



TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN
BIOTECNOLOGÍA

Características metabolómicas y hormonales del efecto combinado de bioestimulante, PGPB y micorrizas sobre tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom)

Alumno: Sara Trigueros Orozco

Tutor UCV: Celia Almela Camañas

Tutor externo: José Miguel Mulet y Patricia Benito Santano

Curso académico: 2022/2023



ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....	X
2. ABSTRACT AND KEY WORDS.....	XI
3. INTRODUCCIÓN.....	1
3.1. Problemática ambiental que afronta la agricultura actual.....	1
3.2. Bioestimulantes vegetales, una nueva estrategia en la producción agrícola...4	
3.3. Cultivo hortícola en España y en la Comunidad Valenciana.....	5
3.4. Antecedentes de este estudio.....	6
4. OBJETIVOS.....	7
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
5.1. Preparación del cultivo y condiciones de crecimiento.....	8
5.2. Tratamientos y su aplicación.....	11
5.3. Recolección de muestras para su análisis.....	11
5.4. Análisis metabolitos primarios.....	12
5.5. Análisis de hormonas.....	12
5.6. Estadística.....	13
6. RESULTADOS.....	14
6.1. Metabolitos primarios.....	14
6.2. Hormonas.....	25
7. DISCUSIÓN.....	37
8. CONCLUSIÓN.....	42
9. PERSPECTIVA FUTURA.....	43
10. BIBLIOGRAFÍA.....	44
11. ANEXO.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Compuestos que participan en la adaptación frente al estrés salino y sus correspondientes respuestas frente a esta situación (Kaushal et al., 2023). 3
- Figura 2.** Disposición en zig-zag de las macetas de los cultivos con una separación entre ellas de 15 cm en los invernaderos del Centro de Experiencias Cajamar (Paiporta, Valencia)..... 9
- Figura 3.** Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) de muestras de hoja en condiciones sin estrés donde se compararon el tratamiento (violeta) con el control (verde). (a) CT vs BS, (b) CT vs AMF, (c) CT vs PGPB, (d) CT vs BS+AMF, (e) CT vs BS+PGPB. La varianza en el componente Y es mayor del 17 % a excepción del gráfico (e) que es del 11 % y en el componente X es mayor del 50 %. CT (control sin estrés); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrízico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal). 15
- Figura 4.** Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) de muestras de hoja en condiciones de estrés salino donde se compararon los tratamientos (violeta) con el control (verde). (a) NaCl vs BS, (b) NaCl vs AMF, (c) NaCl vs PGPB, (d) NaCl vs BS+AMF, (e) NaCl vs BS+PGPB. La varianza en el componente Y es mayor del 20,0 % a excepción del gráfico (b) y (c) que es del 6,1 y del 9,8 % respectivamente y en el componente X es mayor del 50 % a excepción del gráfico (d) que es del 45,1 %. NaCl (control con estrés salino); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrízico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal)..... 16
- Figura 5.** Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales PLS-DA de muestras de raíz en condiciones sin estrés donde se compararon los diferentes tratamientos (violeta) con el control (verde). (a) CT vs BS, (b) CT vs AMF, (c) CT vs PGPB, (d) CT vs BS+AMF, (e) CT vs BS+PGPB. La varianza en el componente Y es mayor del 20 % a excepción de (a) y (e) que fue del 5,8 y del 14,3 % respectivamente y en el componente X es mayor del 60,0 % a excepción del gráfico B y C que es del 48,1 y del 43,5 % respectivamente. CT (control sin estrés); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrízico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal). 17

Figura 6. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales PLS-DA de muestras de raíz en condiciones de estrés donde se compararon el tratamiento (violeta) con el control (verde) (a) NaCl vs BS, (b) NaCl vs AMF, (c) NaCl vs PGPB, (d) NaCl vs BS+AMF, (e) NaCl vs BS+PGPB. La varianza en el componente Y es mayor del 20,0 % a excepción en (b) que es del 11,4 % y en el componente X es mayor del 30 % a excepción del gráfico (e) que es del 25 %. NaCl (control con estrés salino); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal)..... 18

Figura 7. Diagrama radial del contenido metabólico en valores absolutos en hoja para ambas condiciones (condiciones normales y estrés salino) y todos los tratamientos realizados. Los diferentes colores representan los diferentes tratamientos tanto en una situación con y sin estrés y el eje se encuentra en escala logarítmica en base 10 CT (control sin estrés); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal); BS+AMF (combinación de bioestimulante con hongo micorrícico arbuscular); BS+PGPB (combinación de bioestimulante con Bacteria promotora del crecimiento vegetal). 19

Figura 8. Diagrama radial del contenido metabólico en valores absolutos en raíz para ambas condiciones (condiciones normales y estrés salino) y todos los tratamientos. Los diferentes colores representan los diferentes tratamientos tanto en una situación con y sin estrés y el eje se encuentra en escala logarítmica en base 10. CT (control sin estrés); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal); BS+AMF (combinación de bioestimulante con hongo micorrícico arbuscular); BS+PGPB (combinación de bioestimulante con Bacteria promotora del crecimiento vegetal)..... 20

Figura 9. Análisis de agrupación jerárquica con mapa de calor (Heatmap) de los patrones de respuesta metabólica de hoja de tomate a diferentes tratamientos con bioestimulante y bajo condiciones normales (verde) y de estrés abiótico (rojo) construido a partir de valores absolutos de metabolitos primarios. Las diferentes escalas de color representan el nivel relativo de los metabolitos siendo la coloración rojiza una acumulación ascendente y la coloración azulada una acumulación descendente. Fold Change: 1,5 y t-test: 0,5 raw. 21

Figura 10. Análisis de agrupación jerárquica con mapa de calor (Heatmap) de los patrones de respuesta metabólica de raíz de tomate a diferentes tratamientos con

bioestimulante y bajo condiciones normales (verde) y de estrés abiótico (rojo) construido a partir de valores absolutos de metabolitos primarios Las diferentes escalas de color representan el nivel relativo de los metabolitos siendo la coloración rojiza una acumulación ascendente y la coloración azulada una acumulación descendente. Fold Change: 1,5 y t-test: 0,5 raw. 21

Figura 11. Diagrama de Venn de los metabolitos significativamente diferencialmente acumulados comunes entre tratamientos en hoja condiciones normales (a) y bajo estrés salino (b). Fold Change $\geq 1,5$ y p-valor $\leq 0,05$. BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrízico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal). 24

Figura 12. Diagrama de Venn de los metabolitos significativamente diferencialmente acumulados comunes entre tratamientos en raíz condiciones normales (a) y bajo estrés salino (b). Fold Change $\geq 1,5$ y p-valor $\leq 0,05$. BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrízico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal). 25

Figura 13. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales PLS-DA de muestras de hoja en condiciones sin estrés donde se compararon el tratamiento (violeta) con el control (verde). a) CT vs BS, (b) CT vs AMF, (c) CT vs PGPB, (d) CT vs BS+AMF, (e) CT vs BS+PGPB. La varianza en el componente Y es mayor del 15 % a excepción del gráfico (b) y (d) que es del 13 y 14,3 % respectivamente. En el componente X la varianza es mayor del 40 % a excepción del gráfico (b) que es del 30,2 %. CT (control sin estrés); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrízico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal). 26

Figura 14. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales PLS-DA de muestras de hoja en condiciones de estrés donde se compararon el tratamiento (violeta) con el control (verde). (a) NaCl vs BS, (b) NaCl vs AMF, (c) NaCl vs PGPB, (d) NaCl vs BS+AMF, (e) NaCl vs BS+PGPB. La varianza en el componente Y es mayor del 24,7 % a excepción del gráfico (a) que es del 17,2 % y en el componente X es mayor del 48,3 % a excepción del gráfico (b) que es del 30,5 %. NaCl (control con estrés salino); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrízico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal). 27

Figura 15. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales PLS-DA de muestras de raíz en condiciones sin estrés donde se compararon el tratamiento (violeta) con el control (verde). (a) CT vs BS, (b) CT vs AMF, (c) CT vs PGPB, (d) CT vs BS+AMF, (e)

CT vs BS+PGPB. La varianza en el componente Y es mayor del 14,0 % y en el componente X mayor del 33,4 % a excepción del gráfico (e) que es del 28,1 %. CT (control sin estrés); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal). 28

Figura 16. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales PLS-DA de muestras de raíz en condiciones de estrés donde se compararon el tratamiento (violeta) con el control (verde). (a) NaCl vs BS, (b) NaCl vs AMF, (c) NaCl vs PGPB, (d) NaCl vs BS+AMF, (e) NaCl vs BS+PGPB. La varianza en el componente Y es mayor del 26,4 % a excepción del gráfico (a) y (b) que es del 7, 6 y 7,3 % respectivamente. En el componente X la varianza es mayor del 42,6 % a excepción del gráfico (d) que es del 29,3 %. NaCl (control con estrés salino); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal). 28

Figura 17. Diagrama radial del contenido metabólico en valores absolutos en hoja para ambas condiciones (normales y estrés abiotico) y todos los tratamientos. Los diferentes colores representan los diferentes tratamientos tanto en una situación con y sin estrés y el eje se encuentra en escala logarítmica en base 10. CT (control sin estrés); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (Bacteria promotora del crecimiento vegetal); BS+AMF (combinación de bioestimulante con hongo micorrícico arbuscular); BS+PGPB (combinación de bioestimulante con Bacteria promotora del crecimiento vegetal). 29

Figura 18. Diagrama radial del contenido metabólico en valores absolutos en raíz para ambas condiciones (normales y estrés abiotico) y todos los tratamientos. Los diferentes colores representan los diferentes tratamientos tanto en una situación con y sin estrés y el eje se encuentra en escala logarítmica en base 10. CT (control sin estrés); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal); BS+AMF (combinación de bioestimulante con hongo micorrícico arbuscular); BS+PGPB (combinación de bioestimulante con Bacteria promotora del crecimiento vegetal). 30

Figura 19. Fitohormonas presentes en hoja en condiciones sin estrés y con estrés. En el eje X se tienen los tratamientos y en el eje Y se representa la diferencia de concentración de la hormona del tratamiento con respecto al control en ng/g. (a) IAA, (b) OPDA, (c) ABA, (d) JA-ile, (e) JA, (f) PA, (g) SA, (h) IPR. 32

Figura 20. Composición de las giberelinas presentes en hoja en condiciones sin estrés y con estrés. En el eje X se tienen los tratamientos y en el eje Y se representa la diferencia de concentración de la hormona del tratamiento con respecto al control en ng/g. Giberelinas: GA1 (azul oscuro), GA19 (rojo), GA3 (gris), GA20 (amarillo), GA4 (azul claro), GA7 (verde)..... 33

Figura 21. Fitohormonas presentes en hoja en condiciones sin estrés y con estrés. En el eje X se tienen los tratamientos y en el eje Y se representa la diferencia de concentración de la hormona del tratamiento con respecto al control en ng/g. (a) IAA, (b) OPDA, (c) ABA, (d) JA-ile, (e) JA, (f) PA, (g) SA, (h) IPR. 35

Figura 22. Composición de las giberelinas presentes en raíz en condiciones sin estrés y con estrés. En el eje X se tienen los tratamientos y en el eje Y se representa la diferencia de concentración de la hormona del tratamiento con respecto al control en ng/g. Giberelinas: GA1 (azul oscuro), GA19 (rojo), GA3 (gris), GA20 (amarillo), GA4 (azul claro), GA7 (verde)..... 36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características del sustrato Terra Vagiota empleadas en el ensayo en una proporción 2:1 con arena de río.	10
Tabla 2. Composición de la solución nutritiva empleada en el estudio para el riego de los cultivos.	10
Tabla 3. Metabolitos primarios sobreacumulados y subacumulados para cada tratamiento en hoja y raíz comparados con su control. Fold Change $\geq 1,5$ y t-test $\leq 0,05$ raw.	23

ABREVIATURAS

µg → microgramo

µL → microlitro

ABA → Ácido abscísico

AMF → Hongo micorrízicos arbusculares

BS → Bioestimulante

Ca⁺² → Ion calcio

Cl⁻ → Ion cloro

CT → Control

EBIC → Consejo Europeo de la Industria de Bioestimulantes

FCH → Fold Change

g → gramo

GA1 → Giberelina 1

GA19 → Giberelina 19

GA20 → Giberelina 20

GA3 → Giberelina 3

GA4 → Giberelina 4

GA7 → Giberelina 7

GABA → Ácido gamma-aminobutírico

H₂PO₄⁻ → Ácido fosfórico

HCO₃⁻ → Bicarbonato

HPLC → High performance liquid chromatography

IAA → Ácido indol-3-acético

INE → Instituto Nacional de Estadística

IPR → Isopenteniladenosina

ISTD → Dilución de estándar interno

JA → Ácido jasmónico

JA-ile → Jasmonoil-L-isoleucina

K⁺ → Ion potasio

mg → miligramo

Mg⁺² → Ion magnesio

mL → mililitro

mMol → milimolar

MSTFA-Mix → N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida + FAME-Mix

Na⁺ → Ion sodio

NaCl → Cloruro sódico

NH₄ → Amonio

NO₃⁻ → Nitrato

NPKs → Fertilizante que contiene nitrógeno, fósforo y potasio

°C → grado centígrado

OPDA → Ácido 12-oxofitodienoico

PA → Poliamina

PCA → Análisis de Componentes Principales

PGPB → bacterias promotoras del crecimiento vegetal

PLS-DA → Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales

ppb → Partes por billón

PTFE → Politetrafluoroetileno

ROS → Especies Reactivas de Oxígeno

SA → Ácido salicílico

UFC → Unidades formadoras de colonias

USD → Dólares Estadounidenses

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

La agricultura global está siendo amenazada por acontecimientos climáticos extremos como altas temperaturas, sequías e inundaciones que están dañando los cultivos y reduciendo la producción de alimentos. Entre los factores que limitan la productividad, la salinidad es considerada uno de los estreses abióticos más importantes al afectar al crecimiento, la productividad y el rendimiento de los cultivos, provocando un creciente interés por el uso de bioestimulantes como alternativas. Los bioestimulantes son insumos agrícolas de origen natural y pueden mejorar el rendimiento de los cultivos en condiciones de estrés. El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto de un formulado de bioestimulantes en combinación con bacterias promotoras del crecimiento y de hongos micorrízicos con el fin de detectar posibles efectos sinérgicos mediante el análisis de metabolitos primarios y hormonas.

En el presente trabajo se realizó un análisis metabólico y hormonal de plantas de tomate *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom tratadas con bioestimulantes (microbianos y no microbianos y su combinación) sometidas a estrés salino.

Al realizar el análisis metabolómico se observó que hay varios metabolitos comunes tanto en raíz como en hoja como el GABA, la prolina, el ácido aspártico, varios carbohidratos y el mioinositol. En raíz, el ácido nicotínico sobresalió en aquellos tratamientos con hongo micorrízico arbuscular, con bacteria promotora del crecimiento y con la combinación del bioestimulante con ambos microorganismos independientemente en condiciones estresantes. En el análisis hormonal destacó principalmente la concentración de ácido abscísico, poliamina tanto en hoja como en raíz.

Este trabajo concluye que la utilización de bioestimulantes en tomate sometidas a estrés salino tiene un efecto en la regulación metabólica y hormonal, favoreciendo la acumulación de productos que amortiguan los efectos del estrés abiótico.

Palabras clave: PGPB, bioestimulante, AMF, *Solanum lycopersicum*, hormonas, metabolitos, iones, estrés salino.

2. ABSTRACT AND KEY WORDS

Global agriculture is compromised by extreme environmental events such as high temperatures, droughts and floods that are damaging crops and reducing food production. Among the factors limiting agricultural yield, salinity is considered one of the most important abiotic stresses by affecting crop growth, development, and yield. This has generated a growing interest in the use of biostimulants as a way of counteracting salt stress. Biostimulants are agricultural inputs of natural origin able to improve crop performance under stress conditions. The objective of the current work is to evaluate the effect of a biostimulant formulation in combination with growth-promoting bacteria and mycorrhizal fungi in order to, detect possible synergistic effects by analyzing primary metabolites and hormones.

We have performed a metabolomics and hormonal analysis of the tomato *Solanum lycopersicum* cv. *Micro-Tom* treated with bioestimulants –microbial, non-microbial and their combination- under salinity stress.

Metabolomic analysis has shown that there are several common metabolites in both root and leaf, such as GABA, proline, aspartic acid, several carbohydrates and myoinositol. In the root, nicotinic acid predominates in the treatments with arbuscular mycorrhizal fungi, with growth-promoting bacteria and with or without biostimulant independently of stress conditions. In the hormonal analysis, the concentration of abscisic acid, polyamine and salicylic acid in leaves and roots was the most important.

As a conclusion, the use of bioestimulants in tomato under salinity stress regulates the metabolomic and hormonal effect, supporting the role of the assayed formulation as a good tool for farmers against abiotic stress.

Key words: PGPB, bioestimulants, AMF, *Solanum lycopersicum*, hormones, metabolites, ions, saline stress.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Problemática ambiental que afronta la agricultura actual.

El límite de sostenibilidad de la Tierra se está alcanzando. La población mundial actual es de más de 7,5 mil millones de habitantes. A la velocidad de crecimiento actual, se espera que para el año 2050 se alcancen los 9,7 mil millones de habitantes. Este incremento poblacional supondrá un aumento alarmante en la demanda de alimentos, (Cristofano et al., 2021), lo que obligará a obtener entre un 70 y un 80 % más de la producción existente (FAO, 2009) por lo que el rendimiento agrícola en países en desarrollo deberá incrementarse notablemente (FAO, 2012). El necesario incremento de producción en la industria agrícola se enfrenta a limitaciones diversas que hay que superar para alcanzar los objetivos de desarrollo sostenible propuestos por las Naciones Unidas como, por ejemplo, erradicar la hambruna para el año 2030 (García-García et al., 2020).

El aumento poblacional no es el único riesgo al que se enfrenta la población actualmente: el calentamiento global antropogénico está causando alteraciones climáticas que afectan al medio ambiente (Taïbi et al., 2015) dificultando la producción de los cultivos (García-García et al., 2020); y el daño ambiental causado por la sobreproducción agrícola e industrial tiene como consecuencias es la desertificación de la tierra y la eutrofización de las aguas (Castillo Sánchez, 2004.). Además, resulta urgente la reducción del uso de recursos, como los fertilizantes, el control en el uso del agua de riego; y la necesidad de mejorar las prácticas de cultivo intensivas. Se estima que los riesgos mencionados han provocado que más del 40 % del terreno destinado a cultivo disminuya su producción (Del Buono, 2021) debido a la salinización de los terrenos (Cristofano et al., 2021) y al desequilibrio de nutrientes en los suelos cultivables (Shukla et al., 2019).

Cabe destacar que, en el siglo XX la Revolución Verde contribuyó con la implantación de metodologías innovadoras como los fungicidas, los fertilizantes no orgánicos y la nueva maquinaria (Mulet, JM., 2020) que modificó la agricultura y evitó la transformación de miles de hectáreas para cultivo. Además, ayudó a la disminución de la pobreza y la hambruna, pero el uso imprudente de las metodologías agrarias implementadas y de los insumos empleados provocaron una erosión genética de las especies agrícolas, una acumulación de agroquímicos tanto en el suelo como en aguas subterráneas y la

liberación de gases de efecto invernadero (Pingali, 2012), que representan el 14 % del total mundial de emisiones (Del Buono, 2021; AEMA, 2015.).

