántulas. En la Figura 2 se puede observar el comportamiento de las plántulas cuya raíz principal fue cortada previo a ser expuestas a sal, en respuesta al aumento de la concentración de NaCl. En los tres parámetros de los cuatro estudiados se observa una tendencia de aumento en la concentración de 25 mM tanto en el largo del brote (Figura 2A), así como en el número de raíces secundarias (Figura 2C) y la densidad (Figura 2D) con respecto al control y al tratamiento con 175 mM

de NaCl. Sin embargo, a la misma concentración se observa una disminución en el largo de la raíz (Figura 2B), al aumentar el número de raíces secundarias y disminuir el largo de la raíz, como consecuencia existe un aumento de la densidad. De esta manera el análisis estadístico de los datos (Tukey test, $p < 0.05$) determinó una diferencia significativa entre el control y el tratamiento a 25 mM en la densidad con un valor p de 0.04. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Zolla, et al (2010), en su trabajo realizado con *Arabidopsis thaliana* reportaron que las concentraciones adecuadas (no tóxicas) de sal causan una drástica reducción en el largo de la raíz principal y de las raíces secundarias, pero un aumento en el número de raíces secundarias, conformando así una típica respuesta morfogénica inducida por el estrés. Además adujeron que la estimulación del número de raíces secundarias se debe a la progresión de un mayor número de primordios de raíz lateral desde la etapa previa al surgimiento hasta la fase de formación de raíces laterales. Aunque algunos investigadores han reportado que la salinidad moderada puede estimular el crecimiento en algunas especies (Bell and O'Leary, 2003), existen otros trabajos en los que se ha reportado que el aumento en los niveles de salinidad disminuye el crecimiento de brotes y raíces en algunos cultivos como soya y maíz. Los resultados contradictorios se deben principalmente a la variación genética de las diferentes especies de cultivos y la forma en la que estas plantas reaccionan ante el estrés salino (Ma et al., 2017).

Después de haber observado que a la concentración de 25 mM de NaCl las plantas presentan una estimulación en el crecimiento, y que a 200 mM se inhibe casi completamente el sistema radicular, se procedió a repetir el experimento pero esta vez sin cortar la raíz principal con el fin de determinar el efecto de las distintas concentraciones en la radícula. En la Figura 3 se observa diferencia significativa entre el control y el tratamiento con 25 mM de NaCl en tres de las cuatro características estudiadas: largo del brote (Figura 3A), largo de la raíz principal (Figura 3B) y número de raíces secundarias (Figura 3C); sin embargo en la densidad de raíces (Figura 3D) no se ve una diferencia significativa entre el control y los otros dos tratamientos, esto debido a que el largo de la raíz principal y el número de raíces secundarias aumentan de

forma proporcional. Por otro lado la transferencia de las plántulas a estrés salino 175 mM disminuye el crecimiento tanto de la parte aérea como de la parte radicular.

El aumento en la proliferación de raíces secundarias a concentración de 25 mM de NaCl puede deberse a una respuesta de aclimatación de la planta. Sin embargo, este comportamiento en el que se observa la estimulación del crecimiento de las plántulas expuestas a bajas concentraciones de sal depende del cultivar con el que se trabaje. Kanokwan *et al* (2015) en su trabajo reportaron disminución del crecimiento de plantas de tomate cultivar Puanghaka a partir de 5 mM de NaCl (Kanokwan *et al.*, 2015). No obstante, lo interesante de esta investigación fue que el largo de la raíz principal se mantuvo relativamente constante, a pesar de que el peso de las raíces disminuyó con el aumento de la concentración de sal. Esto significa que la densidad e incluso el diámetro de la raíz puede disminuir a medida que aumenta la concentración de NaCl. Por otro lado de la Torre-González *et al.* (2017) compararon la respuesta de dos genotipos de tomate bajo estrés salino, cultivar Grand Brix y cultivar Marmande Raf, encontraron que este tipo de estrés disminuye la biomasa y la tasa relativa de crecimiento en ambos cultivares, sin embargo este efecto es significativamente mayor en el cultivar Marmande Raf. Esto demuestra que la respuesta a estrés salino es genético dependiente y puede variar entre un cultivar y otro.

