

**Primado de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*)
con soluciones nutritivas**

**Priming of tomato seeds (*Solanum lycopersicum*) with
nutrient solutions.**



Trabajo de Fin de Grado

ERIC LEANDRO

MONTESDEOCA TACORONTE

Tutorizado por Francisco J. Valdés González y David Jiménez Arias.

Grado en Biología. Junio 2018.

Contenido

1. Resumen	2
1.2 Abstract	2
2. Introducción	3
2.1 Estado actual de la productividad vegetal.	3
2.2. Soluciones y estrategias.	6
3. Objetivos.	8
3.1. Objetivo general.	8
3.2. Objetivos específicos.	8
4. Materiales y métodos	8
4.1. Material biológico.	8
4.1.1. Breve descripción anatómica del tomate cultivado.....	10
4.2 Reactivos.....	12
4.2.1. Como elicitores:	12
4.2.2. Como agente para establecer el estrés salino:	13
5. Diseño experimental.	14
5.1. Germinación en placa.....	14
5.2 Tratamientos empleados.....	15
5.2.1 Concentración óptima de elicitores.....	15
5.2.2 Tratamiento con estrés salino.....	16
5.3. Cálculos realizados.	17
5.4 Estadística.	17
6. Resultados y discusión	18
6.1. Condiciones óptimas para la germinación en placa.	18
6.2 Optimización del tratamiento inicial.	18
6.2 Tratamiento con estrés salino.....	22
7. Conclusiones	26
7.1 Conclusions	26
8. Agradecimientos.	26
9. Bibliografía	27

1. RESUMEN

El tomate (*S. lycopersicum*) está considerado, en términos económicos, la especie hortícola más importante del mundo. Sin embargo, al ser una especie glicófita (poco tolerante a la sal) presenta una pérdida de valor comercial al ser cultivada en suelos con alto contenido salino, algo común en la mayoría de los suelos de cultivo. El estrés salino provoca numerosos efectos negativos en las plantas, sobre todo en la etapa de germinación de semillas. En este trabajo se pretende exponer semillas de tomate a diferentes sales minerales a modo de elicitores (KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y KH_2PO_4) para mejorar su rendimiento en la germinación en condiciones de laboratorio con visiones a usos comerciales para cultivo en suelos. Además, se obtendrá una concentración óptima de cada compuesto (elicitor) y se realizará un cultivo de semillas tratadas con esas concentraciones frente a un gradiente de NaCl , con el objetivo de comprobar su tolerancia frente a situaciones de salinidad extrema y poder mejorar su capacidad germinativa.

Palabras clave: tomate, salinidad, elicitor, NaCl , sal, germinación, priming

1.2 ABSTRACT

Tomato (*S. lycopersicum*) is considered, in economic terms, the most important horticultural species in the world. However, being a glycophytic species (which can only tolerate relatively low concentrations of salt), it has a loss of commercial value when it is cultivated in soils with a high salt content, which is common in most of cultivated soils. Saline stress causes negative effects in plants, especially in the stage of germination of seeds. This research aims to expose tomato seeds to different salts as elicitors (KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and KH_2PO_4) in order to improve their germination performance under laboratory conditions with visions to commercial uses for soil cultivation. In addition, an optimum concentration of each solution will be obtained, and seeds treated with these optimal solutions will be cultivated against a NaCl gradient, to check their tolerance to situations of extreme salinity as well as improve their germination capacity.

Keywords: tomato, salinity, elicitor, NaCl , salt, germination, priming

2. INTRODUCCIÓN.

Las Naciones Unidas estimaban en 1950 que la población mundial era de unos 2.600 millones. A finales de 2011 estimaban que la población mundial era de 7.000 millones. Por último, a mediados de marzo de 2018 la población mundial alcanzó los 7.595.183.360 millones, lo que significa que, en menos de 20 años, el número de personas en el mundo ha aumentado en 1.600 millones (ONU). Si se observa con detenimiento, desde los años sesenta del siglo pasado, la población mundial ha crecido a un ritmo de 1.000 millones cada 14 años (**Fig. 1**). Las previsiones más actuales, de acuerdo con los datos de libre acceso del blog “Datos del Banco Mundial” (Banco Mundial), indican que hay un 95 % de probabilidades de que la población mundial llegue a ser de entre 9.500 y 13.300 millones en 2100.

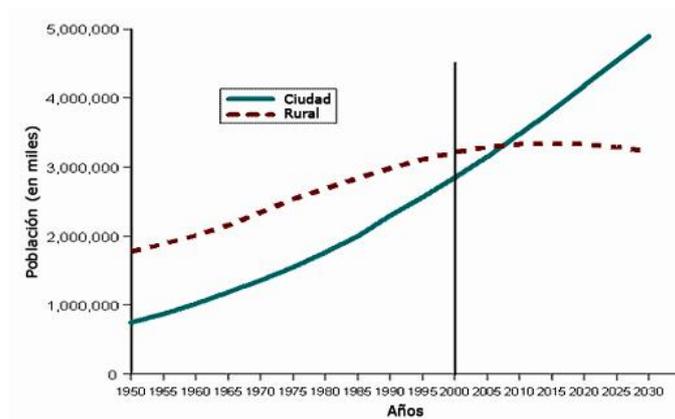


Figura 1. Proyección de crecimiento de población urbana y población rural en el periodo de 1950 a 2030. Banco Mundial (<https://datos.bancomundial.org>).

2.1 ESTADO ACTUAL DE LA PRODUCTIVIDAD VEGETAL.

Esto ha provocado en el seno de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, (mundialmente conocida como FAO), una creciente preocupación acerca de la Seguridad Alimentaria¹, puesto que si queremos asegurar la nutrición de la población en el futuro la producción agrícola debe aumentar entre un 60 y un 110 % (Tilman y col., 2013). Si bien en el último medio siglo se ha mejorado en la

¹ La seguridad alimentaria se da cuando todas las personas tienen acceso físico, social y económico permanente a alimentos seguros, nutritivos y en cantidad suficiente para satisfacer sus requerimientos nutricionales y preferencias alimentarias, y así poder llevar una vida activa y saludable (<http://www.fao.org/economic/ess/ess-fs/es/>).

productividad de los sistemas de cultivos, informes recientes señalan que entre el 24 y el 39 % de las áreas la producción no ha mejorado, es más, en bastantes de ellas ha disminuido drásticamente (Ray y col., 2013). El aumento de productividad es desigual, debido a varios factores, desde van desde los naturales (ambientales o biológicos) a los sociales (**Tabla 1**).

FACTORES QUE AFECTAN A LA PRODUCTIVIDAD VEGETAL

NATURALES	<p>AMBIENTALES: Sequía, salinidad, temperatura, empobrecimiento del suelo, contaminación ...</p> <p>BIOLÓGICOS: virus y viroides, ácaros, bacterias, hongos, nemátodos, insectos (patogénicos y no patogénicos), depredadores (herbívoros, migraciones masivas ...)</p>
SOCIALES	<p>POLÍTICOS/SOCIOLÓGICOS: Inseguridad personal y jurídica, educación para la producción agrícola, investigación para la producción agrícola, canales expeditos para la comercialización de la cosecha...</p> <p>ECONÓMICOS: Financiamiento oportuno y suficiente, los recursos suelo y agua, insumos básicos para la producción agrícola...</p> <p>CULTURALES/TECNOLÓGICOS: Infraestructura de apoyo a la agricultura, maquinarias y equipos agrícolas, un servicio de extensión agrícola y de asistencia técnica...</p>

Tabla 1. Resumen de los posibles factores que afectan a la productividad vegetal.

Cabe citar como ejemplo de esa desigualdad en el incremento productivo, que mientras que en UK (que no ha padecido problemas de abastecimiento hídrico) su productividad se ha duplicado en el último medio siglo, en Australia, por el contrario (donde si han padecido problemas de abastecimiento hídrico), sólo se ha logrado incrementar en un 50% su productividad (Kang y col., 2009). Las pérdidas de rendimientos pueden ser catalogadas dependiendo de su origen: ocasionadas por factores ambientales, lo que se conoce como “estrés abiótico” (estrés hídrico, salino, térmico, etc.); o bien debidos a la interacción con otros organismos (insectos, plantas, hongos, bacterias, etc.), y que se denomina “estrés biótico” (Bohnert y col., 2006).

Respecto a estos factores hay que destacar que, aunque los estreses bióticos causan pérdidas importantes, son los estreses abióticos (sobre todo los de sequía y salinidad) los responsables de las mayores pérdidas de rendimiento de los cultivos (**Fig. 1.1**), y con toda probabilidad las pérdidas debidas a ellos se verán agravadas debido al cambio climático (Mahajan y col., 2005; Kang y col., 2009). Hay que decir que como ambos estreses generan una dificultad para que las plantas puedan acceder al agua que se encuentra en el suelo, la respuesta fisiológica, bioquímica y molecular a ambos es similar (Kumar & Tyagi, 2004).