Asimismo, es importante mencionar que los cambios climáticos provocados por el hombre causarán desastres naturales más frecuentemente en los próximos años, como inundaciones y sequías (Del Buono, 2021), que pueden dañar los cultivos y reducir aún más los rendimientos. La sequía y la salinidad son dos de los factores ambientales más importantes que afectan a los cultivos de todo el mundo y, por lo tanto, disminuyen la producción de alimentos (Kaymakanova, 2014). Se calcula que hasta un 50% de las pérdidas en los cultivos a nivel mundial son debidas al estrés abiótico (condiciones adversas por la modificación de parámetros ambientales) y biótico (derivado agentes patógenos y depredadores parásitos) (Bhupenchandra et al., 2022; de Melo et al., 2022).

La salinidad, debida a la presencia de iones en el medio, principalmente de cloro y sodio y agravada por la evaporación debido a las altas temperaturas, la disminución de las precipitaciones y las aguas con altas conductividades eléctricas (Bhupenchandra et al., 2022), afecta al 20 % del total de las tierras cultivadas y al 33 % de las tierras agrícolas de regadío. Si esta tendencia continúa, el 50 % de la tierra cultivable estaría salinizada para 2050 y, el desarrollo de las plantas se vería perjudicado disminuyendo su productividad (Jamil et al., 2011). La presencia de sal a bajas concentraciones puede suponer una ayuda en el desarrollo de las plantas halófitas, pero en las plantas glicófitas afecta negativamente a la germinación de las semillas y al crecimiento y desarrollo de las plantas (Y. Ma et al., 2020; Shukla et al., 2019), pudiendo llegar a ocasionar la muerte de las mismas (Yasar et al., 2013). Además, puede afectar significativamente al balance entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y a la actividad amortiguadora de los antioxidantes, lo que a menudo provoca daños oxidativos en los diferentes tejidos (Kusvuran et al., 2016), al metabolismo del carbono y al nitrógeno; e inducir alteraciones en intermediarios del ciclo de Krebs, de azúcares y de aminoácidos (Chevilly et al., 2021).

La salinidad genera efectos dañinos mediante la inhibición osmótica en el medio y el desequilibrio iónico dentro de la planta (Cheeseman, 2013). La inhibición osmótica genera un crecimiento más lento debido a que el alto contenido de sales disminuye la capacidad de absorción de agua. La toxicidad iónica también reduce la velocidad de crecimiento del organismo vegetal (Munns, 2002). En este caso, el ion sodio (Na^+) tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de las enzimas (H. Wu et al., 2018) además de un efecto osmótico en el exterior de la planta (Locascio et al., 2019) y que el cloro (Cl^-) presente en el cultivo no se excluye de la planta como debería; aspecto crucial para la

tolerancia salina (Geilfus, 2018). No obstante, la planta, con el fin de disminuir esta afección, cierra los estomas rápidamente reduciendo la tasa fotosintética, y disminuyendo la absorción de dióxido de carbono. Esto acaba afectando a la concentración de carbohidratos presente en la hoja y provoca la conversión de fuente a sumidero (Zuzunaga-Rosas et al., 2023).

Conseguir adaptarse al estrés salino requiere de una respuesta coordinada por parte de múltiples fitohormonas incluyendo ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA), ácido giberélico (GA), etileno y ácido salicílico (SA) (Figura 1). Entre todas estas hormonas vegetales, se puede destacar a ABA, molécula de señalización que provoca el cierre estomático. Además, regula genes y metabolitos implicados en la homeostasis de iones, además de activar toda la respuesta frente al estrés abiótico (Osakabe et al., 2014). La presencia de estrés abiótico induce un aumento de la concentración de esta hormona (Fricke et al., 2004; W. Jia et al., 2002).

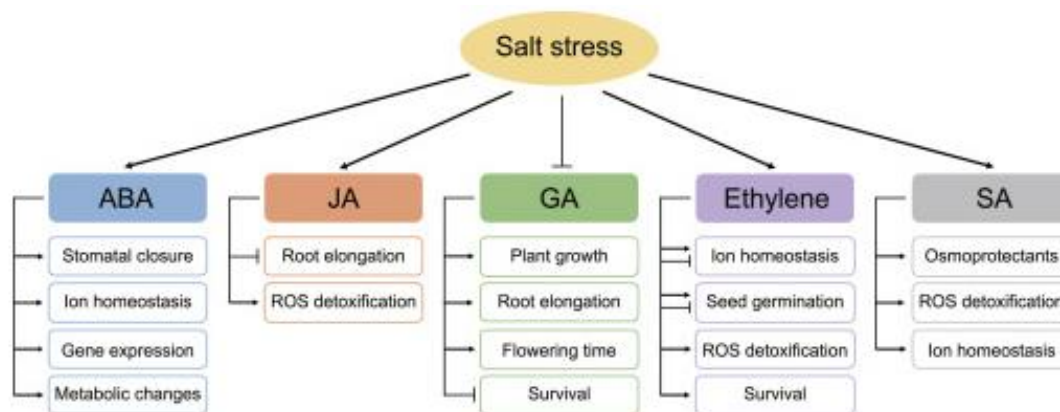


Figura 1. Compuestos que participan en la adaptación frente al estrés salino y sus correspondientes respuestas frente a esta situación (Kaushal et al., 2023).

Otra hormona que participa en la respuesta a estrés es el ácido jasmónico necesario para la inhibición de la elongación de la raíz y la activación de enzimas antioxidantes tras la exposición a una elevada salinidad. Por otra parte, la acumulación de ácido giberélico endógeno se ve reducido por el estrés salino inhibiendo el crecimiento de las plantas, el alargamiento de las raíces el retraso de la floración y promoviendo la supervivencia en condiciones de alta salinidad (El-Sharkawy et al., 2021). El ácido salicílico también se ha relacionado con la respuesta a salinidad (Souana et al., 2020).

Para poder abordar los desafíos actuales –el cambio climático, el necesario incremento de productividad y la eficiencia capaz de satisfacer la demanda de alimentos y generar cultivos resistentes– se están buscando y desarrollando metodologías que no impliquen

una amenaza a la salud de la biosfera, como el uso de bioestimulantes agrícolas (Saporta et al., 2019).

3.2. Bioestimulantes vegetales, una nueva estrategia en la producción agrícola.

Los bioestimulantes son una categoría emergente de insumos agrícolas que pueden mejorar el rendimiento de los cultivos, al ser capaces de modificar los procesos fisiológicos de las plantas, tanto en condiciones normales como de estrés abiótico. En los últimos años, se ha incrementado su interés debido a que por su origen natural pueden utilizarse en agricultura convencional y ecológica, por lo que pueden ayudar a asegurar altos rendimientos de cultivos en condiciones de cambio climático. En concreto, los bioestimulantes pueden mejorar la productividad y la eficiencia de los cultivos, la floración, el crecimiento del organismo, la producción de frutos, y la tolerancia frente a factores ambientales estresantes (Colla & Roupael, 2015). El Consejo Europeo de la Industria de Bioestimulantes (EBIC), define los bioestimulantes como “sustancia(s) y/o microorganismos cuya función, cuando se aplican a los cultivos o a la rizosfera, es estimular los procesos naturales para mejorar/beneficiar la absorción de nutrientes, la eficiencia de los nutrientes, la tolerancia al estrés abiótico y la calidad de los cultivos” (du Jardin, 2015). Los bioestimulantes se pueden clasificar en ocho tipos diferentes: (1) sustancias húmicas, (2) compuestos orgánicos complejos, (3) elementos químicos beneficiosos, (4) sales inorgánicas, (5) extractos de algas marinas y productos botánicos, (6) quitina y derivados del quitosano, (7) antitranspirantes y (8) aminoácidos libres y otros compuestos nitrogenados. Existiría una categoría adicional que englobaría a los bioestimulantes de origen bacteriano y que tienen un gran potencial como promotores del crecimiento vegetal (García-García et al., 2020).

Los bioestimulantes no son considerados agroquímicos debido a que no tienen una acción directa contra agentes bióticos ni aportan directamente nutrientes, y, sin embargo, facilitan la absorción de nutrientes del suelo (Posmyk & Szafrńska, 2016), y mejoran la respuesta bioquímica contra estreses abióticos (Drobek et al., 2019). Debido al potencial que presentan, la Comisión Europea plantea para finales del 2050, el replazo del 50 % de los fertilizantes químicos (Bhupenchandra et al., 2022); y se espera que para el 2025 el mercado mundial de bioestimulantes alcance los 4140 millones de dólares estadounidenses (USD) (García-García et al., 2020).

Un bioestimulante eficiente debería cumplir las siguientes características: (1) tiene que ser inocuo, es decir, no tóxico para plantas y humanos, además de seguro para la biosfera; (2) tiene que poder ser fácilmente absorbible por el cultivo deseado; (3) debe ser asequible económicamente; (4) debe poder ser disuelto en diferentes solventes como agua, alcoholes o lípidos para facilitar su aplicación; (5) debe penetrar fácilmente en los compartimentos celulares y (6) debe mejorar la resistencia de la planta frente a condiciones que perjudiquen su integridad (Posmyk & Szafrńska, 2016).

Actualmente, el uso de bioestimulantes en cultivos se está incrementando con el fin de mantener un ecosistema sostenible y garantizar la seguridad alimentaria adecuada, alcanzando un aumento del rendimiento empleando bioestimulante de hasta el 17,9 % en los cultivos de cereales, legumbres, frutas y verduras (Bhupenchandra et al., 2022). Es por ello que una nueva generación de bioestimulantes es necesaria para incrementar la productividad, el rendimiento; y, además, generar una resistencia frente a las condiciones crecientes provocadas por el calentamiento global antropogénico y el aumento poblacional (Benito et al., 2022).

3.3. Cultivo hortícola en España y en la Comunidad Valenciana.

El cultivo de hortalizas es uno de los sectores agrícolas que están sufriendo más gravemente los efectos de la sequía y la salinidad. Esto es debido a que son cultivos de altos requerimientos hídricos y sensibles a suelos de alto contenido salino (Zuzunaga-Rosas et al., 2023).

La superficie agrícola en el 2020 según el Instituto Nacional de Estadística (INE) comprende 23,9 millones de hectáreas, correspondiendo 2.731 de éstas a huertos. El número de explotaciones agrícolas anuales es de 914.871 hectáreas correspondiendo 40.497 hectáreas a hortalizas. España es el productor principal de productos hortícolas de la Unión Europea (26%) y el séptimo a nivel global. En 2021, la producción española se incrementó en un 4% respecto al 2020 alcanzando los 29 millones de toneladas (INE, 2020). En la Comunidad Valenciana, el cultivo de hortalizas se distribuye en 139.509 m² de superficie al aire libre, y 433.334 m² en invernadero. Cabe destacar que el séptimo cultivo de hortalizas de la Comunidad Valenciana son los tomates, alcanzando los 14.981.815 de unidades de tomate producidas (INE, 2022).

El tomate (*Solanum lycopersicum L.*) es uno de los cultivos hortícolas más destacados por su elevado valor nutricional al contener una gran fuente de antioxidantes, minerales

y vitaminas, entre otros compuestos. Se caracteriza por presentar una tolerancia muy baja al estrés salino, ya que es muy sensible en sus primeras fases de desarrollo (Zuzunaga-Rosas et al., 2023). Es por ello, que en la Comunidad Valenciana están apareciendo muchos problemas en su cultivo debido al riego con agua de pozo contaminada por la proximidad del mar. Esto provoca la imposibilidad de alcanzar los mínimos objetivos de producción establecidos por la comunidad agrícola valenciana.

3.4. Antecedentes de este estudio.

El producto bioestimulante formulado de origen no microbiano utilizado en el presente estudio fue previamente caracterizado en el laboratorio donde se ha realizado el presente Trabajo Final de Grado (Benito et al, 2022). Este proyecto es el resultado de un convenio de investigación con la empresa CALDIC, gracias al cual se ha desarrollado un nuevo producto denominado como Calbio.

La formulación utilizada es una combinación de extracto de levadura, extracto del alga *Ascophyllum nodosum*, extracto de raíz de regaliz y extracto de sauce blanco. Estudios previos en *A. thaliana*, mostraron que el uso de esta combinación bajo estrés salino presentó un efecto positivo en la acumulación de biomasa vegetal y, por ende, mayor desarrollo de la planta.

4. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es evaluar el efecto de un formulado de bioestimulante en combinación con bacterias promotoras del crecimiento y de hongos micorrízicos con el fin de detectar posibles efectos sinérgicos. La medida de esos efectos se realizará mediante el planteamiento de los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar el cambio metabólico en plantas de tomate en condiciones de estrés salino.
2. Analizar el perfil de respuesta hormonal en diferentes condiciones de estrés.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Preparación del cultivo y condiciones de crecimiento.

La superficie de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) fue esterilizada con una solución diluida (1:1) de hipoclorito de sodio al 3% durante 15 minutos y posteriormente fueron enjuagadas 4 veces con agua destilada estéril. La germinación de las semillas se realizó en semilleros con fibra de coco para la obtención de plántulas homogéneas. Dichos semilleros se prepararon en CUCALA AGRICOLA S.L. (38°56'42" N, 0°25'42" W) entre mayo y junio de 2022.

Posteriormente, las plántulas con un desarrollo homogéneo se trasplantaron, a macetas (20x20x25cm) de 5 litros (L) dispuestas en zig-zag con una separación de 15 cm (Figura 2) donde se realizaron los diferentes tratamientos, descritos a continuación en el punto 5b. El invernadero, ubicado en el Centro de Experiencias Cajamar (Païporta, Valencia) (39°25'01" N, 0°25'04" W), era de malla de modo que las condiciones no estaban reguladas artificialmente dentro de la instalación. La temperatura, humedad y horas de luz dependieron de la meteorología acontecida entre las fechas del ensayo (junio y agosto del año 2022). Durante este periodo de tiempo, la temperatura media en España rondó los 24°C considerándose el verano más cálido desde 1961. En concreto, en la Comunidad Valenciana se observó un incremento de entre 3 y 4°C en comparación con otros años, especialmente durante el mes de agosto donde se superó el incremento de los 4°C. Respecto a las precipitaciones, en el verano de 2022 se notificó como el verano más seco desde 1961 con un valor medio de 49,2 mm, representando el 65 % del valor normal según el periodo de referencia 1981-2010 (AEMET, 2022). Además, las horas de luz solar abarcaron entre 10 y 13 horas diarias según datos recogidos de la AEMET.

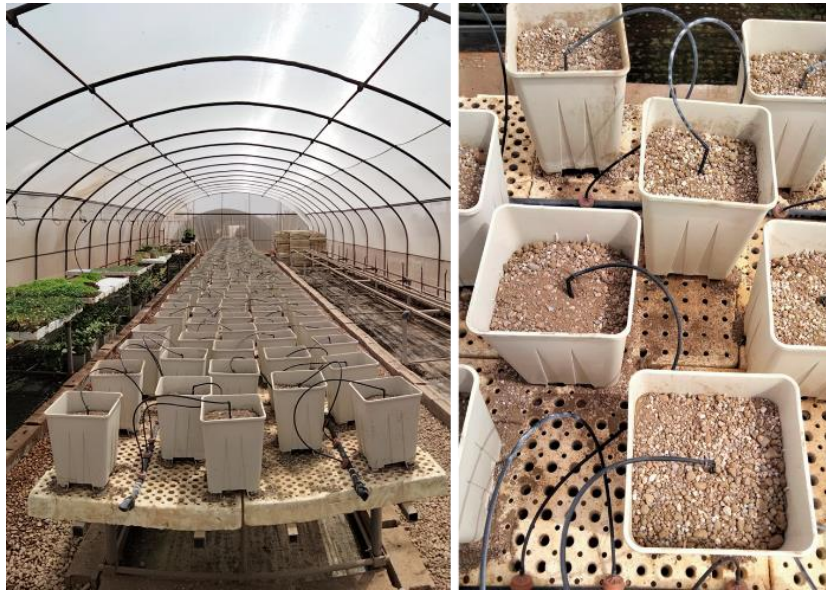


Figura 2. Disposición en zig-zag de las macetas de los cultivos con una separación entre ellas de 15 cm en los invernaderos del Centro de Experiencias Cajamar (Paiporta, Valencia).

La composición del suelo empleado correspondió a una mezcla de sustrato (Tabla 1), Terra Vagiota (Grupo Valagussa, Italia), con arena de río en una proporción 2:1. El riego se realizó con solución nutritiva preparada por la Fundación Cajamar (Tabla 2), suministrándose a cada maceta mediante goteo diariamente, durante el ciclo de crecimiento de las plantas, empleando un sistema compuesto por dos líneas portagoteros de 16 mm de diámetro, sobre las que se pincharon los goteros autocompensantes de un caudal de 2 litros/hora. La composición de la solución contuvo una concentración de 25 % de fósforo (P) para evitar la inhibición de la colonización de la raíz por hongos micorrízicos arbusculares (AMF). Los valores de conductividad eléctrica (CE) y de pH fueron de 2,5 mS/cm y 6,0 respectivamente.

Tabla 1. Características del sustrato Terra Vagiota empleadas en el ensayo en una proporción 2:1 con arena de río.

GRANULOMETRÍA	2-25 mm
PH	8,11
NPKS	1 Kg/m ³
CACo₃ y MG	2,7 Kg/m ³
CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA	1,8 mS/m
CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIÓNICO	9,9 meq/100 g
CARBONO ORGÁNICO	13 g/Kg
N₂ TOTAL	<5 g/Kg
FÓSFORO SOLUBLE	27 mh/Kg
POTASIO SOLUBLE	110-3300 mg/Kg
HUMEDAD	50-65%
DENSIDAD SECA APARENTE	80 Kg/m ³

Tabla 2. Composición de la solución nutritiva empleada en el estudio para el riego de los cultivos.

Composición de la solución nutritiva	Concentración (mMol/L)
NO₃⁻	13
H₂PO₄⁻	0,3
SO₄⁻²	3,24
HCO₃⁻	1
Cl⁻	4,8
NH₄⁺	1,6
K⁺	6,1
Ca⁺²	4,6
Mg⁺²	2
Na⁺	2,3

Con respecto a la aplicación del estrés salino, las plantas se dejaron crecer durante cuatro semanas antes del tratamiento con salinidad para permitir que alcanzaran un desarrollo adecuado de las plantas y el apropiado establecimiento de las relaciones simbióticas. Para el estrés salino, se aplicaron 70 mL a cada maceta de una solución salina de preparada en agua destilada. La concentración de sal se incrementó gradualmente en 20 mM en días alternativos para evitar un choque osmótico hasta

alcanzar la concentración de 100 mM. Se invirtió aproximadamente 10 días en alcanzar los deseados 100 mM. A partir de ese entonces se regó con una solución NaCl 100 mM durante 4 semanas. Las plantas se mantuvieron en estas condiciones hasta la completa recolección de la cosecha. En las plantas donde no se aplicó estrés, se regaron con 70 ml de agua destilada. El riego con solución nutritiva se interrumpió aquellos días que se aplicó estrés salino.