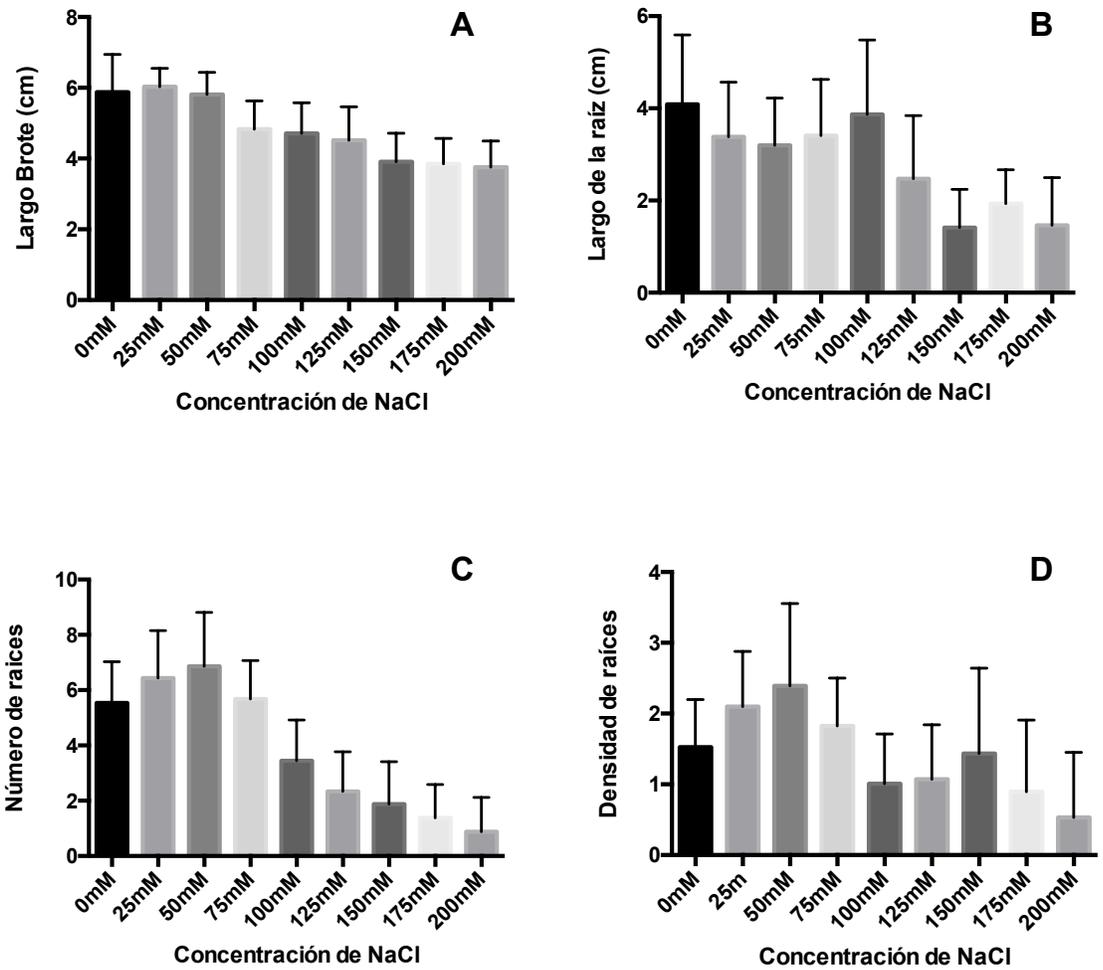


Figura 2: Caracterización de plántulas de *S. lycopersicum* en NaCl

Efecto de la concentración de NaCl en el crecimiento de plántulas de *S. lycopersicum* cultivar Moneymaker cuya raíz principal fue cortada previo a la exposición a sal. A) Largo del brote. B) Largo de la raíz. C) Número de Raíces. D) Densidad de raíces. Las barras muestran la desviación estándar (n=50)

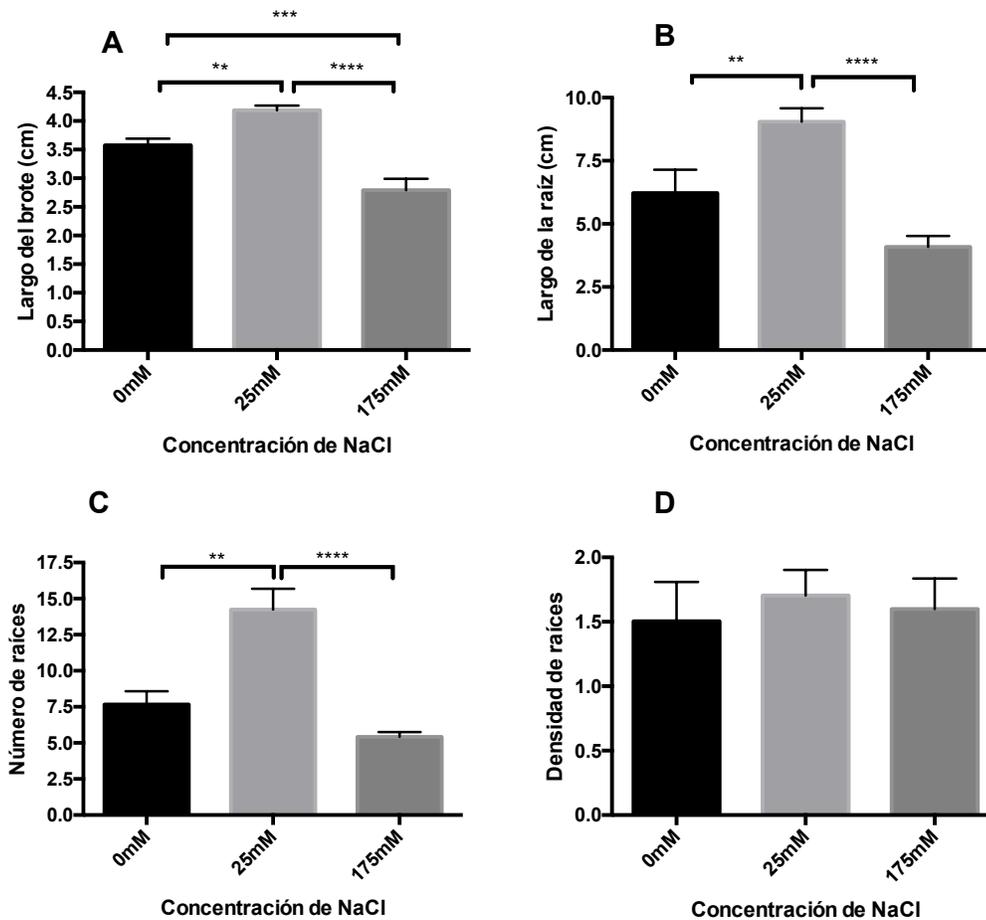


Figura 3: Respuesta fisiológica de brotes y raíces en respuesta a diferentes intensidades de estrés salino.