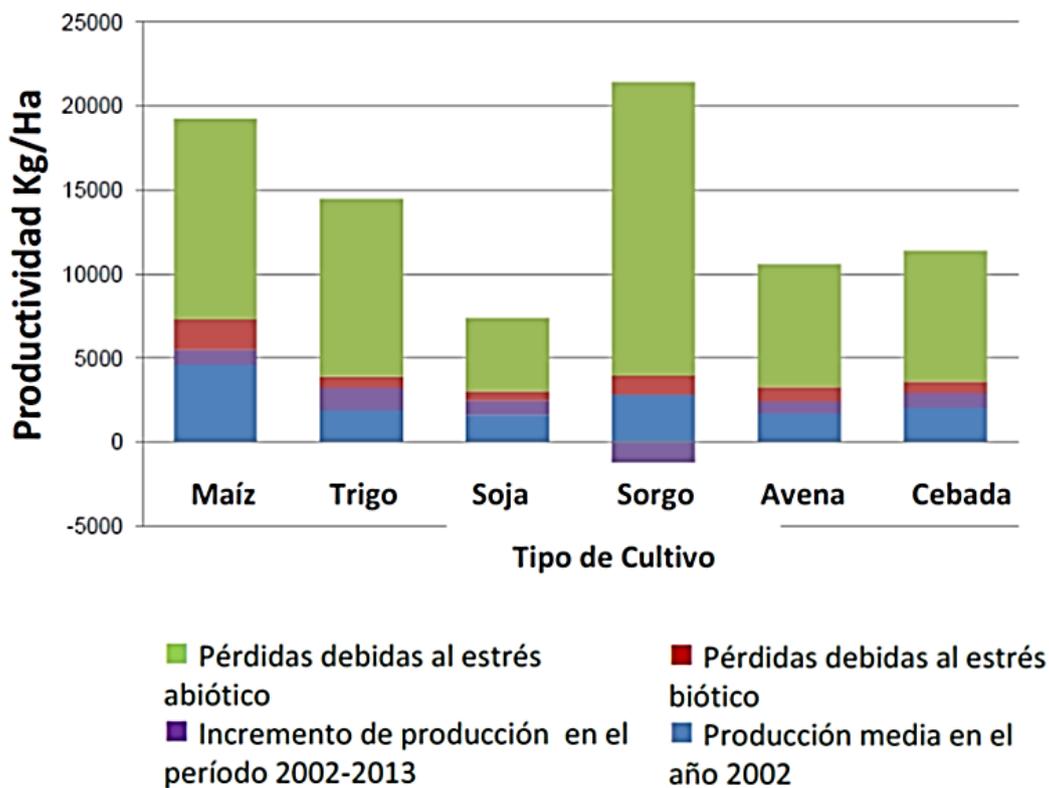


Figura 1.1. Producción y pérdida dadas para diferentes cultivos entre los años 2002 y 2013 (Jimenez-Arias y col., 2016).

Como se puede observar, las pérdidas debidas al estrés (biótico y abiótico) son significativamente mayores que el rendimiento promedio en cultivos económicamente importantes. Por lo tanto, el aumento limitado en el incremento de producción durante en el período 2002 – 2013 enfatiza la necesidad de mejorar los rendimientos de los cultivos en condiciones de estrés, sobre todo de tipo abiótico, siendo estas las mayores causas de pérdidas en productividad, como se deduce de la **Figura 1.1** (Jimenez-Arias y col., 2016).

Ya en 2008, Ashraf y colaboradores señalaban la sequía y la salinidad de suelos y aguas como los principales responsables de las pérdidas de productividad de los cultivos. Se estima que esta merma llega actualmente al 37% de la productividad agrícola total de las tierras cultivables (Munns y Tester, 2008; Reynolds y Tuberosa, 2008).

Dado que, de estos dos tipos de estrés, la mayor pérdida de producción de los cultivos se debe al estrés de tipo abiótico, concretamente a la salinidad (responsable del 20% de las pérdidas), nos lleva a priorizar actuaciones que nos permitan conseguir un aumento de tolerancia de los cultivos. Y dado que existe una creciente alarma acerca de la seguridad alimentaria, el aumento de la tolerancia a la salinidad puede ayudarnos a garantizar la seguridad alimentaria de la población.

2.2. SOLUCIONES Y ESTRATEGIAS.

El problema ha intentado solucionarse hasta ahora mediante la búsqueda de nuevas fuentes de agua de calidad y seleccionando variedades de plantas más resistentes. Pero estas estrategias implican importantes inversiones y la estrecha y coordinada implicación entre agricultores, administraciones y científicos (Tuberosa y col., 2007). Por ello, se han de explorar nuevas estrategias que permitan aumentar los rendimientos en las áreas bajo estrés de sequía y salinidad.

El empleo del llamado efecto “priming”, que se define como “modificaciones genéticas o bioquímicas inducidas por una primera exposición al estrés que conducen a una mayor resistencia al estrés a posteriori” (Conrath, 2011), es una estrategia interesante para mejorar la tolerancia contra el estrés salino en las plantas. Este fenómeno puede ser inducido mediante un tratamiento exógeno con sustancias de origen natural o sintético como, por ejemplo: ácido β -aminobutírico (Jakab y col., 2001), óxido nítrico (Molassiotis y col., 2010), poliaminas (Alcazar y col., 2010) o peróxido de hidrógeno (Molassiotis y Fotopoulos, 2011), por lo que el uso de este tipo de moléculas puede ser una opción para combatir los estreses de tipo abiótico.

En este sentido, el grupo de Investigación² en el que se ha realizado este Trabajo de Fin de Grado, lleva varios años indagando en los mecanismos de las plantas para enfrentarse

² Grupo de Fisiología Vegetal Aplicada (GBVA - Universidad de la Laguna), en conjunto con el Grupo de Activadores de Defensa de la Planta (Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del CSIC).

a las situaciones de estrés salino y, en consecuencia, estudiando compuestos inductores de tolerancia que den a la planta una mayor tolerancia frente a la salinidad. Así, se ha investigado en los últimos años las propiedades de la menadiona sodio bisulfito como inductor de primado, demostrando su eficacia para aumentar la tolerancia bajo el estrés salino tras su aplicación en semilla (Jiménez–Arias y col., 2015), como a nivel foliar (Borges y col., 2003a, 2003b, 2004, 2009, 2014; Carrillo–Perdomo y col., 2016), y también se ha estudiado su efecto a nivel radicular (De Nisi y col., 2006).

Como continuación de dicha línea, en el presente Trabajo de Fin de Grado, se pretende evaluar la eficacia de emplear sales minerales como “agentes de primado” en semillas, de cara a aumentar la tolerancia a la salinidad, que puedan ser empleados en formulados junto con la menadiona sodio bisulfito, con el fin de mejorar la germinación en semillas en condiciones salinas.

Para los ensayos, se han empleado semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. 1794), siendo en términos económicos la planta hortícola más importante del mundo (Bergougnoux, 2014). España es el octavo país productor a nivel mundial, con casi 4’9 millones de toneladas en 2014, produciendo junto a Italia el 62% del total de tomates europeos. El tomate, como la mayoría de las plantas hortícolas, es una especie glicófita (plantas con baja tolerancia a la sal), presentando pérdidas de rendimiento y valor comercial debido a la salinidad (Bergougnoux, 2014).

La germinación y emergencia de la radícula, es una de las etapas más sensibles a la salinidad (Lucero, 1970; Ayers, 1950; Ayers y Haywar, 1948; Bazzigalupi y col., 2008). En el caso del tomate, la germinación de semillas comerciales es rápida y permite, por tanto, una excelente herramienta para identificar agentes para mejorar la tolerancia a la salinidad.

En el presente estudio se discute el efecto de diferentes concentraciones de sales minerales sobre la germinación, y posteriormente la influencia de estas sobre la tolerancia a la salinidad.

3. OBJETIVOS.

3.1. OBJETIVO GENERAL.

- Estudio del efecto en la germinación de semillas de *Solanum lycopersicum* de diferentes macronutrientes.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Optimizar la concentración de macronutrientes en la germinación de semillas de *S. lycopersicum*.
- Estudio del efecto de estos macronutrientes sobre la germinación bajo diferentes concentraciones salinas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

El material biológico empleado como ya se señaló en la Introducción, fueron semillas de *Solanum lycopersicum* L. (1753), concretamente semillas de la variedad “Marmande VR tipo Holanda”. Se adquirieron en formato comercial de la empresa Semillas Batlle S.A. en sobres, bajo el nombre comercial de Tomate Marmande VR tipo Holanda RAF³ (**Fig. 3.1**). Cada sobre contiene 2 gr. de semillas (unas 350 semillas/gr), empleándose en total unas 3200 semillas.

³ RAF hace referencia a las siglas de *Resistente al Fusarium*, un hongo patógeno que afecta a bastantes cultivos de importancia comercial.

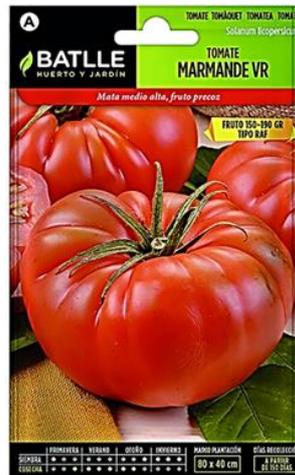


Figura 3.1. Sobre (2.0 gr) de semillas de Tomate Marmande VR tipo Holanda de la casa Batlle S.A.

Se trata de una variedad obtenida a partir de la selección artificial practicada sobre los tomates tradicionales que se plantan al aire libre desde 1969. Su origen se referencia en la Vega de Almería. Es un tomate multilobular, acostillado, cuello verde y con forma ligeramente achatada. El peso de su fruto está entre los 180 y los 200 gr. El porte de la planta es semi-determinado alto, contando con un excelente sabor y un tradicional olor a tomate (**Fig. 3.2**). Muy precoz y fructífero, es muy apreciado para cosecha temprana. Permite su cultivo tanto al aire libre como en invernadero. La calidad de esta variedad es mucho mejor en ciclos de cultivos de otoño-invierno-primavera (siembras a partir de agosto), cosechándose a los 5 o 6 meses.



Figura 3.2.a. - Matas de la variedad Marmande (<http://www.interempresas.net>; 27/3/18).

Figura 3.2.b. - Representación esquemática de una planta de tomate arbustiva (Rubio Izal, 2014).