5.2. Tratamientos y su aplicación.

Los tratamientos empleados fueron:

1) Tratamiento control (CT), 2) Tratamiento con bioestimulante (BS), 3) Tratamiento con hongos micorrízicos arbusculares (AMF), 4) Tratamiento con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), 5) Tratamiento con bioestimulante junto con hongos micorrízicos arbusculares (BS+AMF) y 6) Tratamiento con bioestimulante junto con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB).

Además, los ensayos se efectuaron bajo dos condiciones: condiciones normales (sin estrés) y aplicando estrés salino utilizando 100 mM NaCl.

Los AMF utilizados fueron RI6E6, muestra comercial proporcionada por la empresa Caldic Iberica S.L.U (Barcelona), consistente en tierra, esporas, micelios y fragmentos de raíces infectadas. La aplicación a cada maceta se realizó con 5 g de inóculo -600 propágulos infecciosos por gramo de producto- en el momento del trasplante. Asimismo, el PGPB empleado fue la muestra BM08 liofilizada, también proporcionada por la empresa Caldic Iberica S.L.U (Barcelona). El inóculo bacteriano se encontraba en una suspensión celular a una concentración de $1,8 \times 10^9$ UFC/mL; y a cada planta se le inocularon 5 mL de esta solución en la base del tallo después del trasplante.

En total se realizaron 12 tratamientos, realizándose 20 réplicas de cada tratamiento, lo que hizo un total de 240 plantas de tomate ensayadas en este trabajo.

5.3. Recolección de muestras para su análisis.

Las muestras de hoja y raíz analizadas en este trabajo se recolectaron 45 días después de la aplicación del estrés salino. En total las plantas tienen una edad de tres meses teniendo en cuenta el tiempo de germinación y crecimiento en el semillero. Dichos tejidos vegetales fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido en el momento de su recolección y almacenadas a -80°C hasta su uso.

5.4. Análisis metabolitos primarios.

Para el análisis de metabolitos primarios se recolectaron las segundas hojas más jóvenes y las raíces secundarias evitando la raíz principal. Dichos tejidos vegetales se liofilizaron durante dos días y, posteriormente, se homogeneizaron empleando un disruptor tisular de tungsteno (Retsch Ball Mills) y bolas mecánicas durante 1 minuto a una frecuencia de 30/segundo. Seguidamente, se tomaron 10 mg del material vegetal machacado para su procesado. El análisis de metabolitos primarios se llevó a cabo en el servicio de Metabolómica del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC, Valencia, España) utilizando un método modificado del descrito por Roessner et al. (2000). De cada muestra se analizaron 3 réplicas biológicas y de cada uno se realizó tres réplicas técnicas. A las muestras liofilizadas, tanto de raíz como de hoja, se les añadió 1400 μL de metanol al 100%, para detener la actividad enzimática, y 60 μL de Ribitol como estándar interno. La mezcla se agitó y calentó durante 15 minutos a 70°C y se centrifugó a 21952 g durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, donde se agregaron 250 μL de cloroformo y 500 μL de agua, se mezcló con un vórtex y se centrifugó a 1792 g durante 15 minutos. De la mezcla resultante se pasó 150 μL de la fase polar a un nuevo tubo y se dejó secar por evaporación utilizando un *speed-vac* durante tres horas. A la muestra seca se le añadió 40 μL de clorhidrato de metoxiamina en piridina para iniciar la derivatización y se agitó durante 2 horas a 37°C. Seguidamente se le adicionó 70 μL de MSTFA-Mix (1 mL de N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida + 2 μL de FAME-Mix), se agitó durante 30 minutos a 37°C y se transfirió a un vial de medición.

Los cromatogramas y los espectros de masas se evaluaron utilizando el programa CHROMATOF (LECO, St. Joseph, MI), normalizando con peso seco y los datos obtenidos se analizaron mediante el software MetaboAnalyst 5.0 (Wishart Research Group, University of Alberta, Alberta, Canadá) (Xia & Wishart, 2011).

5.5. Análisis de hormonas.

Para el análisis de hormonas se recolectaron las segundas hojas más jóvenes y las raíces secundarias evitando la raíz principal. Dichos tejidos vegetales se liofilizaron y machacaron como se expuso anteriormente y a continuación, se tomaron 10 mg de material vegetal para su análisis. Seguidamente, se añadió a cada muestra 25 μL de

solución ISTD (1 mg/L ABA-d6, DHJA, IAA-d5, ¹³C₆-SA), 1 mL de agua MilliQ y dos cuentas de vidrio para una adecuada homogeneización. Dicha homogeneización se realizó en un disruptor tisular (Retsch Ball Mills) durante 10 minutos a una frecuencia de 15 hercios. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 12300 g y 4°C durante 10 min y se recuperó los sobrenadantes en nuevos tubos. Se ajustó el pH de los sobrenadantes a pH 3 con 20-30 µL de una solución de ácido acético al 30% y se mezcló adecuadamente. Inmediatamente, se realizó una extracción líquido:líquido de los sobrenadantes acidificados con 1 mL de éter dietílico, se mezcló correctamente y se centrifugó a 22000 g durante 11 segundos para facilitar la formación de capas. Se recuperó la fase superior y se realizó de nuevo el proceso de extracción anterior. A continuación, se evaporó la parte de disolvente orgánico a temperatura ambiente en un *speed-vac* durante 1 hora. Cuando las muestras se encontraron totalmente secas, los residuos secos se reconstituyeron con 50 µL de metanol, se sometieron a ultrasonidos durante 5 minutos y después se añadieron 450 µL de agua Milli-Q. Finalmente, se diluyeron los extractos acuosos con agua ultra pura en una proporción 1:4 y se filtraron a través de filtros de membrana de PTFE de 0,2 µm directamente en viales ámbar con tapón de rosca. La medición de las hormonas se realizó en un HPLC (Alliance 2695, Waters Corp., Milford, EEUU) acoplado a un espectrómetro de masas.

Previo a la medición, fue necesario preparar los patrones para hormonas estándar (JA, IAA, OPDA, ABA, PA, SA, IPR) preparando las siguientes concentraciones: de 100 ppb, 80 ppb, 50 ppb, 40 ppb, 20 ppb, 10 ppb, 5 ppb y 2,5 ppb. También se prepararon realizaron los estándares para Giberelinas a 50 ppb, 40 ppb, 25 ppb, 10 ppb 5 ppb, 2,5 ppb y 1,25 ppb. Tras la preparación de los estándares se añadieron 475 µL de disolución junto con 25 µL de hormonas deuteradas en un nuevo tubo. Por último, se tomaron 100 µL de la mezcla anterior y se diluyeron en 300 µL de agua Milli-Q en un nuevo tubo.

Los datos obtenidos a partir de los picos analizados se normalizaron a partir del peso húmedo obteniéndose la concentración de hormona (µg/mg).

5.6. Estadística.

El análisis de los datos para este documento se generó mediante el programa informático MassLynx V4.2 para la determinación hormonal y el programa MetaboAnalyst 5.0 para la determinación metabolómica. Además, se ha empleado el programa Excel para el tratamiento de los resultados obtenidos.

6. RESULTADOS

6.1. Metabolitos primarios.

Se llevó a cabo un análisis metabolómico no dirigido para determinar la respuesta metabolómica de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom a diferentes tratamientos con bioestimulantes bajo condiciones normales y de estrés salino. Se analizaron dos tejidos de la planta: hojas jóvenes y raíces secundarias. En total, se analizaron 28 metabolitos primarios de raíz y 37 de hoja. Los datos se normalizaron por suma y escalado mediante el método de Pareto (centrada en la media y dividida por la raíz cuadrada de la desviación estándar de cada variable).

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de componentes principales (PCA) que permitió conocer las varianzas y la robustez de las réplicas biológicas. Seguidamente se construyó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) donde se obtuvieron resultados semejantes al PCA. Por ello, se seleccionaron los PLS-DA al ser un método supervisado que genera una mayor rigurosidad y fiabilidad a los resultados que los PCA. La visualización de los PLS-DA en hoja y en raíz se realizó comparando los diferentes tratamientos con su control en las diferentes condiciones ensayadas (condiciones normales y estrés salino). En el caso de las muestras extraídas de hoja, se pudo determinar que en la condición sin estrés (Figura 3 a-e) las réplicas biológicas de cada tratamiento (violeta) con su control (verde) se encontraban agrupadas y separadas, sugiriendo una alta reproductibilidad y fiabilidad en los resultados. Además, esto mostró que la composición metabólica de la hoja del tomate se modificó con los tratamientos empleados. En la Figura 4 (a-e), muestra de hoja en condiciones estresantes, se apreció como en las Figuras 4 (b-d) hay cierta distancia entre el grupo control y el tratamiento, pero que en las Figuras 4 (a, e) se acercaban las réplicas en ambas condiciones.

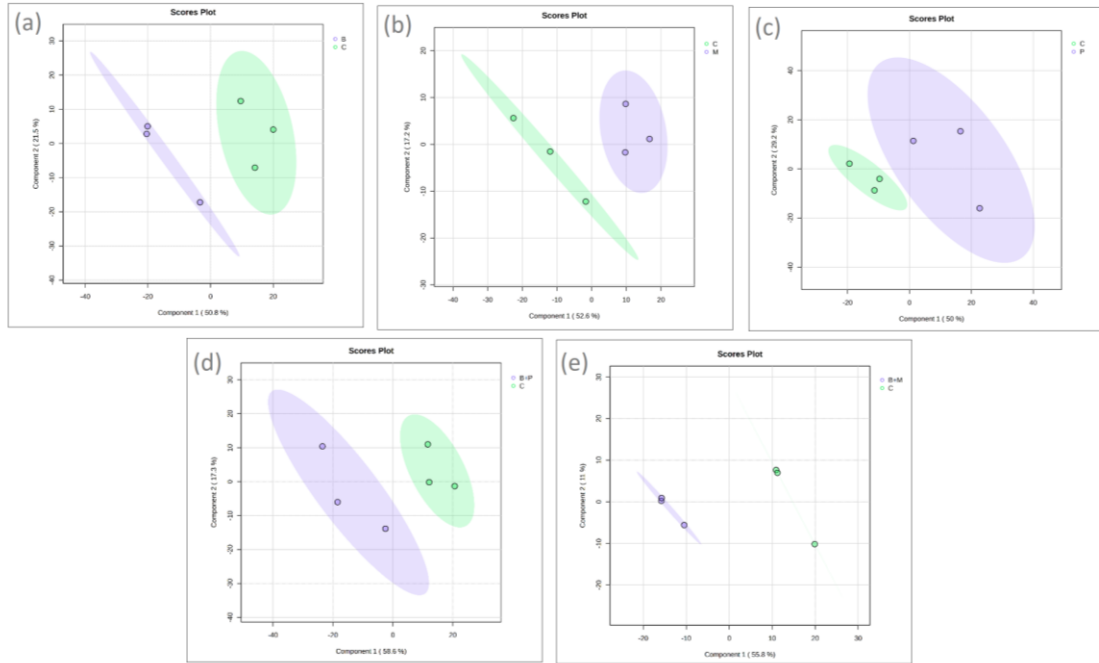


Figura 3. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) de muestras de hoja en condiciones sin estrés donde se compararon el tratamiento (violeta) con el control (verde). (a) CT vs BS, (b) CT vs AMF, (c) CT vs PGPB, (d) CT vs BS+AMF, (e) CT vs BS+PGPB. La varianza en el componente Y es mayor del 17 % a excepción del gráfico (e) que es del 11 % y en el componente X es mayor del 50 %. CT (control sin estrés); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal).

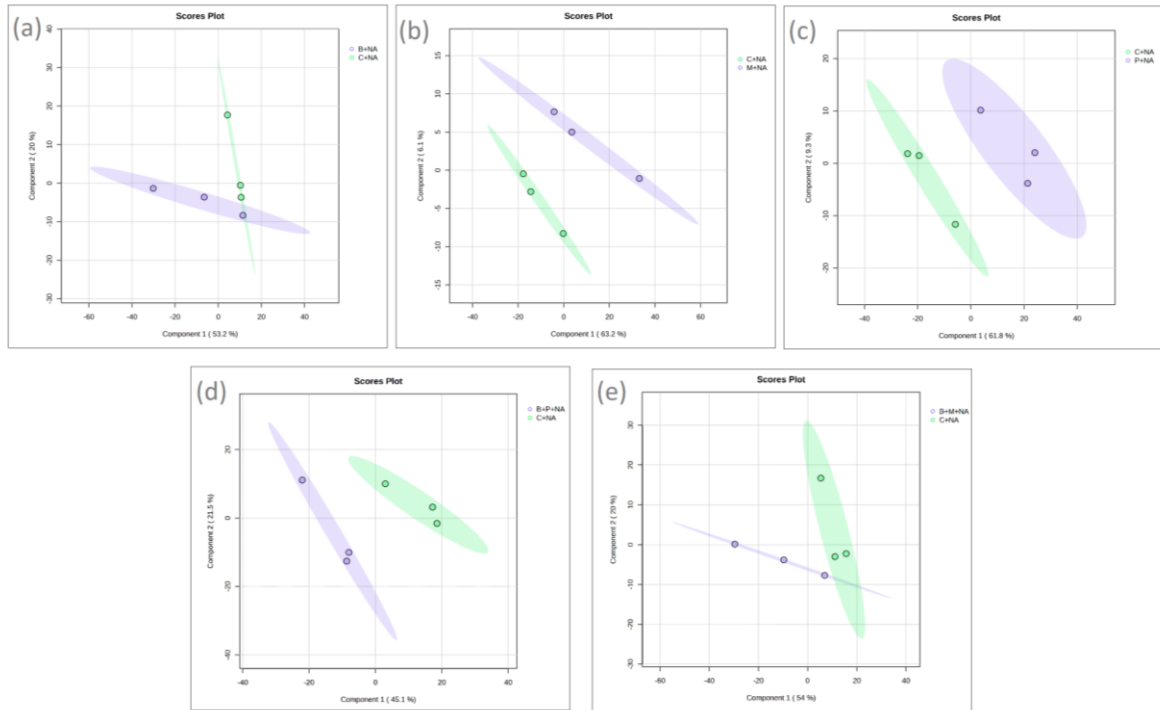


Figura 4. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) de muestras de hoja en condiciones de estrés salino donde se compararon los tratamientos (violeta) con el control (verde). (a) NaCl vs BS, (b) NaCl vs AMF, (c) NaCl vs PGPB, (d) NaCl vs BS+AMF, (e) NaCl vs BS+PGPB. La varianza en el componente Y es mayor del 20,0 % a excepción del gráfico (b) y (c) que es del 6,1 y del 9,8 % respectivamente y en el componente X es mayor del 50 % a excepción del gráfico (d) que es del 45,1 %. NaCl (control con estrés salino); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal).

En las muestras extraídas de raíz se pudo determinar que en la situación sin estrés (Figura 5 a-e) todas las réplicas biológicas en la situación control se encontraban diferenciadas con las réplicas biológicas del tratamiento, aunque las réplicas se encuentran cercanas entre sí. Por otro lado, en la Figura 6 (a-e), muestra de hojas en condiciones estresantes, las muestras también se encuentran bien diferenciadas y distribuidas.

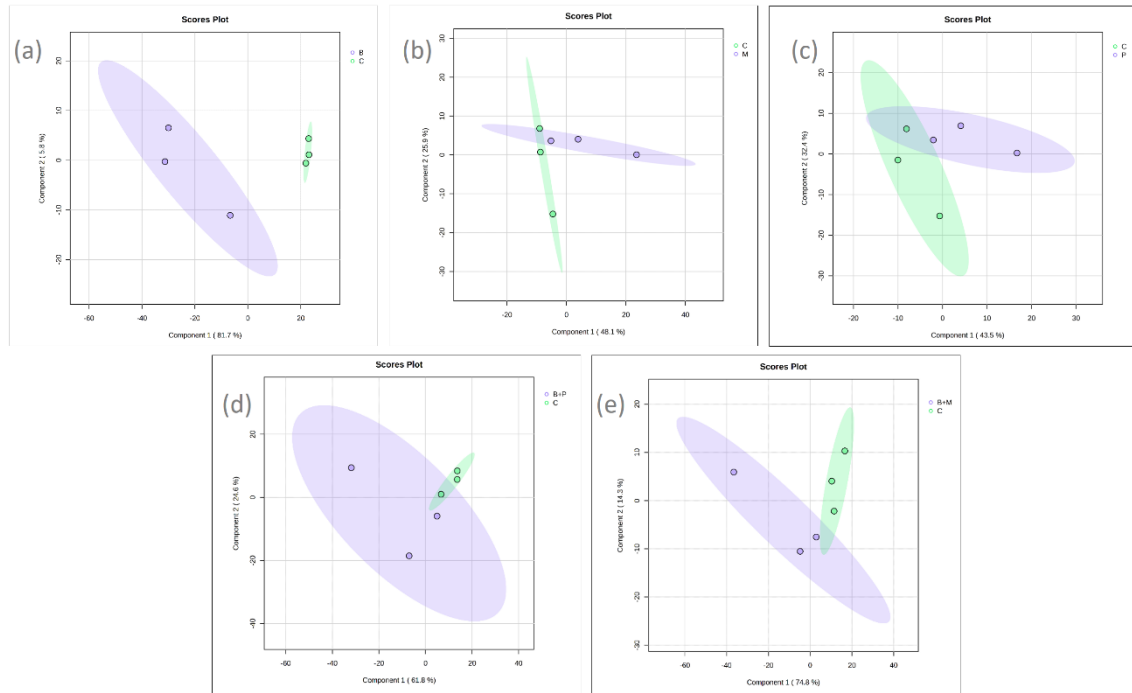


Figura 5. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales PLS-DA de muestras de raíz en condiciones sin estrés donde se compararon los diferentes tratamientos (violeta) con el control (verde). (a) CT vs BS, (b) CT vs AMF, (c) CT vs PGPB, (d) CT vs BS+AMF, (e) CT vs BS+PGPB. La varianza en el componente Y es mayor del 20 % a excepción de (a) y (e) que fue del 5,8 y del 14,3 % respectivamente y en el componente X es mayor del 60,0 % a excepción del gráfico B y C que es del 48,1 y del 43,5 % respectivamente. CT (control sin estrés); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrízico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal).