Efecto de la concentración de NaCl (0, 25 y 175 mM) en el crecimiento de plántulas de *S. lycopersicum* cultivar Moneymaker . A) Largo del brote. B) Largo de la raíz. C) Número de Raíces. D) Densidad de raíces. Cada * indica diferencia significativa entre cada tratamiento (Tukey test, $p < 0.05$), las barras indican el error estándar ($n = 12$)

Para determinar la dependencia que existe entre la concentración de NaCl y los parámetros analizados en caracterización fisiológica de las plantas se obtuvo la relación entre cada uno de ellos, lo que se puede observar en la Figura 4. Para cada

gráfico se trazó una línea de tendencia y se obtuvo el valor de R^2 , de esta manera se observa que el largo del brote, el largo de la raíz y el número de raíces secundarias están correlacionados de forma lineal con el aumento en la concentración de NaCl, con un valor R^2 de 0.9, 0.8 y 0.9 respectivamente. Esta relación es inversamente proporcional ya que cada parámetro disminuye cuando la concentración de NaCl aumenta. Estos datos coinciden con los resultados de otros investigadores, por ejemplo Bonomelli *et al.* (2018) mostraron que las plantas de aguacate cv. Hass en los tratamientos sin estrés salino produjeron plantas que fueron significativamente más altas que aquellas expuestas a tratamientos con sal y tratamientos con sal más extracto de algas marinas; aunque estas diferencias cambiaron en el tiempo, solo los tratamientos sin estrés por sal terminaron siendo más altos que los de otros tratamientos. De igual forma coincide con los datos obtenidos por Kanokwan, *et al.* (2015) cuya investigación reportó que todos los brotes de plántulas de tomate cultivar Puangphaka tratados con sal fueron significativamente más cortos que el grupo control y la longitud de los brotes tendió a disminuir según la concentración de NaCl en forma dependiente de la dosis, especialmente a concentraciones de NaCl de 50 a 100 mM. Adicionalmente, el análisis estadístico determinó que la densidad de raíces y la concentración de NaCl no están correlacionados entre si. Por otro lado se realizó una matriz de correlaciones donde se determinó que el largo del brote tiene una correlación positiva tanto con el largo de la raíz principal, así como con el número y densidad de raíces. Todos los valores p obtenidos indicaron diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 1: Matriz de correlaciones entre los parámetros analizados de la caracterización de plantas (largo del brote, largo de la raíz, número de raíces secundarias y densidad de raíces) y la concentración de NaCl

Variable	Concentración de NaCl	Largo del brote	Largo de raíz	Número de raíces	Densidad de raíces
Concentración de NaCl	1	-0,96	-0,87	-0,92	-0,8
Largo del brote	-0,96	1	0,82	0,93	0,86
Largo de raíz	-0,87	0,82	1	0,79	0,63
Número de raíces	-0,92	0,93	0,79	1	0,95
Densidad de raíces	-0,8	0,86	0,63	0,95	1

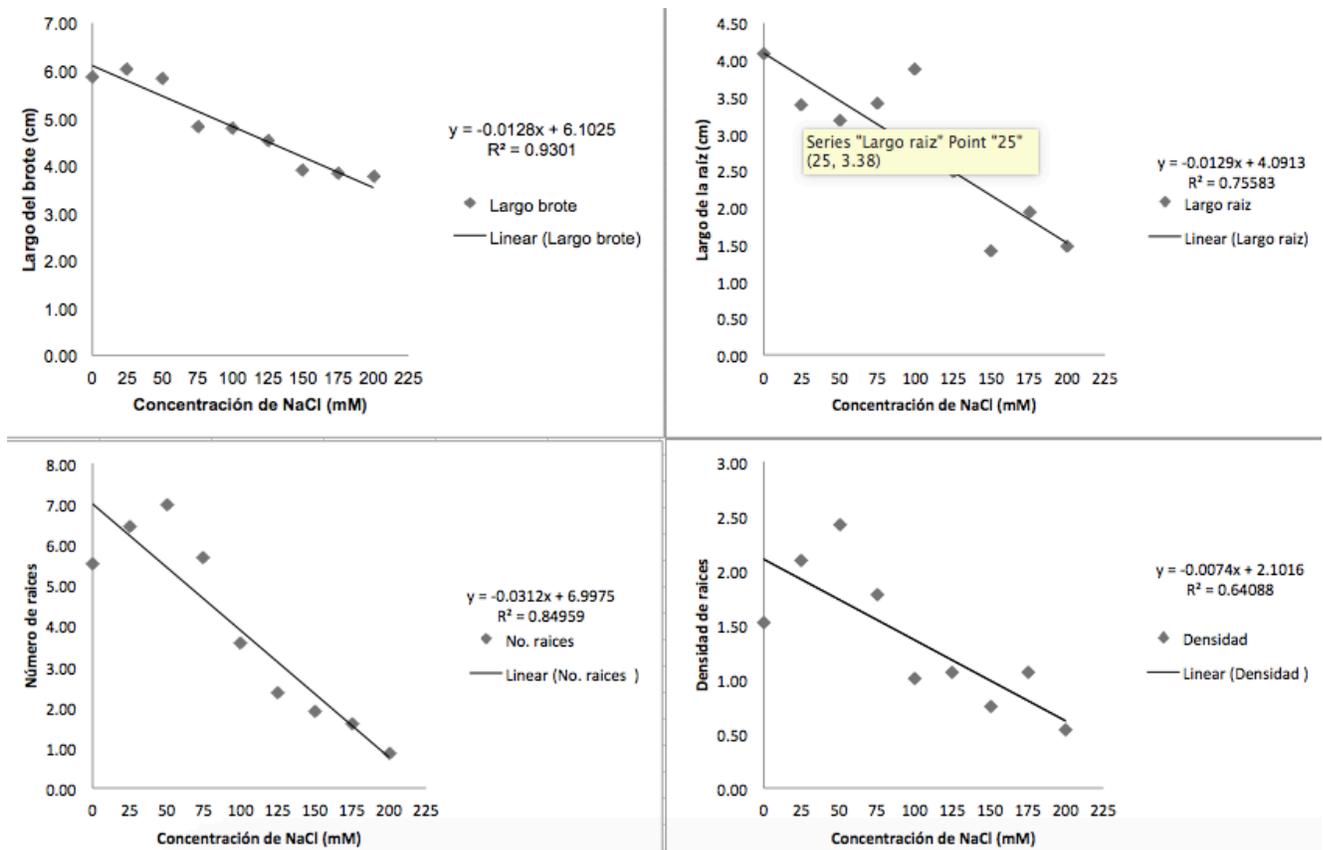


Figura 4: Comportamiento de los parámetros analizados en la caracterización de plantas