4.1.1. BREVE DESCRIPCIÓN ANATÓMICA DEL TOMATE CULTIVADO.

El tomate es una planta perenne, de porte arbustivo (**Fig. 3.2**), con variedades que poseen crecimiento determinado (mientras que otras lo tienen indeterminado) que se cultiva como anual. Puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta, y su crecimiento es limitado en las variedades determinadas e ilimitado en las indeterminadas, pudiendo llegar en estas últimas a 10 metros en un año (Rick, 1978).

Las hojas son compuestas, imparipinadas, con siete a nueve folíolos. La inflorescencia es un dicasio compuesto generalmente por cuatro o doce flores. El fruto es una baya de forma globular, ovoide o aplastada, cuyo peso oscila, según variedades, entre 5 y 500 gr. Cuando la planta crece directamente de la semilla, sin sufrir trasplantes, desarrolla una potente raíz principal que le permite adaptarse a ecosistemas semidesérticos, pero cuando la raíz principal se daña, como por ejemplo a consecuencia del trasplante, se desarrolla un sistema de raíces laterales adventicias (Chamarro, 1994).

El tallo principal tiene 2-4 cm de diámetro en la base y está cubierto por tricomas glandulares y no glandulares que salen de la epidermis. Forma de seis a doce hojas que crecen lateralmente, con una filotaxia de 2/5, antes que la yema principal se transforme en una inflorescencia. La ramificación es generalmente simpodial, los ejes sucesivos se desarrollan a partir de la yema axilar del eje precedente y la yema terminal da lugar a la inflorescencia o a ramas abortivas.

La flor del tomate es perfecta, regular e hipógina (**Fig. 3.4**). El cáliz posee cinco o más sépalos verdes que se prenden al fruto incluso hasta después de la maduración. La corola está formada por cinco o más pétalos amarillos y encurvados cuando la flor está abierta. El número de estambres es de cinco, los cuales están soldados formando un cono. Las anteras son cortas y anchas. La flor está unida al eje floral por un pedicelo articulado.

Las flores están agrupadas en inflorescencias que pueden ser simples, bifurcadas o ramificadas. Las formas simples se presentan con mayor frecuencia en la parte inferior de la planta y las ramificadas en la parte superior. El número de flores por inflorescencia es muy variable, en algunos casos excepcionales llegaría a más de 30 flores.

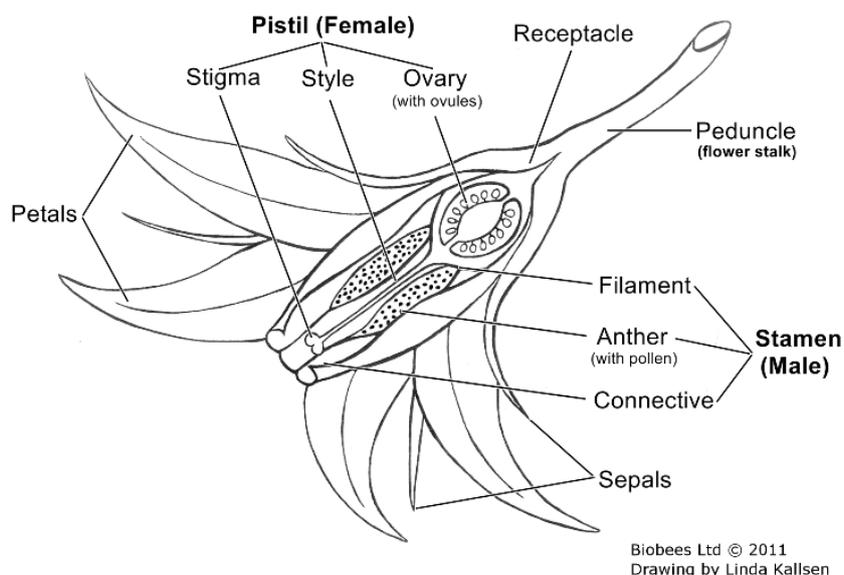


Figura 3.4.- Flor de tomate. Tomado de Linda Kallsen en: <https://www.biobeets.co.nz/Pollination/Greenhouse+Crops/Tomato.html> ; 27/3/18.

Los frutos se presentan agrupados en racimos: en número, tamaño y estado de maduración diferentes. El fruto es una baya, de forma y tamaño muy variable (**Fig. 3.5**). Está compuesto por la película (epidermis o piel), pulpa, placenta y semillas. Internamente los frutos están divididos en lóculos, sitios donde se alojan las semillas, inmersas en el tejido placentario. De acuerdo con el número de lóculos, los frutos pueden ser bi, tri o pluriloculares. Frutos uniloculares son raros. Los frutos maduros pueden ser rojos, rosados o amarillos.

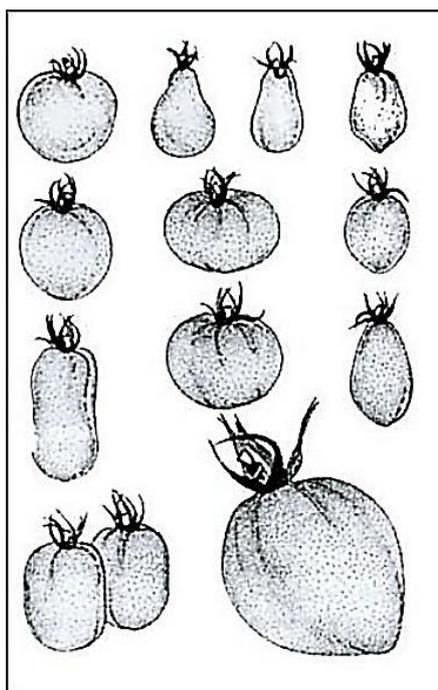


Figura 3.5.- Variabilidad del tamaño y formato de los frutos del tomate (Melo, 1989).

La semilla del tomate (**Fig. 3.6**), tiene forma lenticular con unas dimensiones aproximadas de 5 x 4 x 2 mm y está constituida por el embrión, el endospermo y la testa o cubierta seminal la cual está cubierta de tricomas.

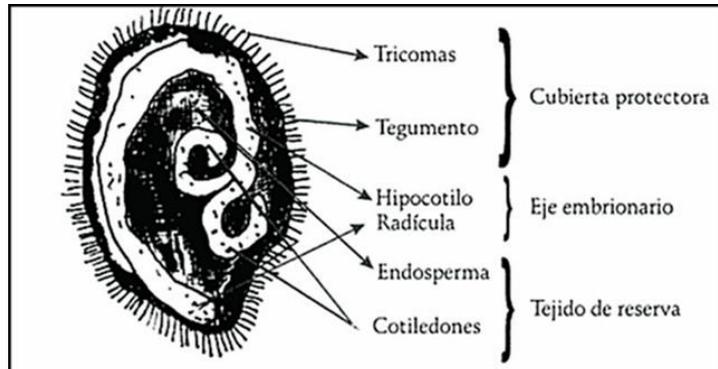


Figura 3.6.-. Sección longitudinal de la semilla de tomate.
(modificado de: www.biologia.edu.ar/botanica ; 27/3/18).

4.2 REACTIVOS

4.2.1. COMO ELICITORES:

- Nitrato de potasio (KNO_3).

Una de las principales funciones del potasio es facilitar el balance eléctrico de la mayoría de los aniones (tanto minerales como orgánicos, como por ejemplo los carboxilatos). Por lo tanto, es esencial para el desarrollo vegetal y para el normal funcionamiento de los tejidos de la planta. Además de tener un papel crítico en los procesos metabólicos, actúa como un regulador osmótico y es en gran parte responsable de numerosos procesos que tienen que ver con la regulación del agua en la planta.

- Dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4).

El fósforo es esencial para todo tipo de vida. Una de sus funciones clave es la transferencia de energía, incluyendo la fotosíntesis, transferencia genética y transporte de nutrientes. El fósforo trabaja dentro de las plantas para estimular el crecimiento de estas desde el inicio de la vida hasta la madurez.

- Nitrato de calcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$).

El calcio, además de su función en la rigidez de la planta, actúa como elemento catalizador de muchas reacciones hormonales, en la defensa contra patógenos y defiende a la planta de fitotoxicidades, dejando claro que influye en la calidad y la producción de las especies cultivadas.

4.2.2. COMO AGENTE PARA ESTABLECER EL ESTRÉS SALINO:

- Cloruro sódico (NaCl).

Se usó cloruro básico debido a que sus iones (sodio y cloro) son los más comunes de la naturaleza (Broecker, 1971) y en presencia de agua se forma con bastante facilidad esta molécula. Esto implica que en la mayoría de los suelos contaminados por sales sea este el principal compuesto y se utilice como referencia para imitar el carácter que presentan los suelos con alta salinidad.

Todos los reactivos fueron de grado pro-análisis, de pureza garantizada de la casa Merck. Los test de germinación se realizaron en Placas Petri estériles de poliestireno (PS) de 90 x 14 mm. Se prepararon con algodón (Hidrófilo, 100% puro) + 2 discos de papel de filtro, todo ello embebido en agua destilada grado-MiliQ, previamente esterilizada en autoclave.

Cabina de siembra: Flujo laminar ADS Laminare con filtro HEPA que nos proporcionará aire limpio (< 0.1 micras).

Cámara de cultivo (Fig. 3.7): Temperatura: 22 ± 1 °C; HR: $75\% \pm 5$; Fotoperiodo: 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad; Intensidad lumínica: $110 \mu\text{mol} \pm 10$, tubo de luz fluorescente (espectro de luz visible).



Figura 3.7. Fotografía de la cámara de cultivo. Facultad de Farmacia de la Universidad de La Laguna (ULL). 17/5/2018

5. DISEÑO EXPERIMENTAL.

5.1. GERMINACIÓN EN PLACA.

Se realizó un cultivo inicial en unas seis placas (120 semillas totales) que fueron puestas en cámara de cultivo durante cinco días. Tres de ellas fueron puestas en condiciones de luz y los tres restantes en condiciones de oscuridad. Además del primer cultivo, se realizó un segundo cultivo idéntico al primero, con la excepción de que las semillas fueron embebidas en agua destilada durante 24 horas antes de su siembra (**Fig. 4.1**).