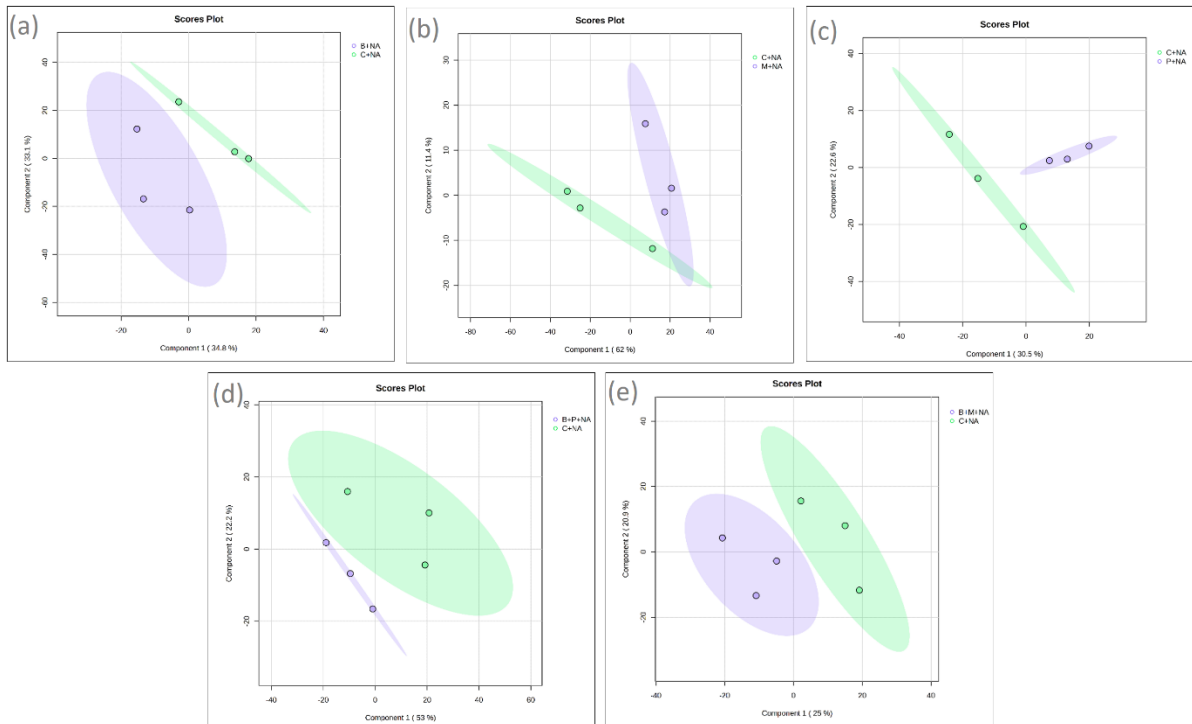


Figura 6. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales PLS-DA de muestras de raíz en condiciones de estrés donde se compararon el tratamiento (violeta) con el control (verde) (a) NaCl vs BS, (b) NaCl vs AMF, (c) NaCl vs PGPB, (d) NaCl vs BS+AMF, (e) NaCl vs BS+PGPB. La varianza en el componente Y es mayor del 20,0 % a excepción en (b) que es del 11,4 % y en el componente X es mayor del 30 % a excepción del gráfico (e) que es del 25 %. NaCl (control con estrés salino); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal).

Para determinar el contenido metabólico de hoja y raíz con los diferentes tratamientos bajo las condiciones ensayadas se realizó un diagrama radial (Figura 7 y 8). En hoja (Figura 7) se observó una respuesta común en todos los tratamientos, viéndose una acumulación en el caso de mioinositol, glucosa, fructosa, GABA y ácido ascórbico y, en menor medida, ácido piroglutámico, prolina y glicerol. Por otro lado, en las raíces (Figura 8) se observó una mayor variación entre los tratamientos, sobre todo en el caso de fructosa, glucosa y prolina. Destacó la acumulación de metabolitos como GABA, ácido piroglutámico, glucosa, fructosa, mioinositol, sacarosa y glicerol, muchos de ellos destacados también en hoja.

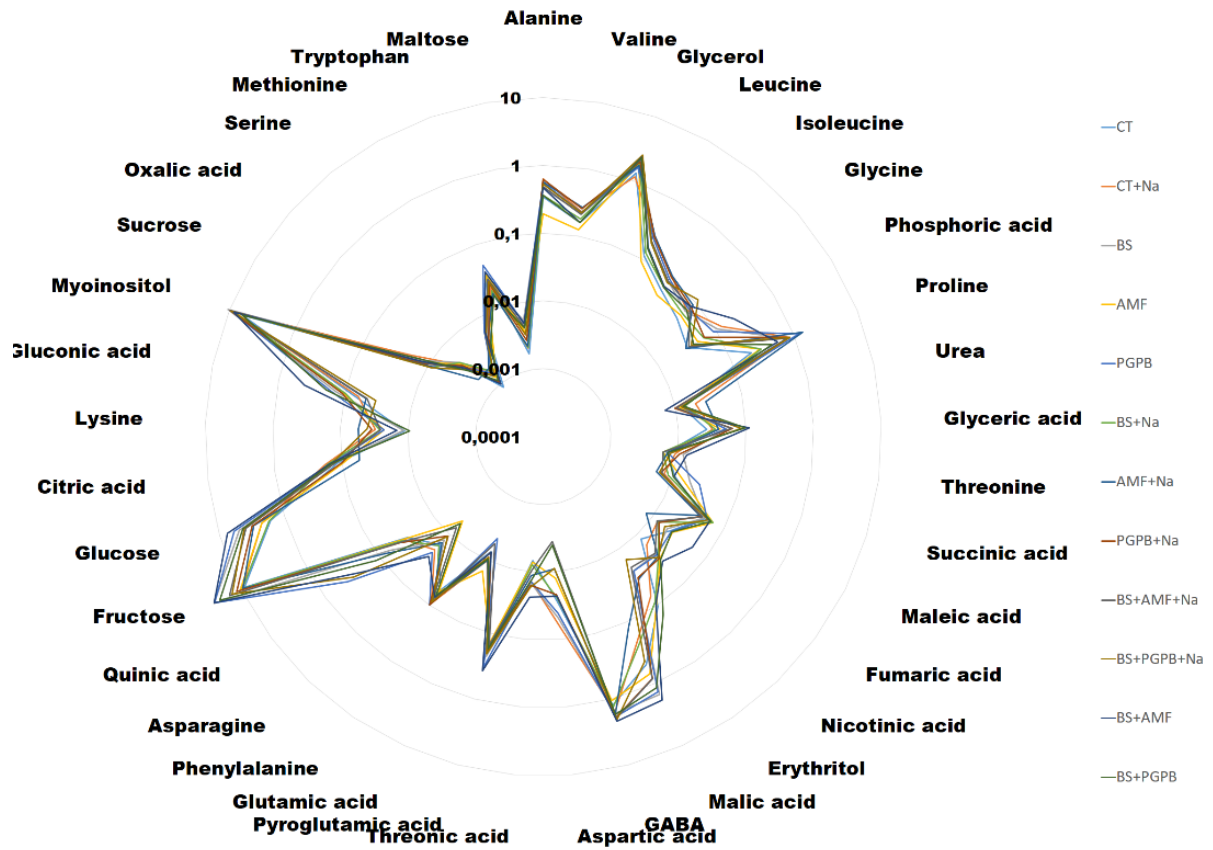


Figura 7. Diagrama radial del contenido metabólico en valores absolutos en hoja para ambas condiciones (condiciones normales y estrés salino) y todos los tratamientos realizados. Los diferentes colores representan los diferentes tratamientos tanto en una situación con y sin estrés y el eje se encuentra en escala logarítmica en base 10 CT (control sin estrés); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal); BS+AMF (combinación de bioestimulante con hongo micorrícico arbuscular); BS+PGPB (combinación de bioestimulante con Bacteria promotora del crecimiento vegetal).

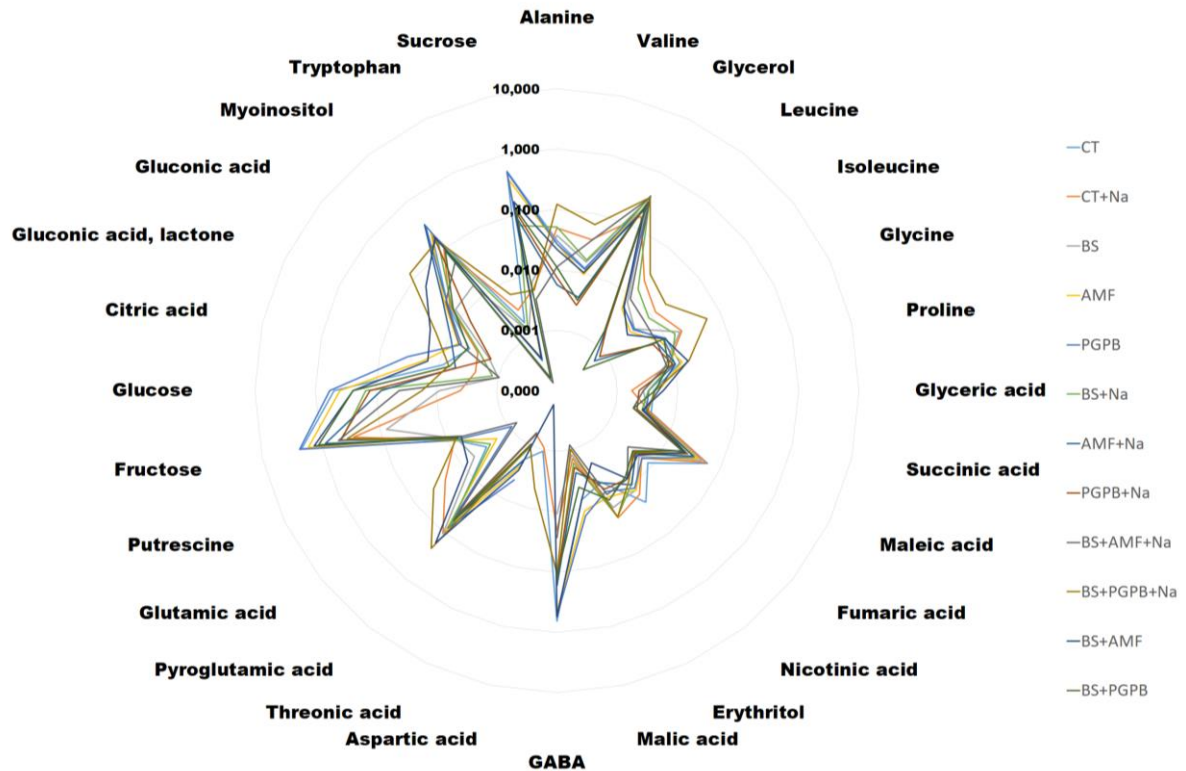


Figura 8. Diagrama radial del contenido metabólico en valores absolutos en raíz para ambas condiciones (condiciones normales y estrés salino) y todos los tratamientos. Los diferentes colores representan los diferentes tratamientos tanto en una situación con y sin estrés y el eje se encuentra en escala logarítmica en base 10. CT (control sin estrés); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal); BS+AMF (combinación de bioestimulante con hongo micorrícico arbuscular); BS+PGPB (combinación de bioestimulante con Bacteria promotora del crecimiento vegetal).

El mapa de calor o “*heatmap*” es un análisis de correlación que permitió identificar las diferencias y semejanzas entre las diferentes replicas biológicas en todos los tratamientos y en ambas condiciones mediante agrupación jerárquica. Para su construcción se emplearon los 20 metabolitos primarios más destacados y los valores absolutos registrados se promediaron y normalizaron. En hoja (Figura 9) se apreció un agrupamiento según los patrones de respuesta metabólica en un mismo clúster de aquellos tratamientos con AMF o PGPB bajo condiciones de estrés salino (Figura 9 a,b). No solo se observó en los tratamientos con microorganismos inoculados individualmente sino también en combinación con bioestimulante. Además, se observó que los perfiles del tratamiento BS, principalmente, en condiciones normales (Figura 9 a,c) y con estrés presentaban un patrón de respuesta muy diferente al resto de tratamiento. Por otro lado, en raíz (Figura 10) se observaron dos clústeres muy diferenciados. El primero de ellos englobaba a aquellos tratamientos, en condiciones no estresantes, con microorganismos, tanto PGPB como AMF y su combinación con BS

así como con su propio control en el “*heatmap*” global (Figura 10 a). Asimismo, el segundo clúster, en condiciones de estrés salino (Figura 10 a,b) se agruparon los tratamientos con PGPB, AMF y su combinación con BS así como con el BS solo. Además, hay que destacar que el BS en condiciones normales tanto en raíz como en hoja presentó un patrón de respuesta metabólica diferente al resto de tratamientos.

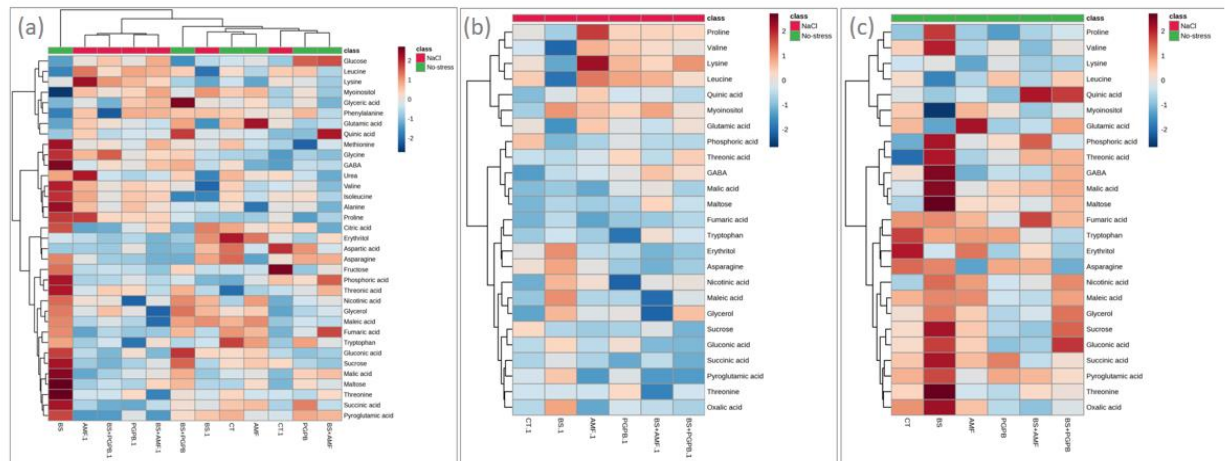


Figura 9. Análisis de agrupación jerárquica con mapa de calor (*Heatmap*) de los patrones de respuesta metabólica de hoja de tomate a diferentes tratamientos con bioestimulante y bajo condiciones normales (verde) y de estrés abiótico (rojo) construido a partir de valores absolutos de metabolitos primarios. Las diferentes escalas de color representan el nivel relativo de los metabolitos siendo la coloración rojiza una acumulación ascendente y la coloración azulada una acumulación descendente. *Fold Change*: 1,5 y t-test: 0,5 raw.

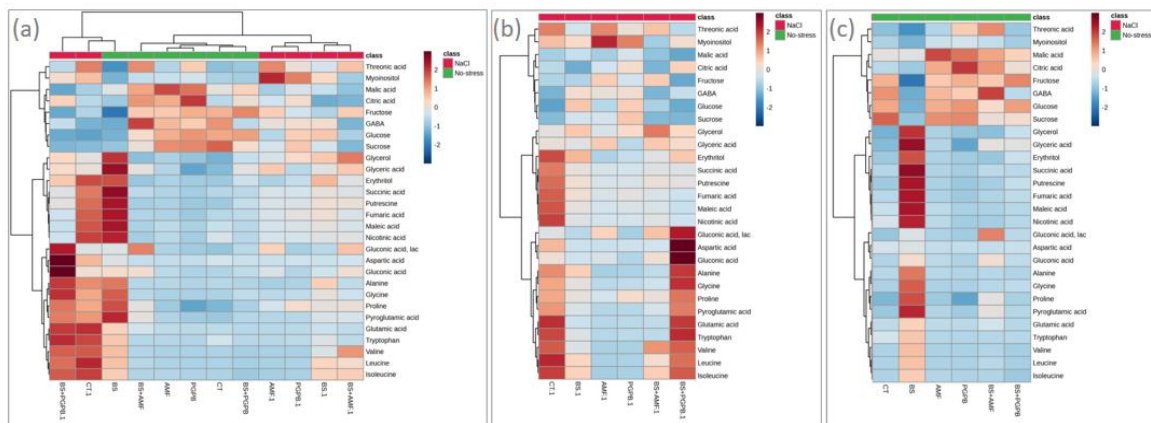


Figura 10. Análisis de agrupación jerárquica con mapa de calor (*Heatmap*) de los patrones de respuesta metabólica de raíz de tomate a diferentes tratamientos con bioestimulante y bajo condiciones normales (verde) y de estrés abiótico (rojo) construido a partir de valores absolutos de metabolitos primarios. Las diferentes escalas de color representan el nivel relativo de los metabolitos siendo la coloración rojiza una acumulación ascendente y la coloración azulada una acumulación descendente. *Fold Change*: 1,5 y t-test: 0,5 raw.

Para conocer qué metabolitos se encontraron diferencialmente acumulados de forma significativa se realizó un “*Volcano plot*” con un umbral de “*Fold Change (FCH)*” $\geq 1,5$ y un *p-value* $\leq 0,05$. A partir de este análisis se obtuvieron metabolitos sobrecumulados ($FCH \geq 1,5$ y *p-value* $\leq 0,05$)- y subacumulados ($FCH \leq 0,6$ y *p-value* $\leq 0,05$). Los datos

obtenidos se mostraron en la Tabla 3. Además, la información sobre de los metabolitos diferencialmente acumulados se encuentra en el ANEXO I Tabla 1-4. Los tratamientos que mostraron más metabolitos diferencialmente acumulados en condiciones normales en hoja fueron: BS+PGPB con 5 metabolitos sobreacumulados y BS+AMF con 2 sobreacumulados y 4 subacumulados. En condiciones de salinidad en hoja destacaron el tratamiento inoculado con PGPB al presentar 8 metabolitos sobreacumulados y 3 subacumulados, y su combinación con BS (BS+PGPB) con 3 sobreacumulados y 4 subacumulados. En raíz se observaron 12 metabolitos sobreacumulados y 3 subacumulados en BS, y 7 sobreacumulados en BS+AMF en condiciones normales. En salinidad el tratamiento BS+PGPB presentó 2 metabolitos subacumulados y el tratamiento AMF un metabolito sobreacumulado y uno subacumulado. Destacar que los tratamientos con mayor número de metabolitos significativamente diferencialmente acumulados son los inoculados con materias vivas.

Tabla 3. Metabolitos primarios sobreacumulados y subacumulados para cada tratamiento en hoja y raíz comparados con su control. Fold Change $\geq 1,5$ y t-test $\leq 0,05$ raw.