Comportamiento de los parámetros analizados en la caracterización de plantas de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker correlacionados con la concentración de NaCl. Para cada grafico se muestra el valor de R^2 y la ecuación de la curva. A) Largo del brote, B) Largo de la raíz, C) Número de raíces, D) Densidad de raíces.

b) Concentración de Na⁺

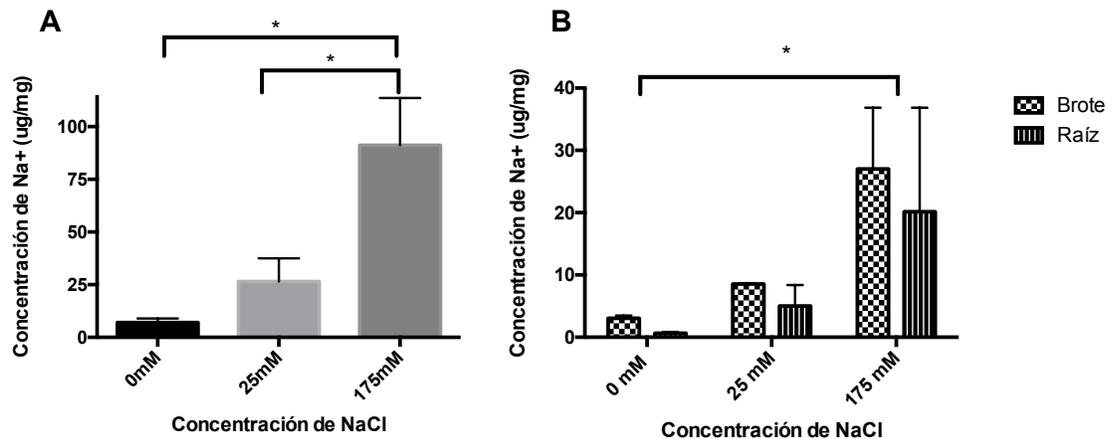


Figura 5: Concentración de iones de Na⁺

Concentración de iones de Na⁺ en las plántulas expuestas a 0, 25 y 175 mM. A) muestra la concentración de Na⁺ en la planta completa. B) muestra la concentración de Na⁺ en raíces y en el brote. Cada * indica diferencia significativa (Fisher test, p<0.05), las barras indican el error estándar (n= 12)

La concentración de iones Na⁺ es un indicador de la tolerancia que pueden presentar ciertas especies ante el estrés causado por NaCl. En los resultados de la Figura 5 se muestra la acumulación de iones Na⁺ para el tejido aéreo, tejido radicular y planta completa en los tres tratamientos 0, 25 y 175 mM. En este estudio se observó que la acumulación de iones Na⁺ es significativa solamente cuando las plantas se exponen a concentraciones tóxicas de NaCl (175 mM); y se determinó que la concentración de iones Na⁺ tiene una tendencia a ser mayor en la parte aérea en comparación con la parte radicular para los tres tratamientos, con diferencia significativa entre el grupo control y el tratamiento de 175 mM de NaCl (Fisher test, p<0.05). Esto puede deberse a que la inhibición del crecimiento de la raíz y la proliferación de la raíz, podría reducir considerablemente el área superficial de las raíces y de esta manera afectar la capacidad de absorción del sistema radicular

(Bonomelli et al., 2018). Las concentraciones altas de iones Na^+ implican un estrés relevante para la planta ya que afecta el intercambio gaseoso, la fluorescencia de la clorofila, así como la disponibilidad de iones Ca^{2+} y K^+ ya que reduce su transporte y movilidad (Bonomelli et al., 2018). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los de la Torre-González et al. (2017), en su investigación concluyeron que la disminución de la biomasa y la tasa relativa de crecimiento bajo estrés salino esta relacionada con la acumulación de iones Na^+ y el déficit de K^+ . Por otro lado, Khaliq et al. (2015) en su trabajo demostraron que el estrés salino afecta a varios cultivos, como la alfalfa, debido a la gran acumulación de iones Na^+ . Los cultivares o genotipos más tolerantes al estrés salino suelen acumular menos Na^+ en los tejidos y esto se debe a que probablemente esas plantas utilizan estrategias como la compartimentalización de Na^+ en las vacuolas o a la inmovilización del ion (Li et al., 2010).

c) Efecto del estrés salino en peso fresco y peso seco de las plántulas

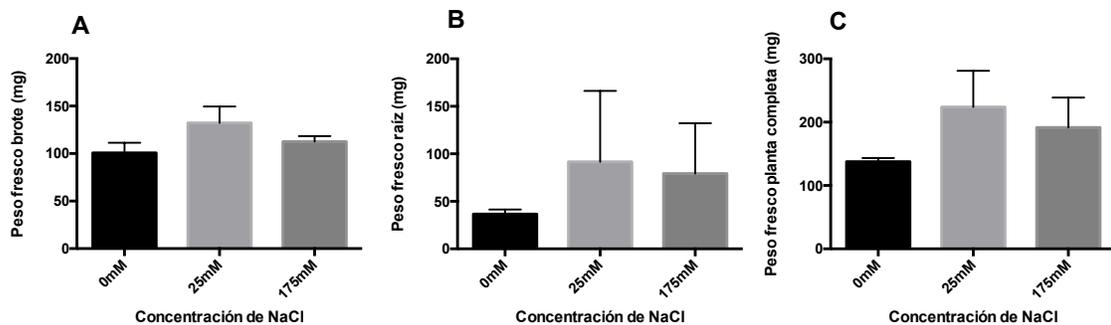


Figura 6: Peso fresco de plántulas expuestas a NaCl

Peso fresco de A) brote, B) raíz y C) planta completa de plántulas de tomate cv. Moneymaker crecidas *in vitro* después de 10 días de tratamiento, expuestas a diferentes concentraciones de NaCl (0, 25 y 175 mM). Las barras indican el error estándar (n=12) y no hubo diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey test, $p < 0.05$)