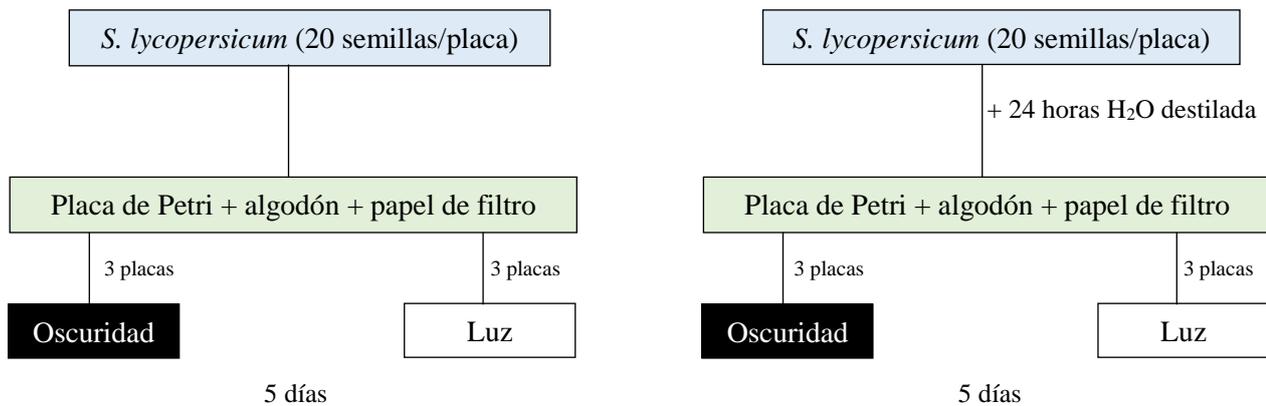


Figura 4.1. Esquema general del cultivo inicial. Serie de tres placas con 20 semillas de *S. lycopersicum*, 120 sin tratamiento previo (Control), 120 con tratamiento de H₂O destilada durante 24 horas (Agua) puestas a cultivar en condiciones de luz (60 control y 60 agua) y oscuridad (60 control y 60 agua) durante 5 días.

5.2 TRATAMIENTOS EMPLEADOS.

5.2.1 CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE ELICITORES.

Una vez finalizados los primeros ensayos, siguiendo un modelo de soluciones nutritivas se usaron tres soluciones madre de 1 L de KNO₃, KH₂PO₄ y Ca(NO₃)₂ para la realización de la segunda parte del trabajo. Cada solución madre contenían 31'39, 17'01 y 88'54 gramos de su respectivo elicitador, usándose como unidad de medida ppm (31390, 17011 y 88540 para cada una). Usando cada una de las soluciones madre, se realizó una dilución en serie para cada elicitador, siendo de 10000, 1000, 100, 10 y 1 ppm con un volumen final de 400 ml cada una. Una vez realizadas las diluciones para cada elicitador, se embebieron las semillas durante 24 horas en cada dilución y se realizó el cultivo tal y como se detalló anteriormente, obviando las condiciones de oscuridad⁴ (todos en condiciones de luz) durante 5 días (**Fig. 4.2**).

⁴ Se obviaron las condiciones en oscuridad por los resultados obtenidos en el primer experimento, como se tratará en Resultados.

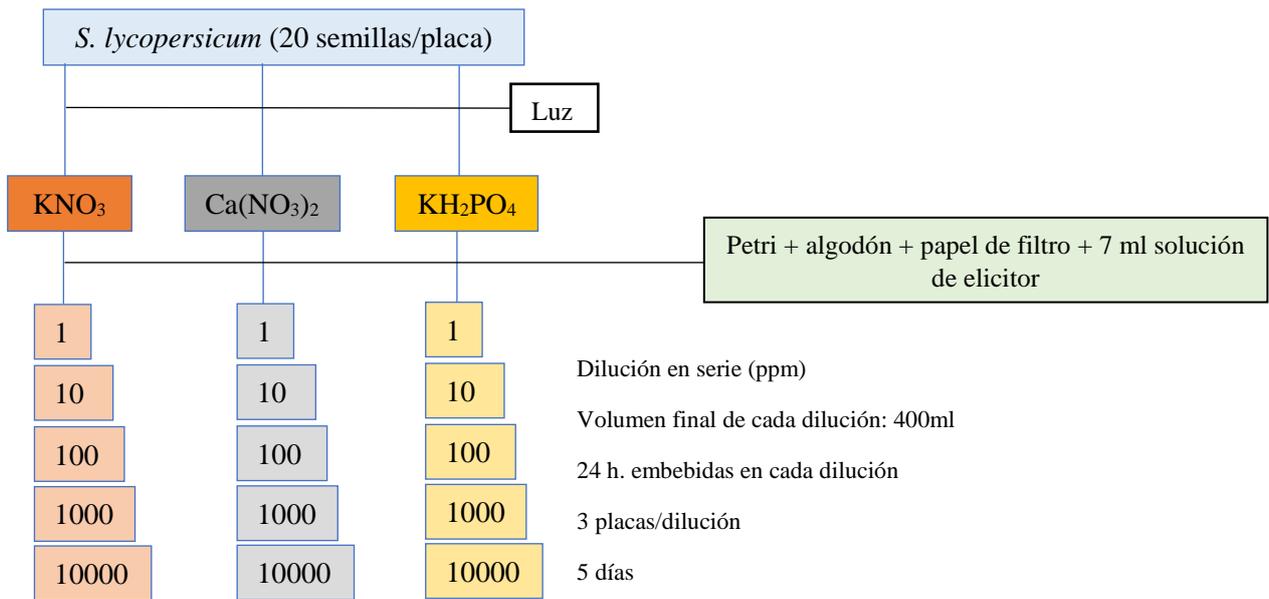


Figura 4.2. Esquema general del tratamiento para la búsqueda de concentración óptima de cada elicitor.

5.2.2 TRATAMIENTO CON ESTRÉS SALINO.

Una vez obtenidos las concentraciones óptimas de cada elicitor, se realizó el mismo experimento, con una dilución en serie de agua mezclada con diferentes concentraciones de NaCl: 0 (control, sin cloruro sódico), 25, 50 y 75 milimolar (mM) en un volumen de 250 ml. Las semillas fueron embebidas en la concentración óptima de cada elicitor durante 24 horas y fueron puestas a cultivar de la misma manera que en los anteriores experimentos más 7 ml de solución con NaCl (**Fig. 4.3**).

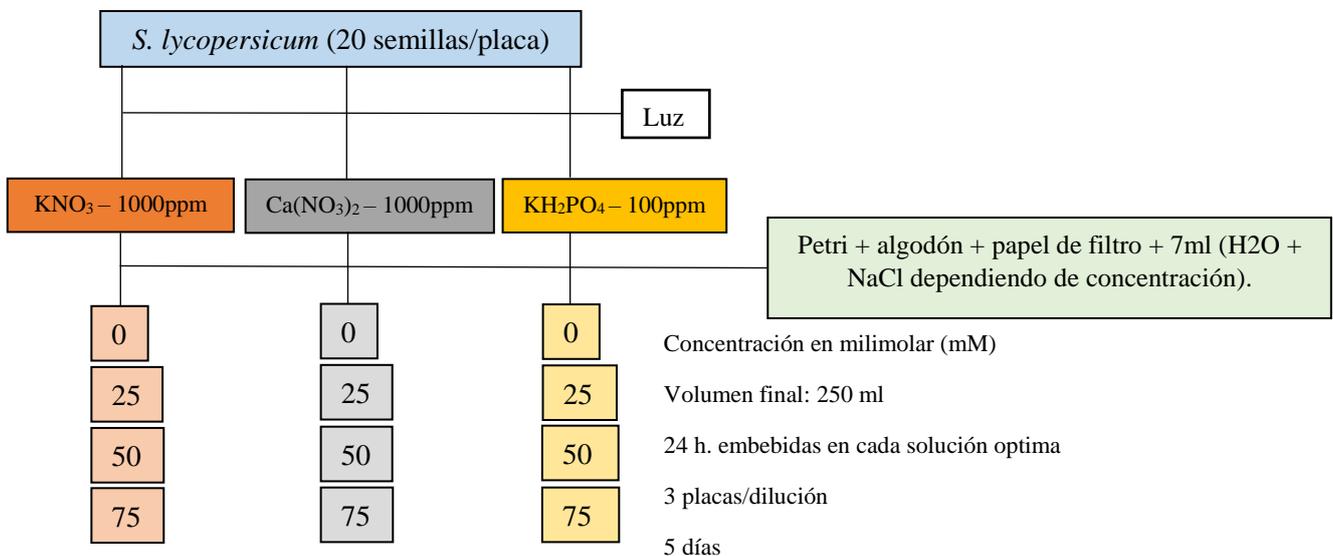


Figura 4.3. Esquema general del tratamiento con estrés salino.

5.3. CÁLCULOS REALIZADOS.

Para cada experimento se calculó el porcentaje medio de germinación, el tiempo medio de germinación (T_m ; **Fig. 4.4**), que consiste en el número de días en el que se alcanza el 50% de la germinación total (Bewley & Black, 1985) y, por último, el vigor de Bradbeer (**Fig. 4.5**), parámetro muy útil a la hora de evaluar el proceso germinativo en términos de velocidad, cuyo valor puede estar entre 0 y 100 (Bradbeer, 1988). De estos datos se consiguieron obtener los óptimos de concentración para cada elicitor en el segundo ensayo, a partir de los cuales se basaron el tercer ensayo.

$$t_m = \frac{N_1 * T_1 + N_2 * T_2 + \dots + N_n * T_n}{N_1 + N_2 + \dots + N_n}$$

Tiempo medio de germinación (T_m), donde:

N_1 : número de semillas germinadas en T_1

N_2 : número de semillas germinadas entre T_1 y T_2

T_n : días transcurridos desde que las semillas se pusieron a germinar.

$$\text{Vigor por réplica} = \frac{(a/1 + b/2 + c/3 + \dots + x/n) * 100}{s}$$

Vigor de Bradbeer, donde:

a, b, c ...x: número de semillas que germinan después de 1, 2, 3, ...n días de imbibición.

s: número de semillas totales que germinaron en esa réplica.