		HOJA		RAIZ	
		Sobreacumulado	Subacumulado	Sobreacumulado	Subacumulado
SIN ESTRÉS	BS	1	0	12	3
	AMF	1	2	2	0
	PGPB	1	3	0	0
	BS+AMF	2	4	7	0
	BS+PGPB	5	0	1	3
ESTRÉS SALINO (NaCl)	BS	0	0	0	1
	AMF	0	1	1	1
	PGPB	8	1	0	1
	BS+AMF	1	1	0	0
	B+PGPB	3	4	0	2

Por último, se realizaron diagramas de Venn con los metabolitos significativamente diferencialmente acumulados mediante el programa “InteractiveVenn” tanto de hoja como de raíz para identificar compuestos comunes en todos los tratamientos en estrés salino y en condiciones normales en un umbral de *Fold Change* $\geq 1,5$ y p-valor $\leq 0,05$. En muestras de hoja sin estrés, (Figura 11 a, Anexo 1 Tabla 5) se pudo observar que la fructosa se encontraba presente en los tratamientos BS+AMF, AMF y PGPB y la glucosa en BS+AMF, BS y PGPB. Además, se pudo apreciar que el triptófano y el ácido glicérico en encontraban en los tratamientos BS+AMF y BS+PGPB, el ácido oxálico y el ácido glutámico en BS+AMF y PGPB, y en BS+AMF y AMF destacaron la alanina y el ácido nicotínico. Por otro lado, en las muestras de hoja con estrés (Figura 11 b, Anexo 1 Tabla 6) se pudo observar que el glicerol y el ácido fosfórico se encontraban en los tratamientos BS+AMF, PGPB y BS+PGPB, y el ácido cítrico en AMF, PGPB y

BS+PGPB. Además, en PGPB se encontraba ácido nicotínico y al inocular PGPB o BS+PGPB se observaron los siguientes metabolitos: alanina, fructosa, ácido glutámico, ácido oxálico, urea, ácido glicérico, triptófano, ácido quínico, ácido málico, ácido glucónico, ácido fumárico, GABA.

En muestras de raíz sin estrés (Figura 12 a, Anexo I Tabla 7) se pudo observar que el ácido glucónico se encontraba presente en los tratamientos BS+AMF, BS y BS+PGPB, y el ácido glicérico en BS+AMF, BS y AMF. Además, se pudo apreciar que el GABA y la sacarosa estaban significativamente diferencialmente acumulados en los tratamientos BS y BS+PGPB, el ácido cítrico en BS+AMF y AMF, y en BS+AMF y BS se localizó el glicerol. El triptófano se apreció en tratamiento con PGPB y el ácido treónico y el ácido glutámico en la combinación BS+AMF. En muestras de raíz con estrés (Figura 12 b, Anexo 1 Tabla 8) destacó el ácido nicotínico que estuvo presente en cuatro tratamientos: AMF, PGPB, BS+AMF y BS+PGPB. Además, la sacarosa se observó en AMF, el ácido málico en BS+PGPB y el ácido glucónico en BS.

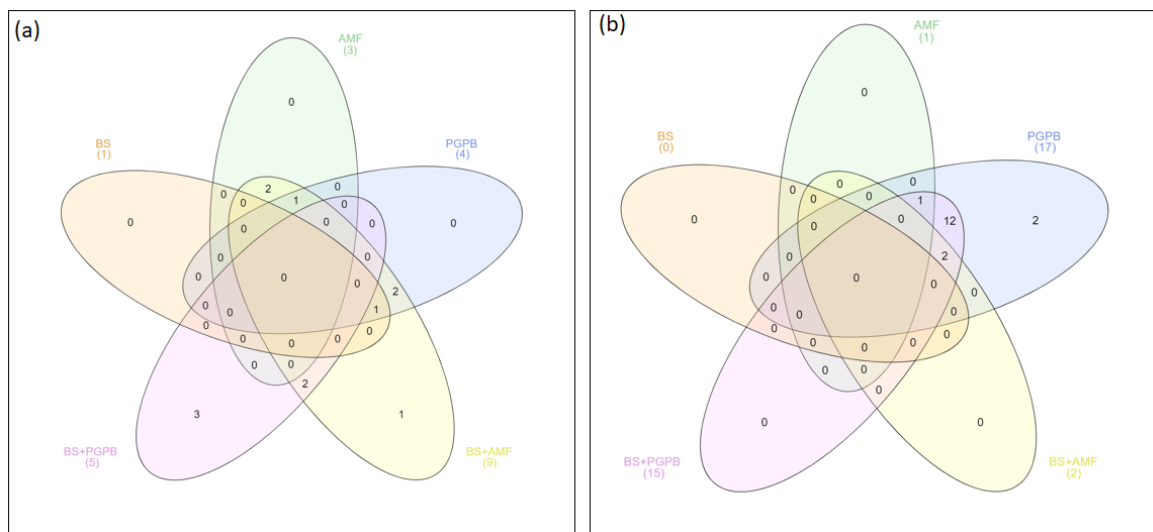


Figura 11. Diagrama de Venn de los metabolitos significativamente diferencialmente acumulados comunes entre tratamientos en hoja condiciones normales (a) y bajo estrés salino (b). *Fold Change* $\geq 1,5$ y *p*-valor $\leq 0,05$. BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal).

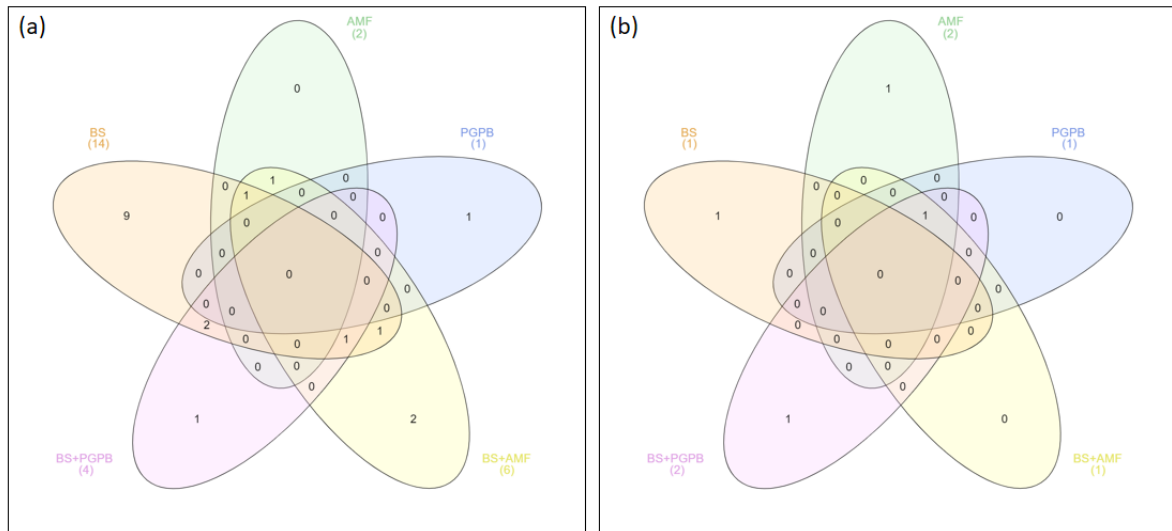


Figura 12. Diagrama de Venn de los metabolitos significativamente diferencialmente acumulados comunes entre tratamientos en raíz condiciones normales (a) y bajo estrés salino (b). $Fold\ Change \geq 1,5$ y $p\text{-valor} \leq 0,05$. BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal).

6.2. Hormonas.

Se llevó a cabo un análisis hormonal para determinar la respuesta de las diferentes fitohormonas en *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom frente a diferentes tratamientos con bioestimulantes bajo condiciones sin estrés y de estrés salino. Se analizaron dos tejidos de la planta: hojas jóvenes y raíces secundarias. En total, se analizaron las poliaminas (PA), que pueden actuar como fitohormonas, y 13 hormonas vegetales: El ácido indol-3-acético (IAA), una auxina; el jasmonoil-L-isoleucina (JA-ile), el ácido 12-oxofitodienoico (OPDA) y el ácido jasmónico (JA) todos ellos jasmonatos; el ácido abscísico (ABA), el ácido salicílico (SA), el isopenteniladenosina (IPR) que son citoquininas, y seis giberelinas: GA1, GA3, GA20, GA4, GA7 y GA19. Los datos se normalizaron por suma y escalado mediante Pareto (centrada en la media y dividida por la raíz cuadrada de la desviación estándar de cada variable).

Al igual que en el análisis metabolómico, se realizó un análisis de componentes principales PCA y, seguidamente, se construyó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales PLS-DA. Finalmente, se seleccionaron los PLS-DA al ser un método supervisado con mayor rigurosidad y fiabilidad. La visualización de los PLS-DA en hoja y en raíz se realizó comparando los diferentes tratamientos con su control en las diferentes condiciones ensayadas (condiciones normales y estrés salino). En el caso de las muestras extraídas de hoja, se pudo determinar que, en la condición sin estrés

(Figura 13 a-e), las réplicas biológicas de cada tratamiento (violeta) con su control (verde) se encontraban ligeramente agrupadas, pero sin superponerse las muestras inoculadas con los tratamientos y el control. Asimismo, en la Figura 14 (a-e), muestra de hoja en condiciones estresantes, se apreció una situación similar que, en condiciones normales, las réplicas biológicas con tratamiento y las réplicas control presentaron una cierta proximidad entre ellas.

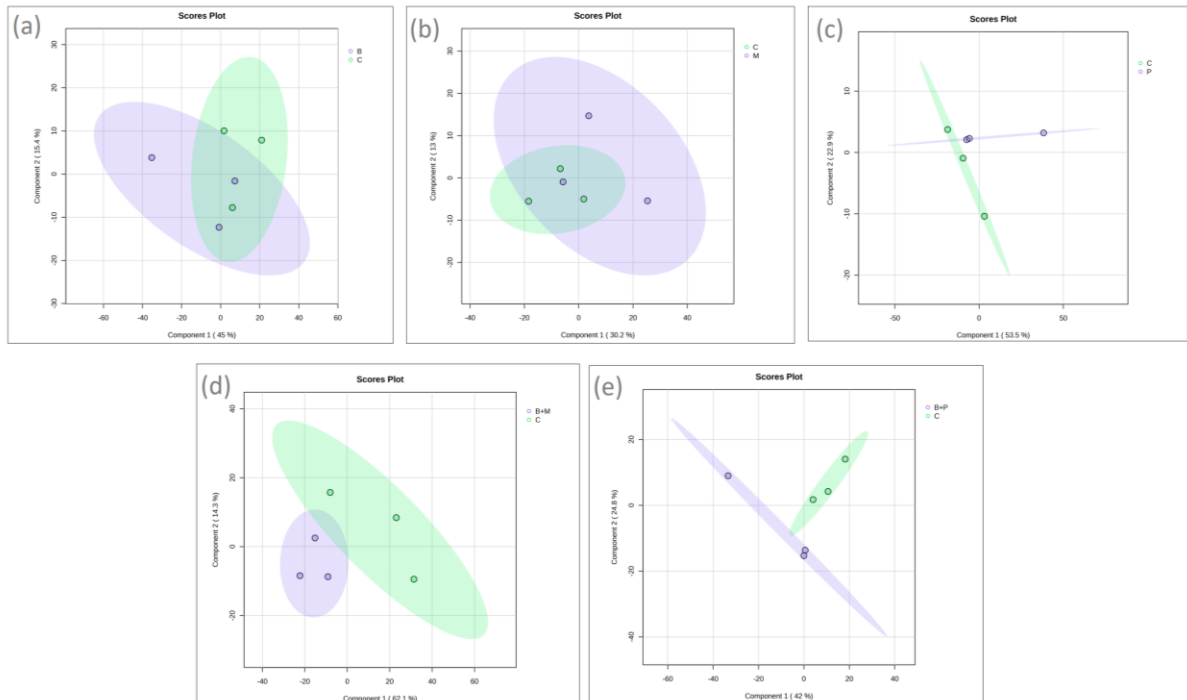


Figura 13. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales PLS-DA de muestras de hoja en condiciones sin estrés donde se compararon el tratamiento (violeta) con el control (verde). a) CT vs BS, (b) CT vs AMF, (c) CT vs PGPB, (d) CT vs BS+AMF, (e) CT vs BS+PGPB. La varianza en el componente Y es mayor del 15 % a excepción del gráfico (b) y (d) que es del 13 y 14,3 % respectivamente. En el componente X la varianza es mayor del 40 % a excepción del gráfico (b) que es del 30,2 %. CT (control sin estrés); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrízico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal).

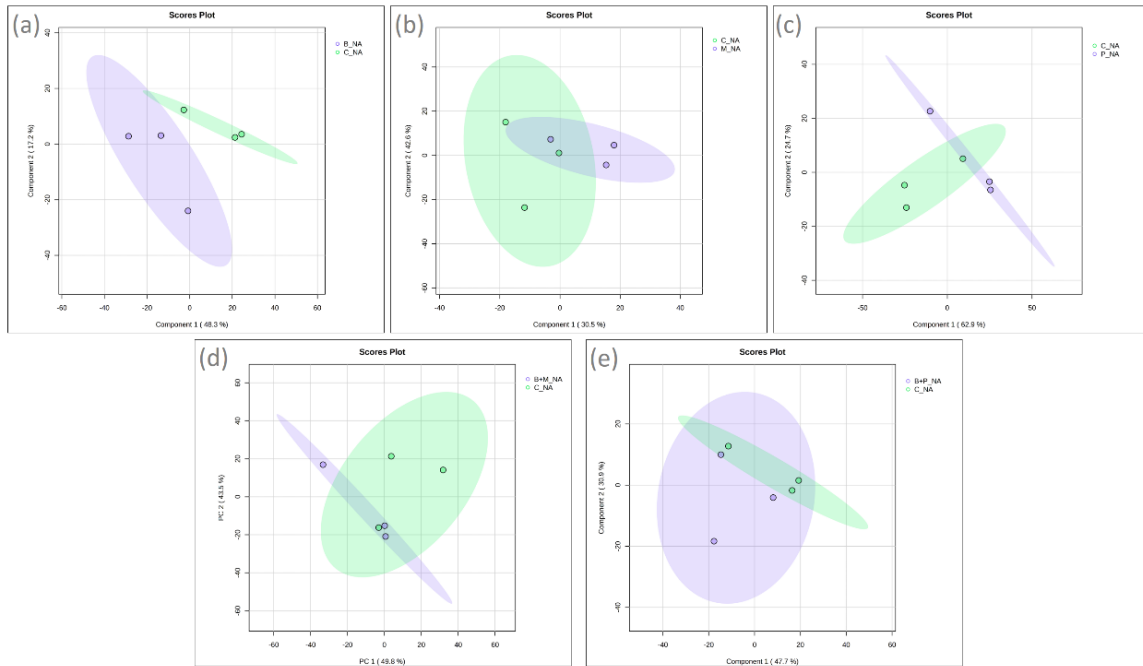


Figura 14. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales PLS-DA de muestras de hoja en condiciones de estrés donde se compararon el tratamiento (violeta) con el control (verde). (a) NaCl vs BS, (b) NaCl vs AMF, (c) NaCl vs PGPB, (d) NaCl vs BS+AMF, (e) NaCl vs BS+PGPB. La varianza en el componente Y es mayor del 24,7 % a excepción del gráfico (a) que es del 17,2 % y en el componente X es mayor del 48,3 % a excepción del gráfico (b) que es del 30,5 %. NaCl (control con estrés salino); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal).

En las muestras extraídas de raíz se pudo determinar que en la situación sin estrés (Figura 15 a-e) todas las réplicas biológicas en la situación control se encontraban diferenciadas con las réplicas biológicas del tratamiento, pero presentaban una distribución espacial menor al acercarse entre ellas. Por otro lado, en la Figura 16 (a-e), muestra de hojas en condiciones estresantes, se apreció una diferenciación entre las réplicas biológicas con el control. Sin embargo, en la Figura 16 (d,e), se observó una aproximación entre las réplicas del control y el tratamiento.

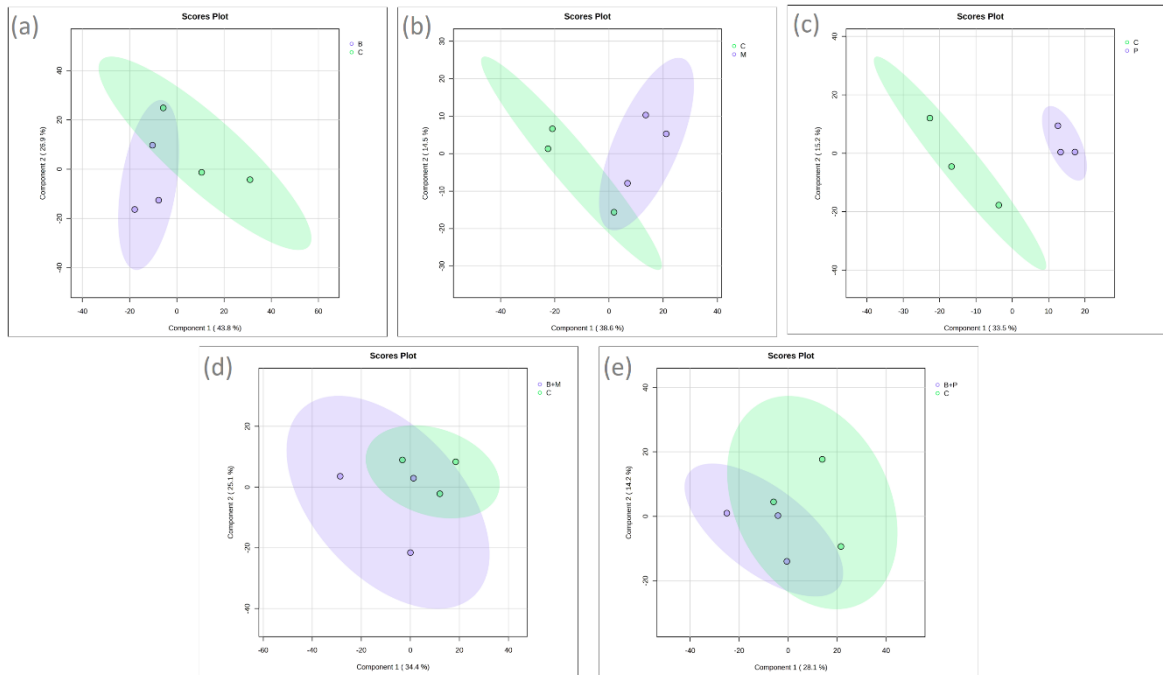


Figura 15. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales PLS-DA de muestras de raíz en condiciones sin estrés donde se compararon el tratamiento (violeta) con el control (verde). (a) CT vs BS, (b) CT vs AMF, (c) CT vs PGPB, (d) CT vs BS+AMF, (e) CT vs BS+PGPB. La varianza en el componente Y es mayor del 14,0 % y en el componente X mayor del 33,4 % a excepción del gráfico (e) que es del 28,1 %. CT (control sin estrés); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal).