Las hojas y raíces fueron separadas y pesadas antes y después de ser secadas para obtener el peso fresco y seco de las muestras, de esta manera se calculó el contenido de agua (WC) de las plántulas. En la Figura 6 se muestra el peso fresco obtenido para el brote (Figura 6A), raíz (Figura 6B) y planta completa (Figura 6C) a los 10 días de tratamiento con NaCl y el tratamiento control. Existe una clara tendencia en la que se observa mayor materia fresca en la concentración de 25 mM de NaCl y menor peso de materia fresca en las plantas control. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Karimi *et al.* (2005) en la que reportaron que no hubo diferencias significativas en el peso fresco de *Kochia prostrata* expuesta a concentraciones de NaCl hasta 150 mM, las diferencias significativas se empiezan a observar a partir de los 200 mM. La alta concentración de NaCl inhibe el crecimiento de las plantas debido a la toxicidad de NaCl o al bajo potencial osmótico. El contenido de agua (WC), calculado de la siguiente forma: $WC=100*((\text{Peso fresco}-\text{Peso seco})/\text{Peso fresco})$ fue 93%, 92% y 93% para las concentraciones de 0, 25 y 175 mM de NaCl respectivamente. Estos datos concuerdan con los obtenidos en el trabajo de Gharbi *et al.* (2017) donde compararon los efectos de la salinidad en *Solanum chilense* y *Solanum lycopersicum* y reportaron que la salinidad no afecta el contenido de agua de las hojas en ninguna de las dos especies, a pesar de que afecta otros factores como biomasa y tamaño de la planta. Un mecanismo de defensa que la planta presenta ante este estrés es conservar suficiente agua de manera que se produzca un ajuste osmótico. Esta puede ser la razón por la cual no existe diferencia significativa entre el peso fresco de las plantas de los tres tratamientos (0, 25 y 175 mM de NaCl).

d) Distribución de la biomasa

Uno de los principales mecanismos con los cuales las plantas responden ante el estrés ambiental es la asignación de nueva biomasa a los órganos que adquieren los recursos mas fuertemente limitantes (Ma et al., 2017). En la Figura 7 se observa que a las tres concentraciones de NaCl la planta acumula mayor cantidad de biomasa en la parte aérea que en la parte radicular. Sin embargo; aunque la parte aérea aun tenga mayor cantidad de biomasa, se observa que a 25 mM de NaCl la planta empieza a

acumular mayor cantidad de biomasa en la parte radicular, aunque la diferencia no es significativa en comparación con los otros tratamientos. Este resultado se debe a que en estadios tempranos, antes de llegar a la madurez la planta asigna demasiada biomasa a la raíz para hacer frente al estrés a través de la acumulación de biomasa a los órganos que se ven mayormente afectados. No obstante a 175 mM la planta ya no es capaz de resistir el estrés, por lo cual los órganos más afectados, las raíces, presentan menos acumulación de biomasa y por la misma razón a 200 mM se inhibe casi completamente el crecimiento de raíz principal y la proliferación de raíces secundarias. En condiciones normales la planta tiene el 80% de su biomasa acumulada en la parte aérea mientras que el 20% representa la parte radicular, a medida que aumentan las concentraciones de NaCl la biomasa de la parte aérea se disminuye a un 60% y la parte radicular empieza a aumentar a 40%, estos porcentajes se mantuvieron constantes tanto para la concentración de 25 y 175 mM de NaCl. Estos resultados coinciden con varios trabajos como los de la Torre-González *et al.* (2017), Gharbi *et al.* (2017) y Chang *et al.* (2018) donde reportaron que las concentraciones a niveles tóxicos de NaCl causan disminución en la biomasa en plantas de tomate; a pesar de que la variación de la proporción entre la parte aérea y la parte radicular generalmente depende del cultivar con el que se este trabajando.

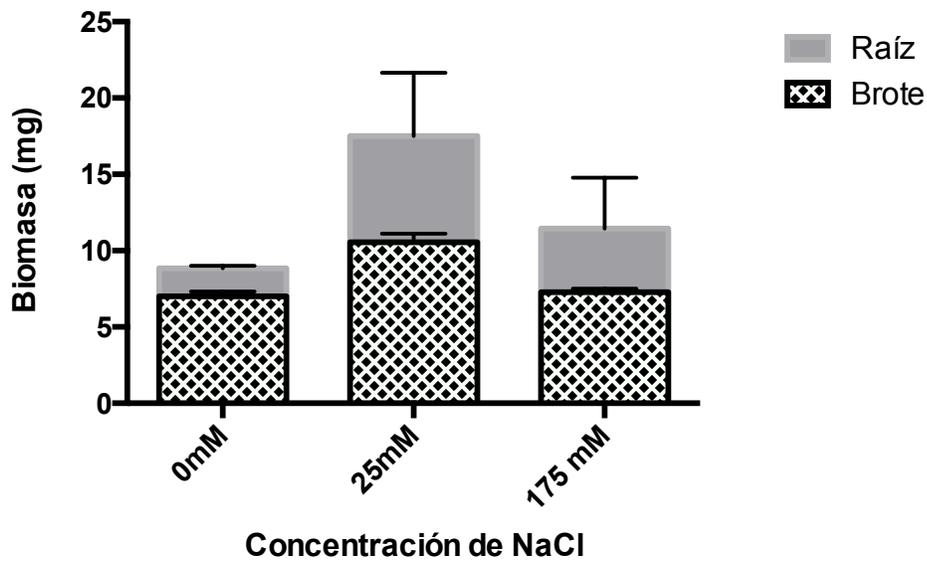


Figura 7: Acumulación de biomasa en tejido aéreo y tejido radicular

Acumulación de biomasa en tejido aéreo y tejido radicular de las plantas expuestas a diferentes concentraciones de sal 0, 25 y 175 mM. Las barras indican el error estándar (n=2), no hubo diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey test, $p < 0.05$)