Figura 4.4. Fórmula y descripción del tiempo medio de germinación, T_m .

Figura 4.5. Fórmula y descripción del Vigor de Bradbeer.

5.4 ESTADÍSTICA.

Los estudios y comparaciones estadísticos fueron realizados con el IBM SPSS STATISTICS V22. Se comprobó la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnow y se realizó para la comparación de medias un ANOVA de una vía, sin asumir varianzas iguales, empleando las pruebas post-hoc de Tamhane.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1. CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA GERMINACIÓN EN PLACA.

Una vez transcurridos los 5 días, se realizó un conteo de las semillas germinadas para comprobar si existía diferencia de crecimiento en el cultivo en condiciones de oscuridad o luz. Como se puede observar (**Fig. 5.1**) las semillas de *S. lycopersicum* presentan un mayor crecimiento en condiciones de luz que en condiciones de oscuridad, por lo que el resto de los ensayos se realizaron en condiciones de luz, obviando así condiciones en oscuridad.

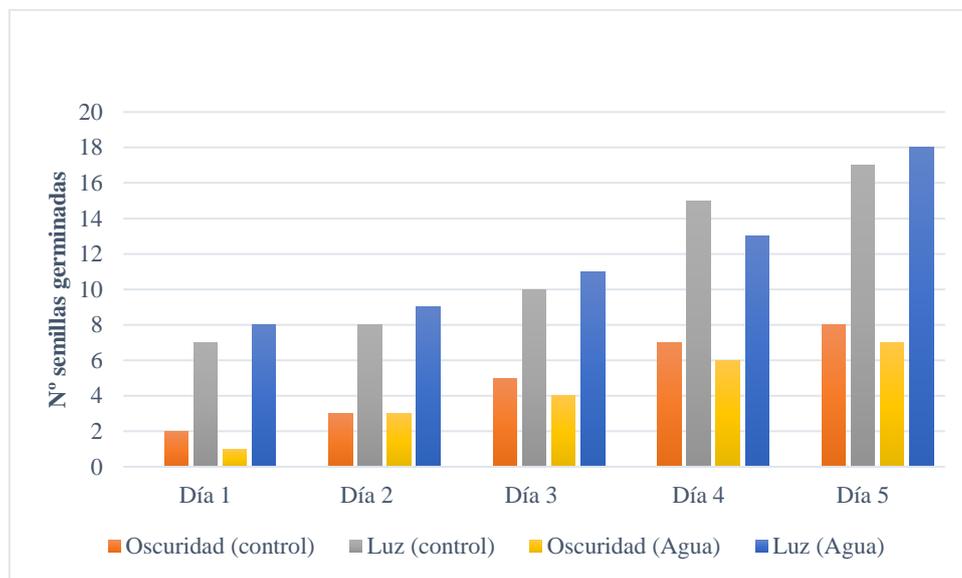


Figura 5.1. Número medio de semillas germinadas durante el primer ensayo, en condiciones de oscuridad y en condiciones de luz. Se indican el número de semillas germinadas en condiciones de luz y en condiciones de oscuridad en Control (semillas sin ningún tipo de tratamiento) y en Agua (semillas tratadas con agua destilada 24 horas antes de la siembra).

6.2 OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO INICIAL.

Con los datos obtenidos no se observó diferencias estadísticas, por lo que se tuvieron en cuenta los valores más alto a la hora de evaluar los diferentes elicitores con respecto a las semillas Control y a las semillas con tratamiento con agua destilada (Agua).

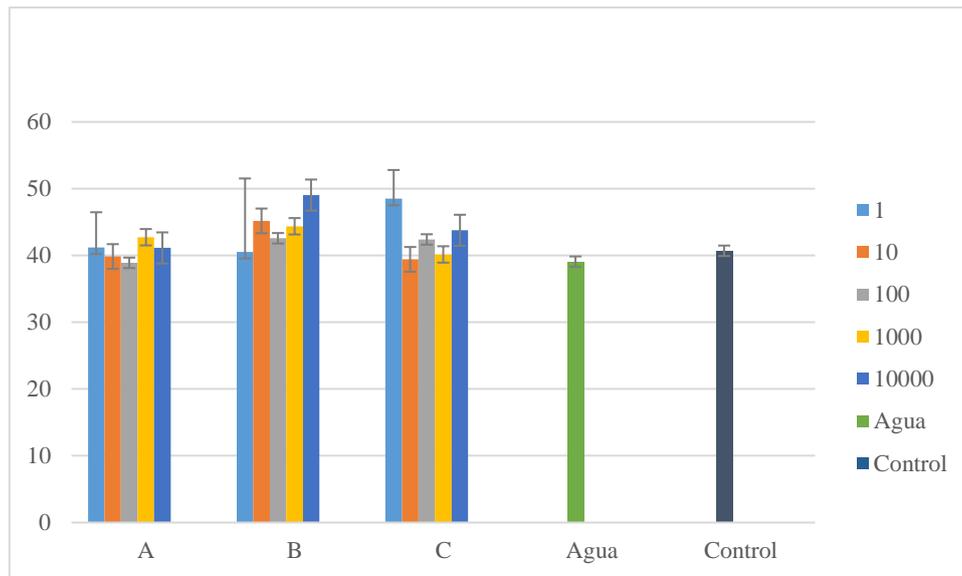


Figura 5.2. Vigor de Bradbeer, primer ensayo. Se indican los diferentes elicitores: A (KNO_3), B ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) y C (KH_2PO_4) con sus diferentes concentraciones (1, 10, 100, 1000 y 10000 ppm). También se indica el Control (semillas sin ningún tipo de tratamiento) y Agua (semillas tratadas con agua destilada 24 horas antes de la siembra).

En el vigor de Bradbeer (**Fig. 5.2**) se puede apreciar que en la solución A (KNO_3) las concentraciones equivalentes a 1000 ppm son las que presentan un valor más alto con respecto a los controles. Por otro lado, en la solución B ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), la solución de 10000 ppm es la que presenta el vigor más alto, superando los valores de Control y Agua con casi una diferencia de 10. Por último, en la solución C el mayor vigor lo presenta el que presenta 1 ppm, seguido del de 10000 ppm. Bradbeer (1983) dijo que las plantas que presentan valores del vigor de 40 o superiores poseen un crecimiento rápido. En términos generales, en la gráfica se puede observar que tanto el tratamiento con agua destilada (Agua) y el Control superan o se acercan demasiado a los valores de 40, mientras que, al usar las concentraciones de los diferentes elicitores, estos valores superan el 40, llegando a alcanzar incluso el 50, por lo que se podría decir que el uso de dichas soluciones (en una determinada concentración) aumenta el vigor de las semillas de *S. lycopersicum*, aunque estas experiencias deberían de volver a repetirse con el fin de asegurar si la diferencia es significativa o no.

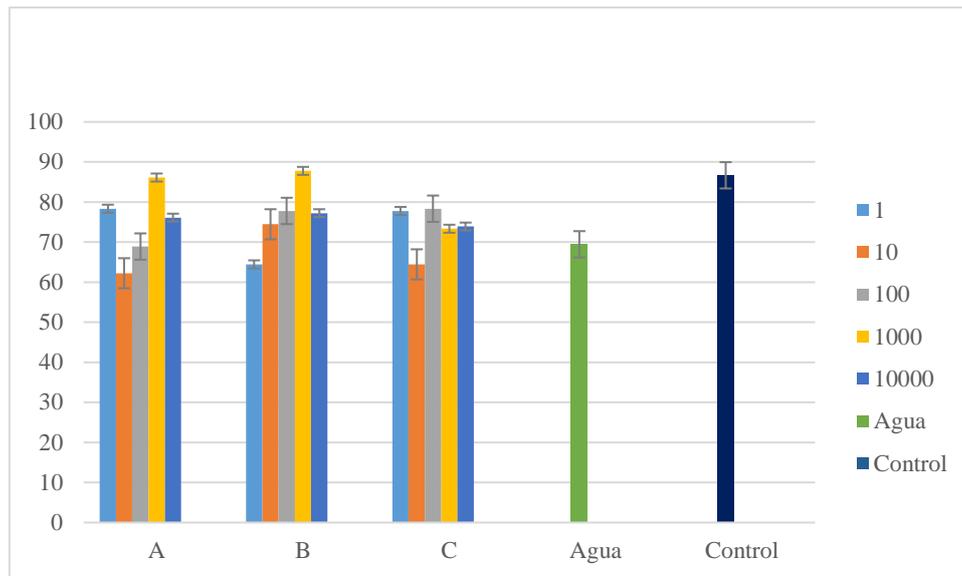


Figura 5.3. Porcentaje de germinación, primer ensayo. Se indican los diferentes elicitores: A (KNO_3), B ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) y C (KH_2PO_4) con sus diferentes concentraciones (1, 10, 100, 1000 y 10000 ppm). También se indica el Control (semillas sin ningún tipo de tratamiento) y Agua (semillas tratadas con agua destilada 24 horas antes de la siembra).