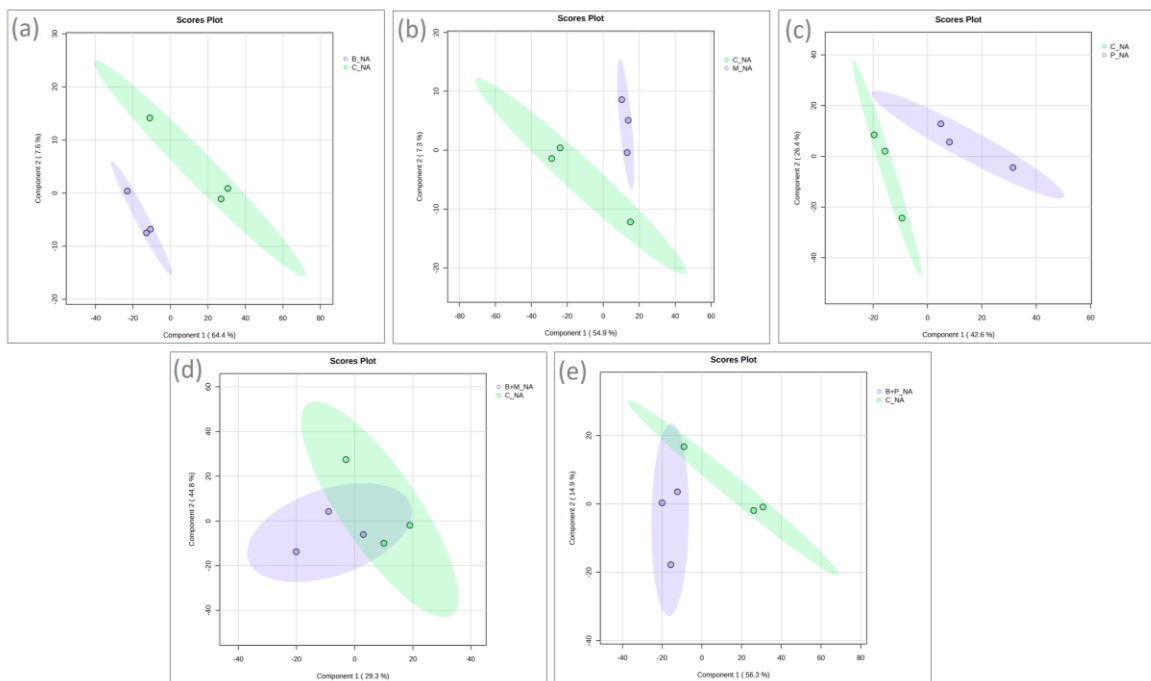


Figura 16. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales PLS-DA de muestras de raíz en condiciones de estrés donde se compararon el tratamiento (violeta) con el control (verde). (a) NaCl vs BS, (b) NaCl vs AMF, (c) NaCl vs PGPB, (d) NaCl vs BS+AMF, (e) NaCl vs BS+PGPB. La varianza en el componente Y es mayor del 26,4 % a excepción del gráfico (a) y (b) que es del 7,6 y 7,3 % respectivamente. En el componente X la varianza es mayor del 42,6 % a excepción del gráfico (d) que es del 29,3 %. NaCl (control con estrés salino); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal).

Para determinar el contenido hormonal general de hoja y raíz en todos los tratamientos realizados bajo las dos condiciones ensayadas se realizó un diagrama radial. En hoja (Figura 17) se observó una respuesta común en todos los tratamientos, viéndose una acumulación de concentración en el caso de ABA, PA y SA y, en menor medida, JA, JA_ile, OPDA e IAA. Además de una disminución de concentración en el caso de IPR. Por otro lado, en las raíces (Figura 18), se observó un comportamiento similar respecto a las hormonas que han presentado una mayor acumulación de metabolitos pero variando la concentración. Destacó indudablemente ABA, PA y SA y, en menor medida, JA, JA_ile, OPDA e IAA. Asimismo, se observó una disminución de la concentración de las giberelinas, principalmente de GA20, GA4 y GA7 y una disminución brusca del IPR.

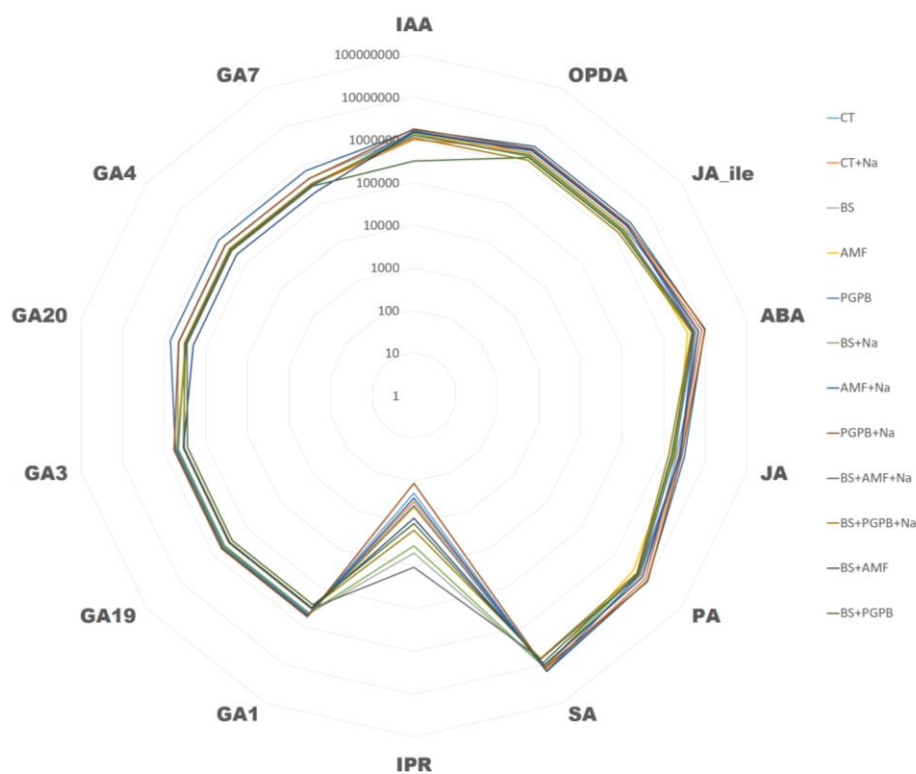


Figura 17. Diagrama radial del contenido metabólico en valores absolutos en hoja para ambas condiciones (normales y estrés abiótico) y todos los tratamientos. Los diferentes colores representan los diferentes tratamientos tanto en una situación con y sin estrés y el eje se encuentra en escala logarítmica en base 10. CT (control sin estrés); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrízico arbuscular); PGPB (Bacteria promotora del crecimiento vegetal); BS+AMF (combinación de bioestimulante con hongo micorrízico arbuscular); BS+PGPB (combinación de bioestimulante con Bacteria promotora del crecimiento vegetal).

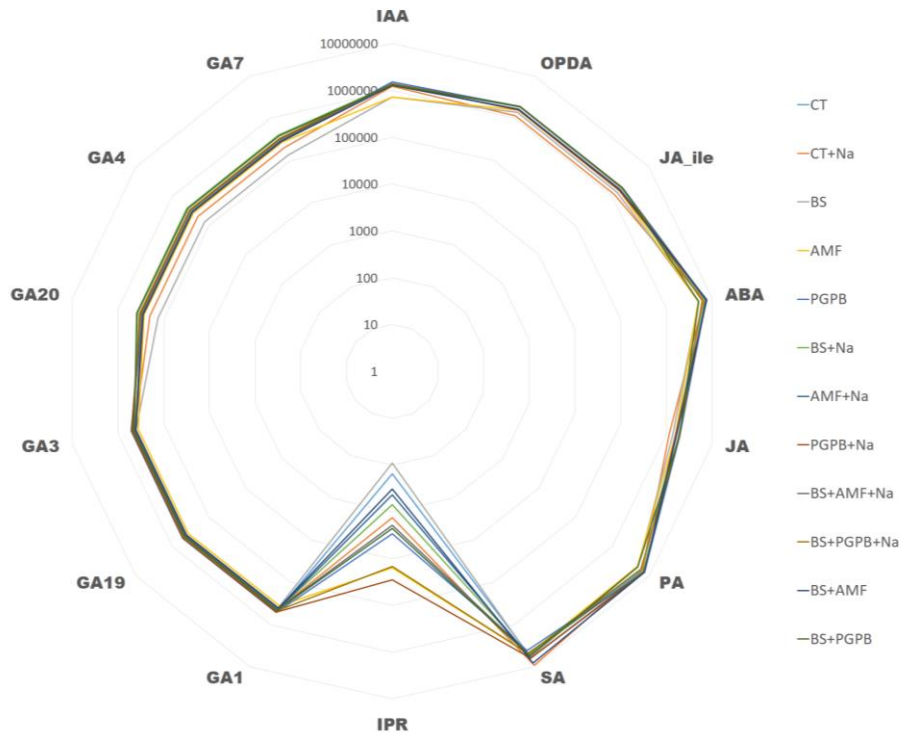


Figura 18. Diagrama radial del contenido metabólico en valores absolutos en raíz para ambas condiciones (normales y estrés abiótico) y todos los tratamientos. Los diferentes colores representan los diferentes tratamientos tanto en una situación con y sin estrés y el eje se encuentra en escala logarítmica en base 10. CT (control sin estrés); BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal); BS+AMF (combinación de bioestimulante con hongo micorrícico arbuscular); BS+PGPB (combinación de bioestimulante con Bacteria promotora del crecimiento vegetal).

Con el fin de conocer la concentración de hormonas presente en cada tratamiento en las condiciones sin estrés y con estrés salino se realizó un gráfico de barras enfrentando la concentración de hormonas en las muestras tratadas con respecto al control. De manera global tanto en hoja (Figura 19) como en raíz (Figura 21), se observó un comportamiento similar en la concentración hormonal en los diferentes tratamientos en el caso de las hormonas OPDA, JA-ile y JA (Figura 19 b,d,e) (Figura 21 b,d,e), y por otro lado también se observó un perfil de concentraciones similares en el caso de ABA y PA (Figura 19 c,f) (Figura 20 c,f). En hoja (Figura 19), también se observó que las concentraciones de las hormonas IAA, ABA, JA y PA era mayor en AMF y PGPB con respecto al resto de tratamientos bajo estrés salino (Figura 19 a,c,e,f), pues en la mayoría del resto de tratamientos presentaban menor concentración que el control. Más en detalle en hoja (Figura 19) que en la hormona IAA (Figura 19 a) incrementó su concentración al inocularse tratamientos PGPB y AMF en salinidad y descendió con la combinación BS+PGPB en condiciones sin estrés. La hormona OPDA (Figura 19 b) aumentó su concentración con BS y PGPB en condiciones normales y en AMF en condiciones con estrés. Por otro lado, su concentración disminuyó con la combinación

BS+PGPB en condiciones sin estrés y con los tratamientos BS y BS+PGPB en presencia de salinidad. La hormona ABA (Figura 19 c) incrementó su concentración en ambientes sin estrés en presencia de AMS y con estrés ante PGPB. Sin embargo, la disminuyó al inocular AMF, BS+PGPB en condiciones normales y BS y BS+PGPB en condiciones de salinidad. La hormona JA-ile (Figura 19 d) incrementó en situaciones sin estrés ante BS y PGPB y en situaciones estresantes ante AMS. No obstante, su concentración descendió frente el tratamiento BS+PGPB en condiciones normales y frente a los tratamientos BS y BS+PGPB en condiciones estresantes. La hormona JA (Figura 19 e) incrementó su concentración ante BS y PGPB en condiciones sin estrés y ante AMF en condiciones de salinidad. Por otro lado, esta disminuyó cuando no hubo estrés con los tratamientos BS+PGPB y BS en el caso de BS+PGPB cuando hay estrés. La hormona PA (Figura 19 f) solamente incrementó su concentración frente AMF y PGPB en condiciones estresantes y la descendió frente AMF y BS+PGPB en situaciones sin estrés; y BS, BS+PGPB en situaciones con estrés. La hormona SA (Figura 19 g) aumentó su concentración ligeramente con el tratamiento PGPB en condiciones normales y con AMF en condiciones de salinidad. Sin embargo, en ambas condiciones disminuyó su concentración frente a los tratamientos BS+PGPB y BS+PGPB. La hormona IPR (Figura 19 h) incrementó su concentración en situaciones sin estrés con BS y en situaciones con estrés con BS+AMF y no disminuyó con ningún tratamiento. En hoja también se observó la variación de concentración de las diferentes giberelinas (Figura 20). En condiciones sin estrés no incrementó ningún, pero en presencia de salinidad frente al tratamiento AMF y PGPB las hormonas GA20, GA4 y GA7 aumentaron. Aun así, su concentración disminuyó en GA20, GA4 y GA7 con BS+AMF y en GA1, GA19 y GA3 en BS+PGPB en condiciones normales. En presencia de salinidad, la concentración de GA1, GA19 y GA3 disminuyó en BS+PGPB y BS+ AMF.

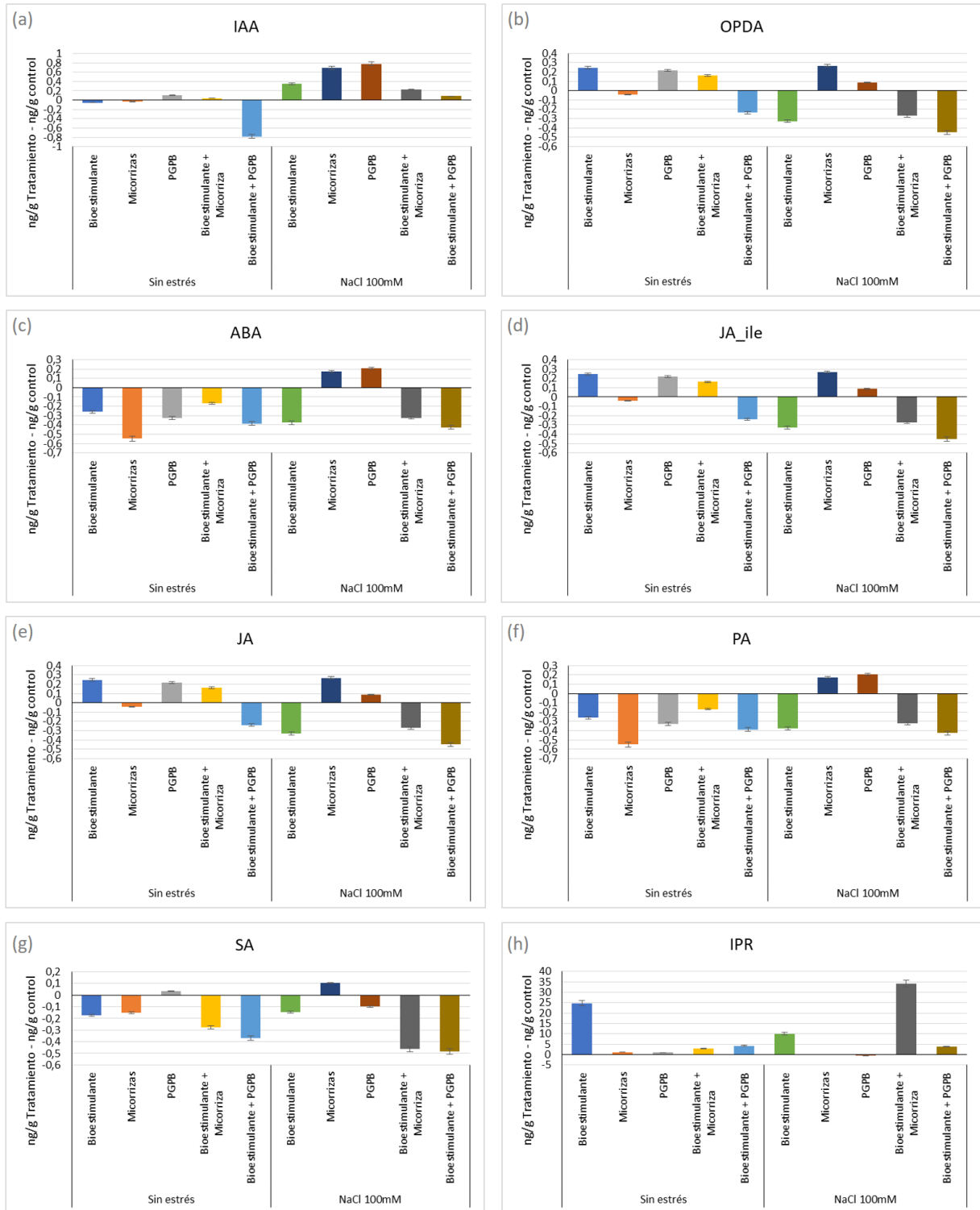


Figura 19. Fitohormonas presentes en hoja en condiciones sin estrés y con estrés. En el eje X se tienen los tratamientos y en el eje Y se representa la diferencia de concentración de la hormona del tratamiento con respecto al control en ng/g. (a) IAA, (b) OPDA, (c) ABA, (d) JA-ile, (e) JA, (f) PA, (g) SA, (h) IPR.

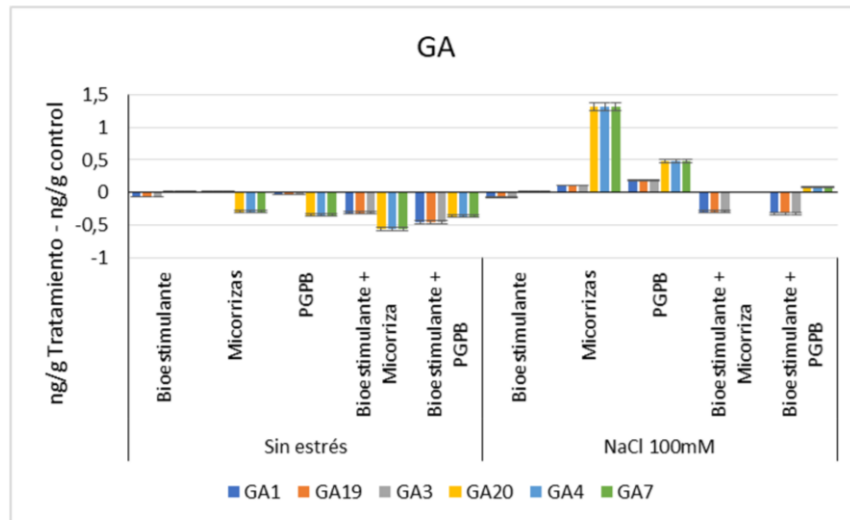


Figura 20. Composición de las giberelinas presentes en hoja en condiciones sin estrés y con estrés. En el eje X se tienen los tratamientos y en el eje Y se representa la diferencia de concentración de la hormona del tratamiento con respecto al control en ng/g. Giberelinas: GA1 (azul oscuro), GA19 (rojo), GA3 (gris), GA20 (amarillo), GA4 (azul claro), GA7 (verde).