e) Expresión de genes que responden a hormonas

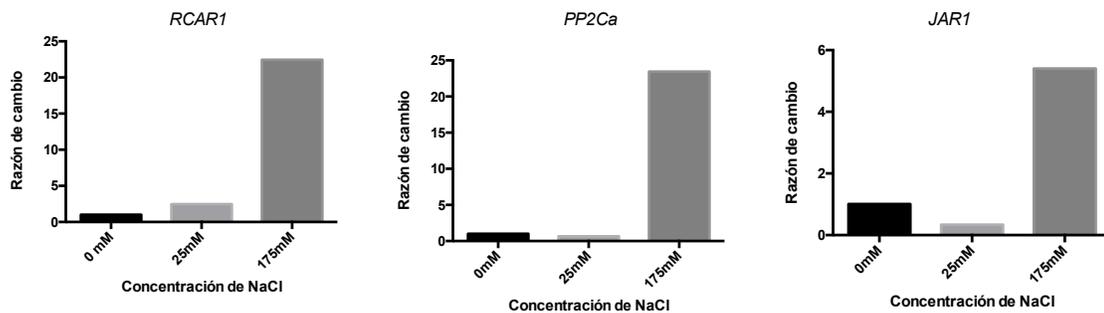


Figura 8: Expresión de los genes *RCAR1*, *PP2Ca* y *JAR1*

En varios estudios se sugiere que la tolerancia al estrés salino que presentan ciertas especies podría estar ligado a la respuesta hormonal que esta tiene, por lo cual se analizaron genes en respuesta a ABA y jasmonatos a través del método de qPCR. En la Figura 8 se observa la expresión génica de *RCAR1* (*REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR 1*), *PP2Ca* (*2C-TYPE PROTEIN PHOSPHATASE*) y *JAR1* (*JASMONIC ACID-AMIDO SYNTHETASE*). Los dos primeros genes responden a ABA, el primero codifica por el receptor y el segundo gen codifica para una proteína fosfatasa, por su lado JAR codifica para una proteína involucrada en la biosíntesis de jasmonato. El ácido abscísico es producido bajo condiciones de estrés osmótico y tiene un rol importante en la respuesta de las plantas a estrés abiótico (Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki, 2013). En este trabajo se logró comparar la expresión génica de *RCAR* y *PP2Ca* en las tres concentraciones de NaCl (0, 25 y 175 mM), como era esperado a 175 mM la expresión de los genes que responden a ABA tiende a ser a mayor en comparación con la expresión de los genes de las plantas que fueron tratadas con 25 y 0 mM de NaCl. La razón de cambio para *RCAR* en las plantas con 175 mM fue 22.45 veces mayor y para *PP2Ca* fue 23.45 mayor. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el trabajo de Gharbi *et al.* (2017) donde concluyeron que la salinidad incrementa fuertemente los niveles de ABA en hojas de *S. lycopersium* y *S. chilense*, dando como resultado una concentración 3 veces más alta en plantas estresadas que en las plantas control, de igual forma Amjad *et al.* (2014) reportaron que ABA y etileno aumentan significativamente al aumentar los niveles de NaCl tanto en los fenotipos tolerantes así como en los sensibles a sal de la especie *S. lycopersicum*. De igual manera en la figura 8 se muestra la tendencia del gen JAR1 a aumentar de forma significativa bajo concentraciones tóxicas de NaCl (175 mM); sin embargo, este gen se expresó 5.4 veces más en concentraciones tóxicas en comparación con el grupo control, esto se explica debido a que las plantas tienden a acumular jasmonatos rápidamente cuando se encuentran bajo estrés abiótico pero principalmente bajo estrés biótico. Por otro lado se observa que JAR1 disminuye su expresión a una razón de 0.33, debido a que esta concentración probablemente no

representa una condición de estrés para la planta. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Pedranzani, *et al.* (2003) donde demostraron que los cambios en la concentración de jasmonato endógena en respuesta a sal son diferentes de acuerdo a los genotipos, pero que los niveles aumentan conforme aumenta el estrés.

4. Conclusiones

Las concentraciones mayores a 50 mM de NaCl causan estrés salino en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), desencadenando de esta manera una red de respuestas que la planta utiliza para hacer frente a un determinado tipo de estrés abiótico. Mediante este estudio se pudo concluir que la relación entre el largo del brote y la concentración de NaCl generalmente es inversamente proporcional; es decir a medida que aumenta la concentración de NaCl a la que se exponen las plántulas, menor es el tamaño de la planta, tanto de la parte aérea como de la parte radicular. Adicionalmente, se concluye que la parte radicular de las plantas también se ve afectada ya que disminuye el largo de la raíz principal, así como el número de raíces secundarias; sin embargo, la densidad es un parámetro que suele mantenerse incluso a concentraciones altas de NaCl. Interesantemente, en este trabajo se concluye que la concentración de 25 mM de NaCl puede llegar a estimular el crecimiento de las brotes de las plantas y también de las raíces, y que esta respuesta es genético dependiente. La concentración óptima, 25 mM de NaCl, provocó el aumento en 3 de los 4 parámetros analizados durante la caracterización: largo del brote, largo de la raíz principal y número de raíces secundarias. Adicionalmente, al exponer las plantas a 25 mM de NaCl se obtuvo mayor biomasa y peso fresco; y la concentración de Na^+ fue significativamente menor en comparación con las concentraciones de iones de las plantas expuestas a 175 mM de NaCl, lo que implica menor competencia para los nutrientes y mas disponibilidad de los mismos. Los niveles de expresión de los genes que responden a las hormonas vegetales ácido abscísico y jasmonatos son significativamente mayores en la concentración de 175 mM de NaCl en comparación con las plantas del grupo control, demostrando de esta forma la respuesta que