En cuanto al porcentaje de germinación (**Fig. 5.3**) se puede apreciar que en los valores medios de las semillas Control oscilan entre un 85% y un 70% con el tratamiento con agua destilada (Agua). Esto nos indica que el tratamiento pre-germinativo con agua destilada en las semillas de *S. lycopersicum* es perjudicial, ya que se obtiene mejores valores de germinación al ser sembradas como Control, sin tratamiento previo. En cambio, las semillas que fueron tratadas en la solución A (KNO_3), alcanzaron valores de casi el 90% de semillas germinadas con la concentración de 1000 ppm, valores que coinciden a su vez con el valor de vigor más alto. En la solución B ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) ocurre lo mismo que en la solución A, la concentración de 1000 ppm alcanza casi el 90% de semillas germinadas seguida de la de 100 y 10000. Por último, en la solución C (KH_2PO_4) se obtiene casi un 80% de porcentaje de germinación con la concentración de 100 ppm, seguida por la de 1 ppm. En términos generales, se suele alcanzar en las tres soluciones un porcentaje de germinación cercano al 90%, superando en su mayoría el porcentaje obtenido con el tratamiento de Agua y alcanzando valores similares al del Control, por lo que podría decirse que el uso de estas soluciones corrige el efecto negativo ejercido por el tratamiento de agua destilada en la germinación.

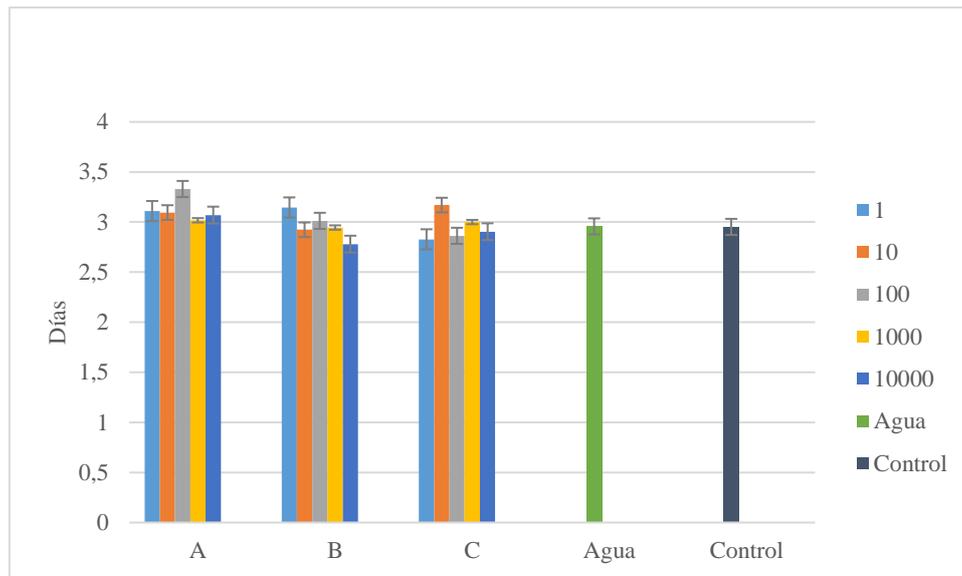


Figura 5.4. Tiempo medio de germinación, primer ensayo. Se indican los diferentes elicitores: A (KNO_3), B ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) y C (KH_2PO_4) con sus diferentes concentraciones (1, 10, 100, 1000 y 10000 ppm). También se indica el Control (semillas sin ningún tipo de tratamiento) y Agua (semillas tratadas con agua destilada 24 horas antes de la siembra).

En relación con el tiempo medio para que germinen el 50% de las semillas, T_m (**Fig. 5.4**), se observa que tanto en el Control como en Agua la diferencia es mínima, ya que en ambas tardan un promedio de casi tres días en germinar la mitad de las semillas sembradas. Comparando estos controles con las de la solución A (KNO_3) se puede observar que conservan la mayoría de las concentraciones el tiempo medio de los controles, aunque con los 100 ppm el tiempo medio sobrepasa hasta casi los tres días y medio. En cuanto a la solución B ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) se mantiene igual, siendo la máxima variación de días con la de 1 ppm. Por último, con la solución C (KH_2PO_4), al igual que con el resto de las soluciones, se mantiene bastante cercano al de los controles, a excepción de la de 10 ppm, donde los supera. En términos generales, se observa que, exceptuando alguna concentración de algunos de los elicitores, el tiempo medio de germinación se mantiene estable en unos 3 días con todos los tratamientos en las semillas de *S. lycopersicum*, lo que podría indicar que el uso de estos elicitores no provocan una variación en el tiempo medio de germinación..

Con estos datos establecimos las concentraciones óptimas para las semillas de cada elicitor. Pese a la falta de diferencias estadísticas, con el fin de continuar con el ensayo se tomaron las siguientes concentraciones: 1000 ppm para KNO_3 , 100 ppm para ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) y 100 ppm para KH_2PO_4 .

Así mismo, al observarse mejores resultados de las semillas sin ningún tipo de tratamiento pre-germinativo, en el tratamiento con estrés salino se eliminó el tratamiento con agua destilada 24 horas antes de su siembra (Agua) y solo se usó el Control (semillas sin ningún tipo de tratamiento pre-germinativo).

6.2 TRATAMIENTO CON ESTRÉS SALINO.

Una vez calculadas las dosis optimas de cada elicitor junto al Control (sin soluciones), se volvió a calcular el porcentaje de germinación, el vigor de Bradbeer y el tiempo medio de germinación, T_m de las dosis optimas, pero esta vez añadiéndole un gradiente (0-75mM) de NaCl.

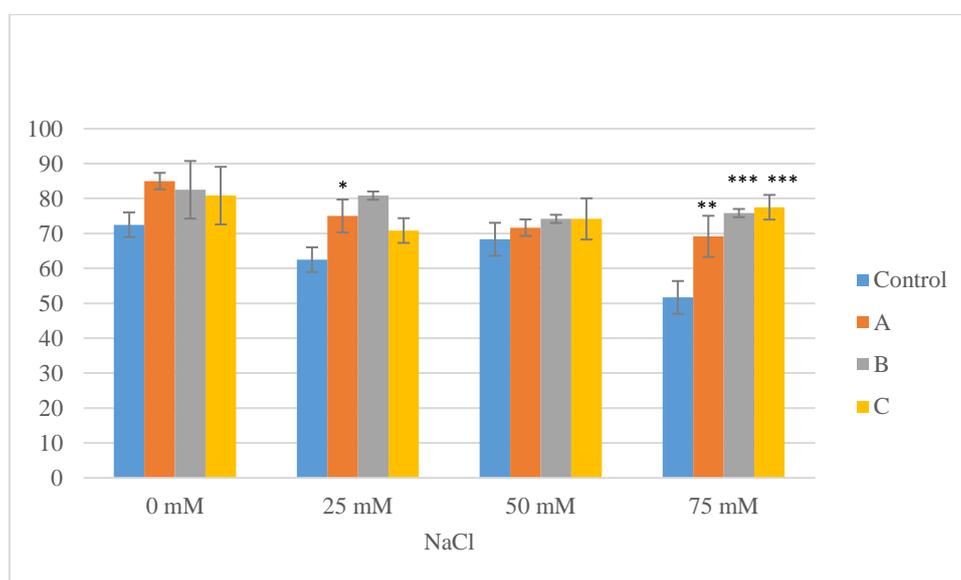


Figura 5.5. Porcentaje de germinación, segundo ensayo con gradiente de NaCl. Control (semillas sin tratar), solución A (KNO_3 ; 1000 ppm), B ($Ca(NO_3)_2$; 1000 ppm) y C (KH_2PO_4 ; 100 ppm). *pvalor < 0,05; ** pvalor < 0,01; *** pvalor < 0,001 con respecto al control.

En el porcentaje de germinación (**Fig. 5.5**) se puede observar que, sin añadir NaCl (0 mM), el Control supera el 70%, mientras que en el resto de las soluciones hay un aumento llegando a superar el 80%. Añadiendo 25 mM de NaCl se observa que, a pesar de que en el Control comienza a disminuir, en el resto de las soluciones se mantienen a unos valores medios muy parecidos a un medio sin NaCl (0 mM), siendo significativamente la diferencia entre el control y la solución A (KNO_3). Al añadir 50 mM de NaCl se observa que el valor del Control aumenta con respecto a sus valores con 25 mM, algo que podría atribuirse a un error durante el ensayo y el valor no podría ser válido, tendría que volver

a repetirse en un futuro para comprobar si los valores del control son válidos o no. Volviendo a la concentración de NaCl, al añadir 50 mM se observa una disminución acentuada respecto al 0 mM, manteniendo unos valores estables de entre un 70-75% los elicitores. Por último, con 75 mM de NaCl, las semillas Control disminuyen drásticamente su porcentaje de germinación hasta un 50%, mientras que las tres soluciones provocan que se mantengan en valores significativamente superiores: de un 70% con la solución A (KNO_3) y de alrededor del 75% con las soluciones B ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) y C (KH_2PO_4).