En general, en raíz en condiciones de estrés, se observó una concentración mayor de IAA, JA, ABA y PA (Figura 21 a,c,e,f) en los todos tratamientos con respecto al control, a excepción de BS+PGPB en PA y ABA (Figura 21 e,f) que presentó una concentración más baja que el control. Por el contrario, la concentración SA (Figura 21 g) en los diferentes tratamientos realizados fue menor que el control en condiciones de estrés. En más detalle (Figura 21), se observó que en la hormona IAA (Figura 21 a) incrementaba su concentración al inocularse tratamientos PGPB en situaciones sin estrés y AMF, BS+ AMF en situaciones con salinidad. A su vez, descendió con BS y AMF en condiciones sin estrés. La hormona OPDA (Figura 21 b) aumentó su concentración con PGPB y BS+PGPB en condiciones normales y en todos los tratamientos a excepción de PGPB en condiciones con estrés. Por otro lado, su concentración disminuyó con BS en condiciones sin estrés. La hormona ABA (Figura 21 c) incrementó su concentración en ambientes sin estrés en presencia de PGPB y BS+AMF y con estrés ante PGPB y BS+ AMF. Sin embargo, la disminuyó al inocular BS, AMF y BS+PGPB en condiciones normales y BS+PGPB en condiciones de salinidad. La hormona JA-ile (Figura 21 d) incrementó en situaciones sin estrés ante PGPB y BS+PGPB, y en situaciones estresantes ante AMS principalmente y BS, BS+PGPB y BS+AMF. No obstante, su concentración descendió frente el tratamiento BS en condiciones normales. La hormona JA (Figura 21 e) incrementó su concentración ante PGPB y BS+PGPB en condiciones sin estrés y ante BS, AMF, BS+PGPB y BS+AMF en condiciones de salinidad. Por otro lado, esta hormona disminuyó en el

tratamiento BS cuando no hubo estrés. La hormona PA (Figura 21 f) incrementó su concentración frente BS+AMF y PGPB en condiciones sin estrés y PGPB y BS+AMF en condiciones estresantes. Esta descendió frente AMF, BS y BS+PGPB en situaciones sin estrés y BS+PGPB en situaciones con estrés. La hormona SA (Figura 21 g) solamente aumentó su concentración con el tratamiento BS+AMF en condiciones normales. Sin embargo, disminuyó su concentración frente al tratamiento PGPB en condiciones sin estrés y BS, BS+PGPB y BS+AMF en salinidad. La hormona IPR (Figura 21 h) incrementó su concentración en situaciones sin estrés con AMF y en situaciones con estrés con PGPB y disminuyó ligeramente con BS en condiciones normales y BS y AMF con salinidad. En raíz también se observó la variación de concentración de las diferentes giberelinas (Figura 22). En condiciones sin estrés incrementaron ligeramente, con el tratamiento PGPB, GA1, GA19 y GA3 y con el tratamiento BS+PGPB GA20, GA4 y GA7. En presencia de salinidad frente a todos los tratamientos, BS, AMF, PGPB, BS+AMF y BS+PGPB, las hormonas GA20, GA4 y GA7 aumentaron. Aun así, su concentración disminuyó en GA20, GA4 y GA7 con BS y en GA1, GA19 y GA3 en AMF en condiciones normales. En presencia de salinidad, la concentración de GA1, GA19 y GA3 disminuyó ligeramente en BS y BS+AMS.

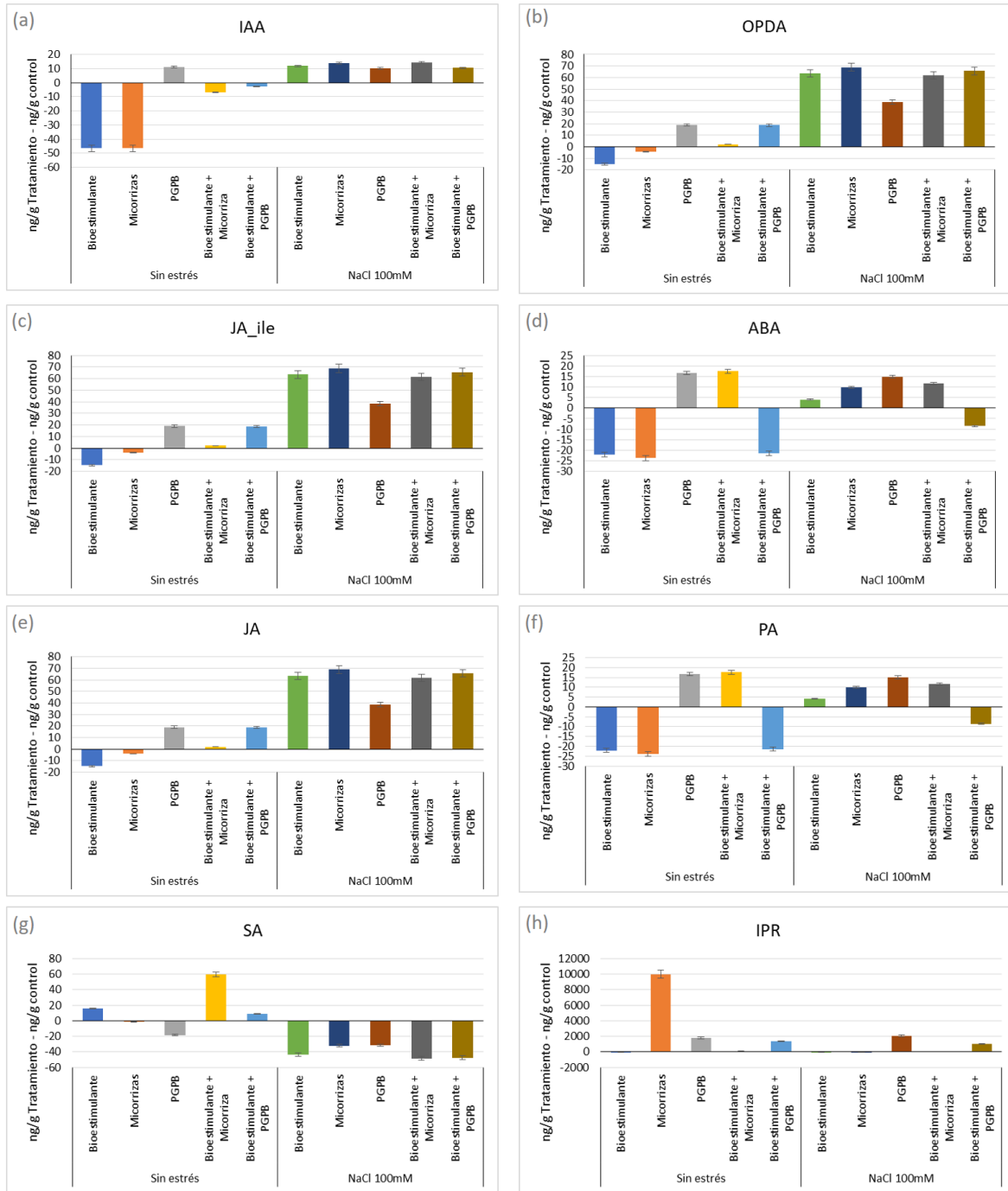


Figura 21. Fitohormonas presentes en hoja en condiciones sin estrés y con estrés. En el eje X se tienen los tratamientos y en el eje Y se representa la diferencia de concentración de la hormona del tratamiento con respecto al control en ng/g. (a) IAA, (b) OPDA, (c) ABA, (d) JA-ile, (e) JA, (f) PA, (g) SA, (h) IPR.

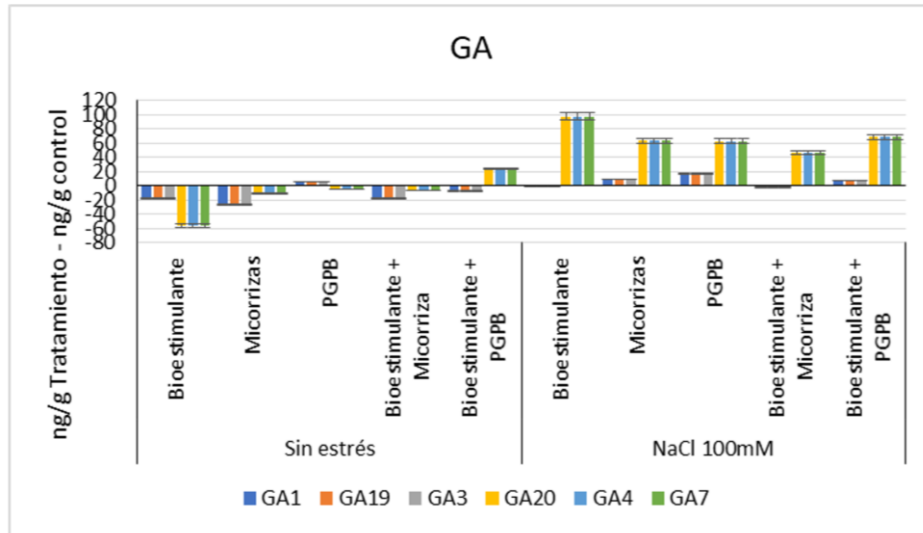


Figura 22. Composición de las giberelinas presentes en raíz en condiciones sin estrés y con estrés. En el eje X se tienen los tratamientos y en el eje Y se representa la diferencia de concentración de la hormona del tratamiento con respecto al control en ng/g. Giberelinas: GA1 (azul oscuro), GA19 (rojo), GA3 (gris), GA20 (amarillo), GA4 (azul claro), GA7 (verde).

7. DISCUSIÓN

El presente estudio compara dos situaciones, una condición sin estrés y otra en la que se aplicó estrés abiótico por salinidad, en los cuales se realizó diferentes tratamientos al inocular un combinado de bioestimulantes, a partir de extractos naturales, junto con materias vivas, como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) o hongos micorrízicos arbusculares (AMF), con el objetivo de observar una posible sinergia entre estos compuestos. En investigaciones anteriores se ha demostrado que la utilización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), como bioestimulante microbiano, potencia el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Poupin et al., 2013; Prasad et al., 2019), además de generar tolerancia frente a múltiples estreses abióticos (V. Meena et al., 2015; V. S. Meena et al., 2014) e incrementar la calidad de esquejes (Ferreira et al., 2022). El empleo de hongos micorrízicos arbusculares (AMF) como bioestimulante también mejora la productividad y la tolerancia al estrés abiótico (Rouphael et al., 2015) en diferentes cultivos de campo como el tomate, los pimientos verdes y las berenjenas (Ortas, 2019). También aumenta la disponibilidad y absorción de nutrientes y modifica el equilibrio de fitohormonas (Rouphael et al., 2015; Saia et al., 2020). También se han descrito experimentos donde se han combinado un extracto natural comercial con PGPB o AMF donde se observa un incremento de la productividad del cultivo (Gupta et al., 2021; Rouphael et al., 2015; Saia et al., 2020). Aunque la variedad de estudios realizados donde se emplean PGPB o AMF potenciadores del desarrollo vegetales elevado y este tipo de microorganismos son cada vez más demandados comercialmente, las investigaciones donde se combinan bioestimulantes a partir de extractos naturales junto con microorganismos son muy escasos. Es por ello que el presente trabajo tiene un gran carácter novedoso e innovador y un gran potencial comercial. Al realizar el análisis metabólico general se observa una acumulación de metabolitos comunes tanto en hoja como en raíz, entre ellos destacaron el ácido gamma-aminobutírico (GABA), la prolina y el ácido aspártico. Estos aminoácidos se activan frente a modificaciones ambientales y aumentan su concentración en la célula del tejido vegetal (Barnett & Naylor, 1966; Mei et al., 2016). El GABA, no solo mejora la tolerancia de la planta contra la salinidad, sino también frente a la temperatura, el déficit de agua o la falta de luz (Nayyar et al., 2014; Priya et al., 2019). Asimismo, la utilización del GABA de forma exógena incrementa la concentración endógena y mejora la respuesta de la planta frente al estrés osmótico en *Piper nigrum* (Vijayakumari & Puthur, 2015), el estrés por congelación en *Triticum aestivum* (Malekzadeh et al., 2014), el estrés por sequía en *Lolium perenne* (Cheng et al., 2018; Merewitz & Krishnan, 2014) o el estrés por salinidad en *Caragana intermedia* (Shi et al., 2010) o maíz (Tian et al.,

2005). Además, este aminoácido modula la vía de poliaminas y aumenta los niveles de antioxidantes y de osmolitos (Bandehagh & Taylor, 2020; Li et al., 2021). Los osmolitos son moléculas como aminoácidos, azúcares y aminos que se acumulan en presencia de estrés, previenen la toxicidad y actúan como osmoprotector (Annunziata et al., 2017; Khan et al., 2018). Uno de los más destacables en condiciones de salinidad es la prolina (Carillo et al., 2008) que también aplicada de forma exógena puede incrementar la tolerancia (Butt et al., 2016; Orsini et al., 2018; Priya et al., 2019) y que también presenta actividad defensiva frente a los antioxidantes, estabiliza proteínas, quela metales e inhibe la muerte programada (Adejumo et al., 2021; Dar et al., 2016). Por otra parte, el ácido aspártico, al igual que los metabolitos mencionados, se incrementa en presencia de salinidad o al inocular sustancias como el ácido salicílico o el ácido jasmónico (Farhangi-Abriz & Ghassemi-Golezani, 2016; Saia et al., 2020). Aunque la variedad de estudios realizados donde se emplean PGPB o AMF potenciadores del desarrollo vegetales es elevado y este tipo de microorganismos son cada vez más demandados comercialmente, las investigaciones donde se combinan bioestimulantes a partir de extractos naturales junto con microorganismos son muy escasos. Es por ello que este trabajo tiene un gran carácter novedoso y un gran potencial comercial, por lo que se está realizando transferencia de tecnología de manera efectiva.

Por otro lado, la presencia y concentración de carbohidratos en los resultados metabólicos es elevada destacando la fructosa, la sacarosa y el glicerol, osmolitos que también se acumulan en presencia de estrés. La sacarosa y la fructosa son azúcares solubles imprescindibles para el mantenimiento de la planta (Sami et al., 2016) que actúan como señalizadores del estrés e inducen la respuesta al estrés (Rosa et al., 2009). Estos incrementan en concentración frente a la sequía (Sami et al., 2016; D. Wu et al., 2013) pero es la sacarosa quien aumenta intensamente cuando hay congelación o salinidad (Li et al., 2021). El glicerol es un metabolito que generalmente no tiene una elevada presencia en las plantas superiores, pero el incremento de su concentración mediante la aplicación exógena en otros cultivos ha impulsado el crecimiento vegetal en condiciones de salinidad (J. Hu et al., 2014; Kaya et al., 2013), ha activado el sistema defensivo generando resistencia a enfermedades (Zhang et al., 2015) y ha disminuido la concentración de sodio en sus áreas más superficiales aumentando el pigmento de clorofilas y, por ello, desarrollando un número de hojas mayor (Raoufi et al., 2020). Este aumento podría también incidir en un mejor sabor, a falta de realizar pruebas de cata.

El mioinositol, molécula que exhibe un cambio notable, es un bencenoide presente en ambos tejidos que forma parte de los lípidos de señalización de respuesta al estrés, cuando se encuentra en baja presencia en el organismo vegetal, la planta es mucho

más sensible al estrés y puede causar la muerte celular tanto de hojas como de raíces (Case et al., 2018; L. Hu et al., 2020; Q. Jia et al., 2019).

Asimismo, la mayoría de los metabolitos acumulados de forma diferencial presentes tanto en hoja como en raíz de tomate se concentran principalmente en los tratamientos que se inoculan sustancias vivas –PGPB o AMF- o cuando se combinan estos con el bioestimulante empleado. Además, la presencia de triptófano, de ácido glutámico y de ácido glicérico destaca tanto en hoja en condiciones normales y estresantes y en raíz en condiciones normales en los tratamientos que combinan bioestimulante y producto vivo o producto vivo solo. Por otro lado, el ácido glucónico aparece en hoja en condiciones estresantes y en raíz en condiciones normales y estresantes en los tratamientos que combinan bioestimulante y producto vivo, producto vivo solo o bioestimulante y la sacarosa solo se encuentra en raíz en ambas condiciones siempre en presencia de bioestimulante y su combinación con PGPB. Cabe destacar la presencia del ácido málico que solo aparece en condiciones estresantes tanto en hoja y en raíz cuando se combina el bioestimulante con el PGPB (BS+PGPB) y el ácido nicotínico que se aprecia en hoja en ambas condiciones y en raíz en condiciones estresantes. Además, el ácido nicotínico en raíz disminuye en cuatro tratamientos: AMF, PGPB, BS+PGPB y BS+AMF.

Se ha observado que la aplicación de ácido nicotínico, metabolito necesario para los procesos fisiológicos de las plantas (Noctor et al., 2006), mediante pulverización de forma exógena, incrementa la altura y el peso fresco del cultivo y disminuye la fuga de electrolitos y la oxidación medida como peroxidación lipídica (Hussein et al., 2014). Además, su utilización y presencia promueven la protección contra diferentes tipos de estreses abióticos y fortalece el mecanismo de defensa de la planta (Berglund et al., 2017). Por otro lado, el ácido málico se emplea como potencial marcador frente al estrés abiótico ya que incrementa su concentración bajo condiciones estresantes (Patel et al., 2022). Por ejemplo, en condiciones de elevada sequía, el ácido málico duplica su concentración (Gao et al., 2012).

Al realizar el análisis hormonal se observa una constancia en las hormonas presentes, tanto en hoja como en raíz, en los diferentes tratamientos en condiciones estresantes. Además, las plantas inoculadas con AMF presentan una mayor presencia de varias hormonas como es el caso del ácido 12-oxofitodienoico (OPDA), jasmonoil-L-isoleucina (JA-ile) y ácido jasmónico (JA) en hoja bajo condiciones de salinidad. La hormona ácido abscísico (ABA) y la poliamina (PA), en condiciones de estrés de hoja, presentan mayor concentración con PGPB, e IPR con la combinación de BS+AMF. Asimismo, las

giberelinas GA20, GA4 y GA7 son las que destacan principalmente en el tratamiento AMF. Por otro lado, en raíz las hormonas destacables son las mismas pero la concentración es variable. OPDA, JA-ile y JA tienen una presencia muy elevada a excepción del tratamiento con PGPB que es ligeramente menor y ABA y PA incrementa también en todos los tratamientos menos en BA+PGPB. La hormona ácido indol-3-acético (IAA) incrementa ligeramente en todos los tratamientos. Las giberelinas GA20, GA4 y GA7 en raíz destacan al igual que en hoja.

Las fitohormonas como ABA, SA, JA, PA, GA e IPR son imprescindibles en la regulación de la tolerancia al estrés que presenta la planta frente a sequía mediante la señalización celular (Chhaya et al., 2021; Ha et al., 2014; Nolan et al., 2020). El ABA es la principal hormona que genera una señal interna, permitiendo que la planta sobreviva en condiciones estresantes al regular la turgencia de las hojas mediante la regulación del cierre de los estomas (Aslam et al., 2022). Se considera como la hormona del estrés (Koorneef et al., 1998) y en salinidad su concentración incrementa proporcionalmente generando mecanismos de protección (Chen et al., 2022). La IAA es imprescindible para el crecimiento, la elongación celular, el desarrollo de la planta y la dominancia apical (Fu et al., 2015). Esta hormona cuando se encuentra en condiciones de salinidad varía de forma similar a ABA (Ribaut & Pilet, 1994) reduciendo su crecimiento para contrarrestar las acciones provocadas por estrés (Nilsen et al., 1996). Las IPR forman parte de procesos de desarrollo vegetal como la división celular, la dominancia apical y la biogénesis de cloroplastos (Fahad et al., 2015). Estas hormonas pueden reducir la abscisión de hojas provocada por ABA al actuar como su antagonista (Zhang et al., 2020) y en presencia de estrés salino alivian sus efectos (Fahad et al., 2015). Las GA son unas fitohormonas integradas en múltiples procesos del desarrollo de las plantas (El-Sharkawy et al., 2021) con una elevada capacidad de tolerancia frente al estrés abiótico como la salinidad ya que incrementa la eficiencia del uso del agua y disminuir la eficiencia estomática en tomate (Maggio et al., 2010). Los JA son imprescindibles para el funcionamiento de la planta al intervenir en el desarrollo y el crecimiento (Abe et al., 2008). Además, estos se activan frente a diferentes estreses abióticos (Takeuchi et al., 2011) en cultivos como el tomate (Pedranzani et al., 2003) y su aplicación de forma exógena induce genes relacionados con el estrés (EIS Prinsen et al., 1997). Además, estas fitohormonas regulan las relaciones simbióticas con microbios como los PGPR (Backer et al., 2018). El SA es un regulador de crecimiento imprescindible en las plantas que actúa como molécula señal frente al estrés abiótico (Basit et al., 2018; Sofy et al., 2020). Su aplicación exógena genera una resistencia frente a la salinidad (J. Ma et al., 2022) en tomate y es capaz de paliar sus efectos (Naeem et al., 2020). Además, en

bajas concentraciones la tolerancia frente a la salinidad, las bajas temperaturas y la sequía incrementan (Sofy et al., 2020). Las PA son reguladores del crecimiento presentes en las plantas que actúan en la regulación y diferenciación celular (Khare et al., 2018). Asimismo, estas trabajan como mediadores en los efectos producidos por hormonas y, también, como moléculas señalizadores en condiciones de estrés abiótico como el estrés salino incrementando su concentración (Evans & Malmberg, 1989; Galston & Kaur-Sawhney, 1995).