desencadena la planta ante el estrés salino; no obstante, a 25 mM la respuesta de expresión génica no es completamente clara ya que la expresión de *RCAR1* es mayor en las plantas expuestas a 25 mM en comparación con el grupo control, sin embargo la expresión de *PP2Ca* es menor al comparar los dos tratamientos, lo cual probablemente se debe a que la planta no desencadena una respuesta de estrés porque las concentraciones de NaCl son menores a 50 mM y como se pudo observar, las concentraciones adecuadas incluso podrían tener un efecto positivo.

Resumen

El cambio climático, la excesiva fertilización y el uso de agua de baja calidad inducen condiciones de estrés abiótico en las plantas, dentro de los cuales se encuentra el estrés salino que representa un factor limitante para el crecimiento de las plantas. El tomate es uno de los cultivos con mayor importancia económica alrededor del mundo y la capacidad de algunos cultivares para tolerar la salinidad esta determinada por los cambios fisiológicos en relación con la cascada de señalización que se desencadena gracias a la regulación de genes que responden a hormonas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es demostrar que las concentraciones no toxicas de NaCl podrían estimular el crecimiento del largo del brote y el tamaño de la raíz principal así como también la proliferación de raíces secundarias en plantas de *Solanum lycopersicum* cultivar Moneymaker. Los resultados obtenidos indicaron que la concentración de 25 mM estimula el crecimiento del brote y el largo de la raíz en un 17% y 45% respectivamente. Por otro lado, las concentraciones toxicas de NaCl (175 mM) disminuyen el crecimiento del brote en un 21% y el largo de la raíz en un 34%. El contenido de biomasa fue mayor en las plantas expuestas al tratamiento con 25 mM NaCl, mientras que la concentración de iones Na^+ fue significativamente mayor en las plantas del tratamiento con 175 mM de NaCl. Con respecto a los genes que responden a hormonas, se analizaron *RCAR1* (*REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR 1*), *PP2Ca* (*2C-TYPE PROTEIN PHOSPHATASE*) para ácido abscísico y *JAR1* (*JASMONIC ACID-AMIDO SYNTHETASE*) para jasmonato, la expresión de estos genes fue significativamente mayor en las plantas con 175 mM de NaCl. Como conclusión las concentraciones no toxicas de NaCl podrían ser un estímulo positivo para el crecimiento de la plantas de tomate, dependiendo el cultivar, ya que la respuesta que se desarrolla ante un estrés específico es genético dependiente.

Palabras clave: Estrés salino, raíces laterales, *Solanum lycopersicum*, hormonas vegetales

5. Bibliografía

- Amjad, M., J. Akhtar, M. Anwar-ul-Haq, A. Yang, S.S. Akhtar, and S.E. Jacobsen. 2014. Integrating role of ethylene and ABA in tomato plants adaptation to salt stress. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 172: 109–116. doi: 10.1016/j.scienta.2014.03.024.
- Bell, H.L., and J.W. O’Leary. 2003. of Salinity on Growth and Cation Accumulation of. *Ame* 90(10): 1416–1424.
- Bonomelli, C., V. Celis, G. Lombardi, and J. Mártiz. 2018. Salt stress effects on avocado (*persea americana* mill.) plants with and without seaweed extract (*ascophyllum nodosum*) application. *Agronomy* 8(5). doi: 10.3390/agronomy8050064.
- Chang, T.T., Y.J. Zhang, H.L. Xu, X.H. Shao, Q.C. Xu, F.L. Li, L. Yu, and Z. Zhang. 2018. Osmotic adjustment and up-regulation expression of stress-responsive genes in tomato induced by soil salinity resulted from nitrate fertilization. *Int. J. Agric. Biol. Eng.* 11(3): 126–136. doi: 10.25165/j.ijabe.20181103.2952.
- Chaves, M.M., J. Flexas, and C. Pinheiro. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* 103(4): 551–560. doi: 10.1093/aob/mcn125.
- Chini, A., S. Fonseca, G. Fernández, B. Adie, J.M. Chico, O. Lorenzo, G. García-Casado, I. López-Vidriero, F.M. Lozano, M.R. Ponce, J.L. Micol, and R. Solano. 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448(7154): 666–671. doi: 10.1038/nature06006.
- Fahad, S., S. Hussain, A. Matloob, F.A. Khan, A. Khaliq, S. Saud, S. Hassan, D. Shan, F. Khan, N. Ullah, M. Faiq, M.R. Khan, A.K. Tareen, A. Khan, A. Ullah, N. Ullah, and J. Huang. 2015. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant Growth Regul.* 75(2): 391–404. doi: 10.1007/s10725-014-0013-y.
- Gharbi, E., J.P. Martínez, H. Benahmed, I. Hichri, P.I. Dobrev, V. Motyka, M. Quinet, and S. Lutts. 2017. Phytohormone profiling in relation to osmotic adjustment in NaCl-treated plants of the halophyte tomato wild relative species *Solanum chilense*