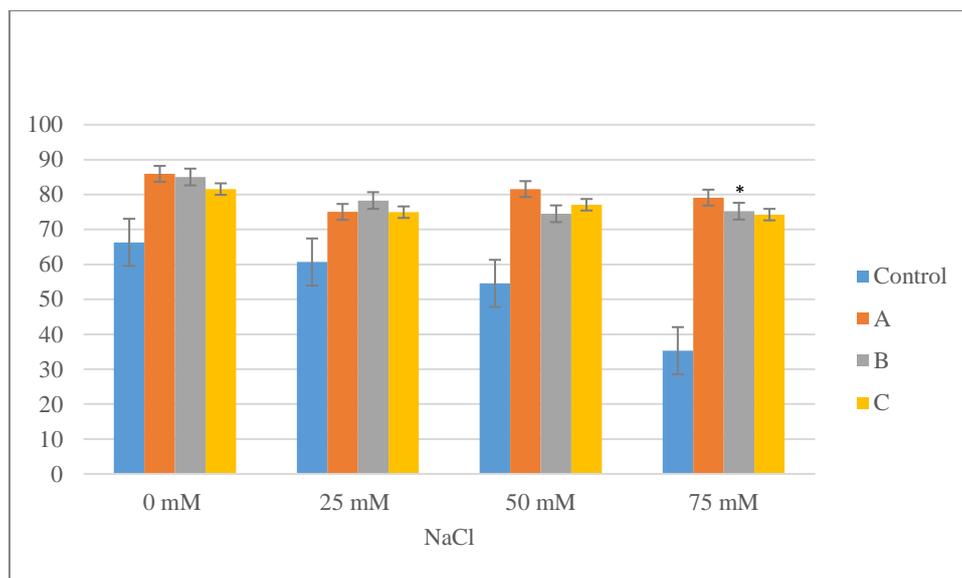


Figura 5.6. Vigor de Bradbeer, segundo ensayo con gradiente de NaCl. Control (semillas sin tratar), solución A (KNO_3 ; 1000 ppm), B ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 1000 ppm) y C (KH_2PO_4 ; 100 ppm). *pvalor < 0,05 con respecto al control.

En **Fig. 5.6**, se observan que en los valores sin adición de NaCl (0 mM) hay una mejoría de las tres soluciones frente al control, el cual tiene un valor de 75%, mientras que con las soluciones se aumenta hasta un 80%. Al añadir 25 mM de NaCl los valores generales disminuyen, manteniéndose la solución B con un valor más estable a la no adición de NaCl. Con 50 mM de NaCl, el control disminuye su vigor hasta un 55%, mientras que la solución A sigue manteniéndose en el 80% junto al resto de soluciones, con unos valores algo inferiores. Por último, con 75 mM el vigor del control se reduce hasta un 35%, muy por debajo del valor sin adición de NaCl. Sin embargo, las tres soluciones muestran unos valores muy equivalentes, donde mantienen valores por encima del 70%, siendo la de la solución B ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) la que presenta una diferencia estadística significativamente alta.

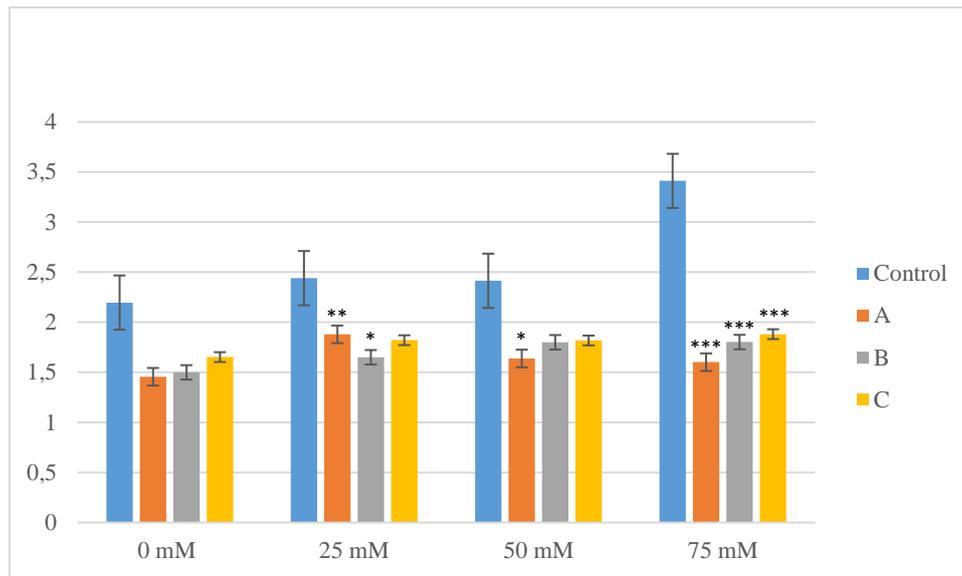


Figura 5.7. Tiempo medio de germinación (T_m), segundo ensayo con gradiente de NaCl. Control (semillas sin tratar), solución A (KNO_3 ; 1000 ppm), B ($Ca(NO_3)_2$; 1000 ppm) y C (KH_2PO_4 ; 100 ppm). *pvalor < 0,05; ** pvalor < 0,01; *** pvalor < 0,001 con respecto al control.

Por último, en cuanto al tiempo medio de germinación (**Fig. 5.7**) sin la adición de NaCl (0 mM) se disminuyen los días en los que crecen semillas con la adición de las soluciones siendo la diferencia de más de dos días (semillas Control) a casi un día y medio (A, B). Al añadirse 25 mM de NaCl comienza a producirse un aumento del crecimiento por día de las semillas en Control, mientras que en las soluciones se mantienen con valores estables, con una diferencia significativa con la solución B ($Ca(NO_3)_2$) y significativamente alta con la solución A (KNO_3). Con 50 mM se puede apreciar una diferencia estadística significativa con la solución A, aunque con todas las soluciones se observan una mejoría con respecto a las semillas controles, puesto que se mantienen con unos valores estables, mientras que las controles aumentan su germinación en dos días y medio. Por último, con 75 mM es donde se puede observar una diferencia más acusada, ya que con las tres soluciones se obtiene una diferencia estadística muy alta en comparación a las semillas controles, donde elevan su tiempo de germinación hasta casi tres días y medio, mientras que las semillas tratadas con los elicitores mantienen unos resultados similares al resto de los valores obtenidos en el gradiente, no llegando a superar ninguno los dos días de tiempo medio de germinación.

En términos generales existe una mejoría con la adición de los elicitores al tratamiento con el gradiente de NaCl, puesto que no solo provoca que se mantengan estables los valores de germinación, sino que, especialmente con 75 mM, se observe una

mejoría comparado con las semillas control de casi un 20%. Esto concuerda con los datos obtenidos por Carrillo (2015), donde, añadiendo NaCl a determinados líneas de semillas de *S. lycopersicum*, estas mejoraban su capacidad germinativa. Además, se puede observar una igualdad en los valores de vigor de las semillas tratadas con los elicitores. Esta diferencia se puede apreciar también de manera más acentuada con el tratamiento de 75 mM, donde la diferencia del control frente al valor más bajo de las soluciones (KH_2PO_4) es de casi un 40%, mientras que el valor más alto (KNO_3) la diferencia es de un 45%. En general, se observa que, en los controles, a medida que aumenta la concentración de NaCl en el medio, se prolonga el tiempo de germinación de este, como ya se ha observado en numerosos estudios (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1996; El-Habbasha *et al.* 1996; Singer-SM, 1994; Goykovic Cortés, 2007). Sin embargo, el uso de los elicitores ayuda a las semillas a que el tiempo de germinación se mantenga a pesar de que se le añada diferentes concentraciones de NaCl, como expuso Amir *et al.* (2011) donde, añadiendo de concentraciones de KNO_3 , se mejoraba con claras diferencias al resto de tratamientos de halopriming en tomates.

A la hora de comprobar que elicitor es más efectivo en estos ensayos, se puede observar que las semillas tratadas con KH_2PO_4 presentan unos mejores resultados en comparación a los otros dos elicitores, sobre todo a medida que se aumenta la cantidad de NaCl en el cultivo. Seguido del KH_2PO_4 , el KNO_3 es el segundo que presenta unos mejores valores en los ensayos, quedando en último lugar el $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, aunque los tres compuestos ofrecen una mejoría notable en la resistencia a la salinidad de las semillas. Añadiendo a semillas de *S. lycopersicum* alguno de estos elicitores, se puede lograr resistir los efectos negativos que provoca la salinidad en la planta. Esto, junto a un tratamiento con menadiona sodio bisulfito (entre otros), puede ayudar a cultivos con el fin de mejorar la germinación en semillas en condiciones salinas.

7. CONCLUSIONES

- Las semillas de *S. lycopersicum* germinan mejor en condiciones de luz que de oscuridad.
- El agua destilada como tratamiento pre-germinativo en semillas de *S. lycopersicum* es perjudicial.
- El uso de KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y KH_2PO_4 como elicitores ayuda a regular el tiempo medio de germinación en semillas.
- El uso de dichos elicitores, de manera general, ayuda a eliminar los efectos negativos de la salinidad en la germinación de semillas de *S. lycopersicum*.
- El tratamiento más efectivo fue el KH_2PO_4 , seguido del KNO_3 y por último el $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

7.1 CONCLUSIONS

- Seeds of *S. lycopersicum* germinate better in light conditions than in dark conditions.
- Distilled water as a pre-germinative treatment in seeds of *S. lycopersicum* is harmful.
- Use of KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and KH_2PO_4 as elicitors helps regulate the average germination time in seeds.
- Use of these elicitors, in general, helps to eliminate the negative effects on germinations of *S. lycopersicum*.
- The most effective treatment was KH_2PO_4 , followed by KNO_3 and finally $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

8. AGRADECIMIENTOS.

Agradecer en general a los dos grupos de investigación: Grupo de Fisiología Vegetal Aplicada (GBVA - Universidad de la Laguna) y al Grupo de Activadores de Defensa de la Planta (Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del CSIC) por permitirme indagar en la búsqueda de nuevos compuestos para aumentar la tolerancia de plantas a la salinidad.

En primer lugar, a mis tutores de este TFG: Francisco y David por todo lo que me han enseñado y ayudado durante el desarrollo de este, sin ellos no habría sido posible este trabajo. Ante todas las dificultades y dudas que se han presentado, siempre han estado dispuestos a dedicarme su tiempo y su conocimiento:

- A Francisco Valdés González, por haberme ayudado en la redacción de este trabajo, ofreciéndome su tiempo y ayudándome en todo lo que tenía dudas, y sobre todo, por su gran apoyo a la hora de pedirle ayuda, siempre dispuesto a atenderme y de la mejor manera posible. Mil gracias.
- A David Jiménez Arias por toda la ayuda prestada en la parte de laboratorio y, sobre todo, por la parte estadística, de la que no hubiera sido posible realizar por mi cuenta sino hubiese sido por su ayuda. Muchísimas gracias por todo.

Sobre todo, quiero agradecerlo a mi pareja, Héctor, por aguantarme durante todo el desarrollo no solo del TFG, sino de la carrera, por apoyarme incluso en los peores momentos en los que ni yo mismo veía claro, por estar siempre ahí, para lo que sea, y por hacerme más ameno todo. Y por supuesto, no menos importante, por la ayuda que ha prestado en la lectura y corrección de este trabajo. Gracias de corazón.

A mi mejor amigo Edwin, por ayudarme no solo en los temas de química y en la búsqueda de bibliografía, sino por todos los momentos en los que ha estado ahí cuando lo he necesitado, en las buenas y en las malas. Gracias a ti he podido acabar esta carrera más rápido que si lo hubiese hecho solo, me faltarían momentos para poder agradecértelo lo suficiente. Mil gracias.

Y por último, no menos importante que los demás, a mi madre. Por haber creído en mí, por haberme apoyado para poder realizar esta carrera y cumplir uno de mis sueños. Por haber luchado por los dos para poder estar hoy escribiendo este trabajo. Gracias, por ayudarme, por estar ahí día a día y por hacerme ver que todo se consigue luchando con esfuerzo y dedicación. Gracias.

9. BIBLIOGRAFÍA.

Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., & Reymond, M. (2010). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, 231(6), 1237-1249. doi: 10.1007/s00425-010-1130-0

Amir N, Muhammad A, Muhammad AP, Irfan A. (2011) Effect of halo-priming on germination and seedling vigor of tomato. 6(15):3551–3559.

Ayers, A. D., H. E. Hayward. (1948). A method for measuring the effects of soil salinity on seed germination with observations on several crop plants. *Soil sci. Sot. Amer. Proc.* 13:224-226.

Ayers, A.D.(1950). Salt tolerance of Avocado trees grown in culture solution. *Calif. Avocado Soc. Yearb.*, 130--148.

Bancomundial.org. La población mundial en el futuro en cuatro gráficos. (2018). Retrieved from <https://blogs.worldbank.org/opendata/es/la-poblacion-mundial-en-el-futuro-en-cuatro-graficos>

Bazzigalupi, Omar & M. Pistorale, Susana & Andrés, A.N.. (2008). Salinity tolerance during seed germination from naturalized populations of tall wheatgrass (*Thinopyrum ponticum*). *Ciencia e Investigacion Agraria*. 35. 231-238.

Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, 32(1), pp.170-189.

- Bewley, J.** (2013). *Seeds*. New York: Springer.
- Bohnert, H., Gong, Q., Li, P., & Ma, S.** (2006). Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms – getting genomics going. *Current Opinion In Plant Biology*, 9(2), 180-188. doi: 10.1016/j.pbi.2006.01.003
- Borges, A., Borges-Perez, A., & Fernandez-Falcon, M.** (2003b). Effect of Menadione Sodium Bisulfite, an Inducer of Plant Defenses, on the Dynamic of Banana Phytoalexin Accumulation during Pathogenesis. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 51(18), 5326-5328. doi: 10.1021/jf0300689
- Borges, A., Borges-Pérez, A., & Fernández-Falcón, M.** (2004). Induced resistance to Fusarial wilt of banana by menadione sodium bisulphite treatments. *Crop Protection*, 23(12), 1245-1247. doi: 10.1016/j.cropro.2004.05.010
- Borges, A., Cools, H., & Lucas, J.** (2003a). Menadione sodium bisulphite: a novel plant defence activator which enhances local and systemic resistance to infection by *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape. *Plant Pathology*, 52(4), 429-436. doi: 10.1046/j.1365-3059.2003.00877.x
- Borges, A., Dobon, A., Expósito-Rodríguez, M., Jiménez-Arias, D., & Borges-Pérez, A.** (2009). Molecular analysis of menadione-induced resistance against biotic stress in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal*, 7(8), 744-762. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00439.x
- Borges, A., Jiménez-Arias, D., Expósito-Rodríguez, M., Sandalio, L. and Pérez, J.** (2014). Priming crops against biotic and abiotic stresses: MSB as a tool for studying mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 5.
- Bradbeer, J.** (1994). *Seed dormancy and germination*. London: Blackie Academic & Professional.
- Broecker, W.** (1971). A Kinetic Model for the Chemical Composition of Sea Water. *Quaternary Research*, 1(02), 188-207. doi: 10.1016/0033-5894(71)90041-x
- Carrillo Rodríguez, J., Sanjuan Lara, F., Ramírez Vallejo, P., Sánchez García, P., Sandoval Villa, M.** (2015). Tolerancia de líneas nativas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) a la salinidad con NaCl. *Interciencia*, 40 (10), 704-709.
- Chamarro, J.** 1995. Anatomía y fisiología de la planta. En Nuez, F. *El cultivo del tomate*. Edit. Mundi-Prensa Barcelona, España. 43-91 p
- Conrath, U.** (2011). Molecular aspects of defence priming. *Trends In Plant Science*, 16(10), 524-531. doi: 10.1016/j.tplants.2011.06.004
- Cuartero, J. and Fernández-Muñoz, R.** (1998). Tomato and salinity. *Scientia Horticulturae*, 78(1-4), pp.83-125.
- De Nisi, P., Manzotti, P. and Zocchi, G.** (2006). Effect of Vitamin K3 on plasma membrane-bound H⁺-ATPase and reductase activities in plants. *Plant Science*, 170(5), pp.936-941.
- El-Habbasha, K.M., A.M. Shaheen, & F.A. Rizk.** (1996). Germination of some tomato cultivars as affected by salinity stress condition. *Egyp. J. Hort.* 23, 179-190.
- Fao.org.** (2018). ESS Website ESS : Seguridad alimentaria. Disponible en: <http://www.fao.org/economic/ess/ess-fs/es/> [Consultado el 28 de mayo de 2018].
- Goykovic Cortés, V. & Saavedra del Real, G.** (2007). Algunos efectos de la salinidad en el cultivo de tomate y prácticas agronómicas de su manejo. *Idesia (Arica)*, 25(3).
- Iqbal, M., & Ashraf, M.** (2007). Seed Preconditioning Modulates Growth, Ionic Relations, and Photosynthetic Capacity in Adult Plants of Hexaploid Wheat under Salt Stress. *Journal Of Plant Nutrition*, 30(3), 381-396. doi: 10.1080/01904160601171330
- Jakab, G., Cottier, V., Toquin, V., Rigoli, G., Zimmerli, L., Métraux, J., & Mauch-Mani, B.** (2001). *European Journal Of Plant Pathology*, 107(1), 29-37. doi: 10.1023/a:1008730721037
- Jiménez-Arias, D., Aller, Á., Borges, A., & Carrillo-Perdomo, E.** (2015). Menadione Sodium Bisulphite (MSB) enhances the resistance response of tomato, leading to repel mollusc pests. *Pest Management Science*, 72(5), 950-960. doi: 10.1002/ps.4074

- Kang, Y., Khan, S., & Ma, X.** (2009). Climate change impacts on crop yield, crop water productivity and food security – A review. *Progress In Natural Science*, 19(12), 1665-1674. doi: 10.1016/j.pnsc.2009.08.001
- Kumar Sairam, R., & Tyagi, A.** (2006). *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. doi: 10.1007/1-4020-4225-6
- Lucero, J.C.** 1970. Germinación de cuatro gramíneas forrajeras bajo distintas condiciones de salinidad. *Revista de Información sobre Investigación y Desarrollo Agropecuario (INTA)* 273:60-64.
- Mahajan, S., & Tuteja, N.** (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 444(2), 139-158. doi: 10.1016/j.abb.2005.10.018
- Molassiotis, A., & Fotopoulos, V.** (2011). Oxidative and nitrosative signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(2), 210-214. doi: 10.4161/psb.6.2.14878
- Molassiotis, A., Tanou, G., & Diamantidis, G.** (2010). NO says more than 'YES' to salt tolerance. *Plant Signaling & Behavior*, 5(3), 209-212. doi: 10.4161/psb.5.3.10738
- Munns, R., & Tester, M.** (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review Of Plant Biology*, 59(1), 651-681. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911
- Ray, D., Mueller, N., West, P., & Foley, J.** (2013). Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *Plos ONE*, 8(6), e66428. doi: 10.1371/journal.pone.0066428
- Reynolds, M., & Tuberosa, R.** (2008). Translational research impacting on crop productivity in drought-prone environments. *Current Opinion In Plant Biology*, 11(2), 171-179. doi: 10.1016/j.pbi.2008.02.005
- Rick, C.M.** (1978). The tomato. *Sci. Am.* 239:66-77.
- Singer-SM.** 1994. Germination responses of some tomato genotypes as affected by salinity and temperature stress. *Egyptian-Journal-of-Horticulture*. 21 (1): 47-64.
- Tilman, D., Isbell, F., Reich, P., Hobbie, S., Polasky, S., & Binder, S.** (2013). Nutrient enrichment, biodiversity loss, and consequent declines in ecosystem productivity. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 110(29), 11911-11916. doi: 10.1073/pnas.1310880110
- Tuberosa, R., Giuliani, S., Parry, M., & Araus, J.** (2007). Improving water use efficiency in Mediterranean agriculture: what limits the adoption of new technologies? *Annals Of Applied Biology*, 150(2), 157-162. doi: 10.1111/j.1744-7348.2007.00127.x