- comparatively to the cultivated glycophyte *Solanum lycopersicum*. *Plant Sci.* 258: 77–89. doi: 10.1016/j.plantsci.2017.02.006.
- Hu, Y., and U. Schmidhalter. 2005. Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168(4): 541–549. doi: 10.1002/jpln.200420516.
- Kanokwan, S., S. Tanatorn, and K. Aphichart. 2015. Effect of salinity stress on antioxidative enzyme activities in tomato cultured in vitro. *Pakistan J. Bot.* 47(1): 1–10.
- Karimi, G., M. Ghorbanli, H. Heidari, R.A. Khavari Nejad, and M.H. Assareh. 2005. The effects of NaCl on growth, water relations, osmolytes and ion content in *Kochia prostrata*. *Biol. Plant.* 49(2): 301–304. doi: 10.1007/s10535-005-1304-y.
- Khaliq, A., M. Zia-ul-Haq, F. Ali, F. Aslam, A. Matloob, A. Navab, and S. Hussain. 2015. Salinity Tolerance in Wheat Cultivars Is Related to Enhanced Activities of Enzymatic Antioxidants and Reduced Lipid Peroxidation. *Clean - Soil, Air, Water* 43(8): 1248–1258. doi: 10.1002/clen.201400854.
- de la Torre-González, A., A. Albacete, E. Sánchez, B. Blasco, and J.M. Ruiz. 2017a. Comparative study of the toxic effect of salinity in different genotypes of tomato plants: Carboxylates metabolism. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 217: 173–178. doi: 10.1016/j.scienta.2017.01.045.
- de la Torre-González, A., E. Navarro-León, A. Albacete, B. Blasco, and J.M. Ruiz. 2017b. Study of phytohormone profile and oxidative metabolism as key process to identification of salinity response in tomato commercial genotypes. *J. Plant Physiol.* 216(May): 164–173. doi: 10.1016/j.jplph.2017.05.016.
- Li, R., F. Shi, K. Fukuda, and Y. Yang. 2010. Effects of salt and alkali stresses on germination, growth, photosynthesis and ion accumulation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 56(5): 725–733. doi: 10.1111/j.1747-0765.2010.00506.x.
- Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25(4): 402–408. doi:

- 10.1006/meth.2001.1262.
- Ma, T., W. Zeng, Q. Li, X. Yang, J. Wu, and J. Huang. 2017. Shoot and Root Biomass Allocation of Sunflower Varying with Soil Salinity and Nitrogen Applications. *Agron. J.* 109(6): 2545. doi: 10.2134/agronj2017.04.0194.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. 03_Murashige Skoog1962.pdf. : 26.
- Nakashima, K., and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2013. ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Rep.* 32(7): 959–970. doi: 10.1007/s00299-013-1418-1.
- Pattison, R.J., and C. Catalá. 2012. Evaluating auxin distribution in tomato (*Solanum lycopersicum*) through an analysis of the PIN and AUX/LAX gene families. *Plant J.* 70(4): 585–598. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04895.x.
- Pedranzani, H., G. Racagni, and S. Alemano. 2003. Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth ...*: 149–158. doi: 10.1023/a:1027311319940.
- Poorter, H., and O. Nagel. 2000. a Ustralian J Ournal of. *Aust. J. Plant Physiol.* 27(6): 12. doi: 10.1071/PP97167.
- Raja, V., U. Majeed, H. Kang, K.I. Andrabi, and R. John. 2017. Abiotic stress: Interplay between ROS, hormones and MAPKs. *Environ. Exp. Bot.* 137: 142–157. doi: 10.1016/j.envexpbot.2017.02.010.
- Sierra, C. 2015. Salinidad de los suelos del Norte Chico. *Cent. Inf. Recur. Nat.* (32): 35–38.
- Suárez, L.C., and R. Fernández, Alexander Álvarez Fonseca Ramírez. 2012. Revisión bibliográfica Review Notes of the influence of some plant growth regulators in the abiotic stress plant response Licet Chávez Suárez , Alexander Álvarez Fonseca. 33(3): 47–56.
- Tomescu, D., R. Şumălan, L. Copolovici, and D. Copolovici. 2017. The influence of soil salinity on volatile organic compounds emission and photosynthetic parameters of *Solanum lycopersicum* L. varieties. *Open Life Sci.* 12(1): 135–142. doi: 10.1515/biol-2017-0016.

- Wang, H.M., W.C. Yin, C.K. Wang, and K.Y. To. 2009. Isolation of functional RNA from different tissues of tomato suitable for developmental profiling by microarray analysis. *Bot. Stud.* 50(2): 115–125.
- Wasternack, C., and S. Song. 2017. Jasmonates: Biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *J. Exp. Bot.* 68(6): 1303–1321. doi: 10.1093/jxb/erw443.
- Xia, X.-J., Y.-H. Zhou, K. Shi, J. Zhou, C.H. Foyer, and J.-Q. Yu. 2015. Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 66(10): 2839–2856. doi: 10.1093/jxb/erv089.
- Zolla, G., Y.M. Heimer, and S. Barak. 2010. Mild salinity stimulates a stress-induced morphogenic response in *Arabidopsis thaliana* roots. *J. Exp. Bot.* 61(1): 211–224. doi: 10.1093/jxb/erp290.

6. Anexos

Tabla 2: Partidores para qRT-PCR de PP2, RCAR1, JAR1 y UBI

Hormonas	Genes	Partidor 1 (5' - 3')	Partidor 2 (5' - 3')
ABA	PP2Ca	TCGTGCCGTCCTCTGTAGAA	CGGCCACCAGCTTCTTGAT
	RCAR1	GCTGTGCAAGACAGGACAGA	ATCGGTGTGGGCTTTCATGG
JA	JAR1	AATGTAGATGGCGTGGAGGC	CGGGAGTGCGATTGTGGAAT
Normalizador	UBI	GCCGACTACAACATCCAGAAGG	TGCAACACAGCGAGCTTAACC