8. CONCLUSIÓN

Los datos obtenidos a lo largo de este trabajo proporcionan información sobre cómo los bioestimulantes aplicados junto a microorganismos simbióticos generan una combinación beneficiosa para el crecimiento vegetal en condiciones de estrés salino.

En cuanto a los objetivos específicos planteados se puede concluir que:

1. La determinación metabolómica muestra que metabolitos como GABA, prolina, ácido aspártico, fructosa, sacarosa, glicerol y mioinositol se encuentran en concentraciones elevadas en hoja y raíz en los tratamientos realizados, mientras que el ácido nicotínico disminuye en raíz en todos los tratamientos realizados bajo estrés salino y el ácido málico aumenta en condiciones de salinidad bajo condiciones estresantes.
2. El análisis hormonal muestra que las hormonas IAA, ABA, JA y las PA presentan una mayor concentración en los tratamientos AMF y PGPB respecto al resto de tratamientos bajo estrés salino en hoja. En raíz, en condiciones de estrés, la concentración de las fitohormonas IAA, JA, ABA y PA incrementa en los todos tratamientos con respecto al control, a excepción del tratamiento BS+PGPB en PA y ABA.

9. PERSPECTIVA FUTURA

De forma paralela se está ampliando el estudio del efecto de combinación de bioestimulantes en hortícolas que presentan un elevado interés agronómico como la lechuga y el brócoli. Además, cabe destacar la solicitud de un proyecto RETOS como colaboración público-privada dentro del programa estatal para impulsar la investigación científico-técnica entre el grupo de investigación donde se realizó este estudio y la empresa Caldic Ibérica. El objetivo de dicho estudio es ampliar los cultivos empleados, no solo a hortícolas, en invernadero y campo, mediante la aplicación de los productos, tanto bioestimulante y producto vivo, descrito en el presente Trabajo Fin de Grado.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, H., Ohnishi, J., Narusaka, M., Seo, S., Narusaka, Y., Tsuda, S., & Kobayashi, M. (2008). Function of Jasmonate in Response and Tolerance of *Arabidopsis* to Thrip Feeding. *Plant and Cell Physiology*, *49*(1), 68–80.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcm168>
- Adejumo, s. A., Oniosun, B., Akpoilih, O., Adeseko, A., & Arowo, D. (2021). Anatomical changes, osmolytes accumulation and distribution in the native plants growing on Pb-contaminated sites. *Environmental Geochemistry and Health*, *43*.
<https://doi.org/10.1007/s10653-020-00649-5>
- AEMA (2015). El medio ambiente en Europa-Estado y perspectiva 2015. Agricultura. *Agencia Europea de Medio Ambiente*.
- AEMET (2022). Informe climático de Verano de 2022. *Ministerio para la transición ecológica y el reto demográfico*.
- Annunziata, M. G., Ciarmiello, L. F., Woodrow, P., Maximova, E., Fuggi, A., & Carillo, P. (2017). Durum wheat roots adapt to salinity remodeling the cellular content of nitrogen metabolites and sucrose. *Frontiers in Plant Science*, *7*.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02035>
- Aslam, M. M., Waseem, M., Jakada, B. H., Okal, E. J., Lei, Z., Sohaib, H., Saqib, A., Yuan, W., Xu, W., & Zhang, Q. (2022). Mechanisms of Abscisic Acid-Mediated Drought Stress Responses in Plants. *Molecular Science*.
<https://doi.org/10.3390/10.3390/ijms23031084>
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 871). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Bandehagh, A., & Taylor, N. L. (2020). Can Alternative Metabolic Pathways and Shunts Overcome Salinity Induced Inhibition of Central Carbon Metabolism in Crops? In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01072>
- Barnett, N. M., & Naylor, A. W. (1966). Amino Acid and Protein Metabolism in Bermuda Grass During Water Stress 12. *Plant Physiology*, *41*(7), 1222–1230.
<https://doi.org/10.1104/pp.41.7.1222>
- Basit, A., Rahman, M., Han, M., Zuo, X., Libo, X., Shah, K., Ahmad, I., & Khalid, M. (2018). *Salicylic acid an emerging growth and flower inducing hormone in marigold (Tagetes sp. L.)*. *7*, 1301–1308.
- Benito, P., Ligorio, D., Bellón, J., Yenush, L., & Mulet, J. M. (2022). A fast method to evaluate in a combinatorial manner the synergistic effect of different biostimulants for promoting growth or tolerance against abiotic stress. *Plant Methods*, *18*(1).
<https://doi.org/10.1186/s13007-022-00943-6>
- Berglund, T., Wallström, A., Nguyen, T.-V., Laurell, C., & Ohlsson, A. B. (2017). Nicotinamide; antioxidative and DNA hypomethylation effects in plant cells. *Plant*

- Physiology and Biochemistry*, 118, 551–560.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.07.023>
- Bhupenchandra, I., Chongtham, S. K., Devi, E. L., Ramesh, R., Choudhary, A. K., Salam, M. D., Sahoo, M. R., Bhutia, T. L., Devi, S. H., Thounaojam, A. S., Behera, C., Harish, M. N., Kumar, A., Dasgupta, M., Devi, Y. P., Singh, D., Bhagowati, S., Devi, C. P., Singh, H. R., & Khaba, C. I. (2022). Role of biostimulants in mitigating the effects of climate change on crop performance. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.967665>
- Butt, M., Ayyub, C. M., Amjad, M., & Ahmad, R. (2016). Proline application enhances growth of chilli by improving physiological and biochemical attributes under salt stress. *The Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 53, 43–49.
<https://doi.org/10.21162/PAKJAS/16.4623>
- Carillo, P., Mastrolonardo, G., Nacca, F., Parisi, D., Verlotta, A., & Fuggi, A. (2008). Nitrogen metabolism in durum wheat under salinity: accumulation of proline and glycine betaine. *Functional Plant Biology*, 35(5), 412–426.
<https://doi.org/10.1071/FP08108>
- Case, K., Salsaa, M., Yu, W., & Greenberg, M. (2018). Regulation of Inositol Biosynthesis: Balancing Health and Pathophysiology. In *Handbook of experimental pharmacology* (Vol. 259). https://doi.org/10.1007/164_2018_181
- Castillo Sánchez, V. M. (2004). *La Estrategia Temática para la Protección del Suelo: un instrumento para el uso sostenible de los suelos en Europa*.
<http://europa.eu.int/comm/environment/soil/index.htm#6>
- Cheeseman, J. (2013). The integration of activity in saline environments: Problems and perspectives. *Functional Plant Biology*, 40. <https://doi.org/10.1071/FP12285>
- Chen, G., Zheng, D., Feng, N., Zhou, H., Mu, D., Zhao, L., Shen, X., Rao, G., Meng, F., & Huang, A. (2022). Physiological mechanisms of ABA-induced salinity tolerance in leaves and roots of rice. *Scientific Reports*, 12(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-11408-0>
- Cheng, B., Li, Z., Liang, L., Cao, Y., Zeng, W., Zhang, X., Ma, X., Huang, L., Nie, G., Liu, W., & Peng, Y. (2018). The γ -aminobutyric acid (GABA) alleviates salt stress damage during seeds germination of white clover associated with Na⁺/K⁺ transportation, dehydrins accumulation, and stress-related genes expression in white clover. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9).
<https://doi.org/10.3390/ijms19092520>
- Chevilly, S., Dolz-Edo, L., Morcillo, L., Vilagrosa, A., López-Nicolás, J., Yenush, L., & Mulet, J. (2021). Identification of distinctive physiological and molecular responses to salt stress among tolerant and sensitive cultivars of broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*). *BMC Plant Biology*, 21. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03263-4>
- Chhaya, Yadav, B., Jogawat, A., Gnanasekaran, P., Kumari, P., Lakra, N., Lal, S. K., Pawar, J., & Narayan, O. P. (2021). An overview of recent advancement in phytohormones-mediated stress management and drought tolerance in crop plants. *Plant Gene*, 25, 100264.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plgene.2020.100264>

- Colla, G., & Rouphael, Y. (2015). Biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.044>
- Cristofano, F., El-Nakhel, C., & Rouphael, Y. (2021). Biostimulant substances for sustainable agriculture: Origin, operating mechanisms and effects on cucurbits, leafy greens, and nightshade vegetables species. In *Biomolecules* (Vol. 11, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom11081103>
- Dar, M., Irfan, M., Rehman, F., Naushin, F., & Khan, F. (2016). Proline Accumulation in Plants: Roles in Stress Tolerance and Plant Development (pp. 155–166). https://doi.org/10.1007/978-81-322-2616-1_9
- De Melo, B. P., Carpinetti, P. de A., Fraga, O. T., Rodrigues-Silva, P. L., Fioresi, V. S., de Camargos, L. F., & da Silva Ferreira, M. F. (2022). Abiotic Stresses in Plants and Their Markers: A Practice View of Plant Stress Responses and Programmed Cell Death Mechanisms. In *Plants* (Vol. 11, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants11091100>
- Del Buono, D. (2021). Can biostimulants be used to mitigate the effect of anthropogenic climate change on agriculture? It is time to respond. In *Science of the Total Environment* (Vol. 751). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141763>
- Drobek, M., Fraç, M., & Cybulska, J. (2019). Plant Biostimulants: Importance of the Quality and Yield of Horticultural Crops and the Improvement of Plant Tolerance to Abiotic Stress—A Review. *Agronomy*, 9, 335. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060335>
- Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- EIS Prinsen, A. M., Bauw, G., & Van Montaguasi, M. (1997). Antagonistic Effects of Abscisic Acid and Jasmonates on Salt Stress-Inducible Transcripts in Rice Roots. In *The Plant Cell* (Vol. 9). American Society of Plant Physiologists.
- El-Sharkawy, I., Ismail, A., Darwish, A., El Kayal, W., Subramanian, J., & Sherif, S. M. (2021). Functional characterization of a gibberellin F-box protein, PsISLY1, during plum fruit development. *Journal of Experimental Botany*, 72(2), 371–384. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa438>
- Evans, P. A., & Malmberg, R. L. (1989). Do Polyamines Have Roles in Plant Development? Annual review of plant physiology and plant molecular biology, 40(1), 235-269. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.001315>
- Fahad, S., Nie, L., Chen, Y., Wu, C., Xiong, D., Saud, S., Liu, H., Cui, K., & Huang, J. (2015). *Crop Plant Hormones and Environmental Stress* (Vol. 15, pp. 371–400). https://doi.org/10.1007/978-3-319-09132-7_10
- FAO (2012). High level experts forum-how to feed the world in 2050. Rome.
- FAO (2009). How to Feed the World in 2050.
- Farhangi-Abriz, S., & Ghassemi-Golezani, K. (2016). Improving amino acid composition of soybean under salt stress by salicylic acid and jasmonic acid.

- Journal of Applied Botany and Food Quality*, 89, 243–248.
<https://doi.org/10.5073/JABFQ.2016.089.031>
- Ferreira, G. M. D. R., Silva, L. F. de O., Pasqual, M., Melloni, R., Luz, J. M. Q., & Soares, J. D. R. (2022). Microbial biostimulants as alternatives for the rooting of olive tree cuttings. *Bioscience Journal*, 38. <https://doi.org/10.14393/BJ-v38n0a2022-53570>
- Fricke, W., Akhiyarova, G., Veselov, D., & Kudoyarova, G. (2004). Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate in response to salinity in barley leaves. *Journal of Experimental Botany*, 55, 1115–1123.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erh117>
- Fu, S. F., Wei, J. Y., Chen, H. W., Liu, Y. Y., Lu, H. Y., & Chou, J. Y. (2015). Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. In *Plant Signaling and Behavior* (Vol. 10, Issue 8). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1048052>
- Galston, A. W., & Kaur-Sawhney, R. (1995). Polyamines as Endogenous Growth Regulators. En Springer eBooks (pp. 158-178). https://doi.org/10.1007/978-94-011-0473-9_8
- Gao, Q.-H., Wu, C., Wang, M., Xu, B.-N., & Du, L. (2012). Effect of Drying of Jujubes (*Ziziphus jujuba* Mill.) on the Contents of Sugars, Organic Acids, α -Tocopherol, β -Carotene, and Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 9642–9648. <https://doi.org/10.1021/jf3026524>
- García-García, A. L., García-Machado, F. J., Borges, A. A., Morales-Sierra, S., Boto, A., & Jiménez-Arias, D. (2020). Pure Organic Active Compounds Against Abiotic Stress: A Biostimulant Overview. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.575829>
- Geilfus, C.-M. (2018). Review on the significance of chlorine for crop yield and quality. *Plant Science*, 270. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.02.014>
- Gisbert, C., Timoneda, A., Porcel, R., Ros, R., & Mulet, J. M. (2020). Overexpression of *bvhb2*, a class 2 non-symbiotic hemoglobin from sugar beet, confers drought-induced withering resistance and alters iron content in tomato. *Agronomy*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/agronomy10111754>
- Gupta, S., Stirk, W. A., Plačková, L., Kulkarni, M. G., Doležal, K., & Van Staden, J. (2021). Interactive effects of plant growth-promoting rhizobacteria and a seaweed extract on the growth and physiology of *Allium cepa* L. (onion). *Journal of Plant Physiology*, 262, 153437.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153437>
- Ha, C. Van, Leyva-Gonzalez, M. A., Osakabe, Y., Tran, U. T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Tanaka, M., Seki, M., Yamaguchi, S., Dong, N. Van, Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Herrera-Estrella, L., & Tran, L. S. P. (2014). Positive regulatory role of strigolactone in plant responses to drought and salt stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(2), 851–856. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322135111>

- Hu, J., Zhang, Y., Wang, J., & Zhou, Y. (2014). Glycerol affects root development through regulation of multiple pathways in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, *9*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086269>
- Hu, L., Zhou, K., Ren, G., Yang, S., Liu, Y., Zhang, Z., Li, Y., Gong, X., & Ma, F. (2020). Myo-inositol mediates reactive oxygen species-induced programmed cell death via salicylic acid-dependent and ethylene-dependent pathways in apple. *Horticulture Research*, *7*, 138. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00357-2>
- Hussein, M., Faham, S. Y., & Kumar, A. (2014). Role of Foliar Application of Nicotinic Acid and Tryptophan on Onion Plants Response to Salinity Stress. *Journal of Agricultural Science*, *6*. <https://doi.org/10.5539/jas.v6n8p41>
- INE (2022). Censo agrario año 2020. *Instituto Nacional de Estadística*.
- Jamil, A., Riaz, S., Ashraf, M., & Foolad, M. (2011). Gene Expression Profiling of Plants under Salt Stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *30*, 435–458. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.605739>
- Jia, Q., Kong, D., Li, Q., Sun, S., Song, J., Zhu, Y., Liang, K., Ke, Q., Lin, W., & Huang, J. (2019). The function of inositol phosphatases in plant tolerance to abiotic stress. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20163999>
- Jia, W., Wang, Y., Zhang, S., & Zhang, J. (2002). Salt-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. *Journal of Experimental Botany*, *53*, 2201–2206. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf079>
- Kaushal, P., Ali, N., Saini, S., Pati, P. K., & Pati, A. M. (2023). Physiological and molecular insight of microbial biostimulants for sustainable agriculture. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1041413>
- Kaya, C., Aydemir, S., Sonmez, O., Ashraf, M., & Dikilitas, M. (2013). Regulation of growth and some key physiological processes in salt-stressed maize (*Zea mays* L.) plants by exogenous application of asparagine and glycerol. *Acta Botanica Croatica*, *72*(1), 157–168. <https://doi.org/10.2478/v10184-012-0012-x>
- Kaymakanova, M. (2014). Effect of Salinity on Germination and Seed Physiology in Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *23*. <https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10818430>
- Khan, N., Bano, A., & Zandi, P. (2018). Effects of exogenously applied plant growth regulators in combination with PGPR on the physiology and root growth of chickpea (*Cicer arietinum*) and their role in drought tolerance. *Journal of Plant Interactions*, *13*, 239–247. <https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1471527>
- Khare, T., Srivastav, A., Shaikh, S., & Kumar, V. (2018). Polyamines and Their Metabolic Engineering for Plant Salinity Stress Tolerance. En Springer eBooks (pp. 339-358). https://doi.org/10.1007/978-3-319-75671-4_13
- Koornneef, M., Léon-Kloosterziel, K. M., Schwartz, S. H., & Zeevaart, J. A. D. (1998). The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *36*(1), 83–89. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(98\)80093-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0981-9428(98)80093-4)

- Kusvuran, S., Kiran, S., & Ellialtioglu, S. S. (2016). Antioxidant Enzyme Activities and Abiotic Stress Tolerance Relationship in Vegetable Crops. In *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*. InTech. <https://doi.org/10.5772/62235>
- Li, L., Dou, N., Zhang, H., & Wu, C. (2021). The versatile GABA in plants. *Plant Signaling & Behavior*, *16*, 1862565. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1862565>
- LI, P., YANG, X., WANG, H., PAN, T., YANG, J., WANG, Y., XU, Y., YANG, Z., & XU, C. (2021). Metabolic responses to combined water deficit and salt stress in maize primary roots. *Journal of Integrative Agriculture*, *20*(1), 109–119. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63242-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63242-7)
- Locascio, A., Andrés-Colás, N., Mulet, J., & Yenush, L. (2019). *Saccharomyces cerevisiae* as a Tool to Investigate Plant Potassium and Sodium Transporters. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*, 2133. <https://doi.org/10.3390/ijms20092133>
- Ma, J., Saleem, M. H., Ali, B., Rasheed, R., Ashraf, M. A., Aziz, H., Ercisli, S., Riaz, S., Elsharkawy, M. M., Hussain, I., Alhag, S. K., Ahmed, A. E., Vodnar, D. C., Mumtaz, S., & Marc, R. A. (2022). Impact of foliar application of syringic acid on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under heavy metal stress-insights into nutrient uptake, redox homeostasis, oxidative stress, and antioxidant defense. *Frontiers in Plant Science*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.950120>
- Ma, Y., Dias, M. C., & Freitas, H. (2020). Drought and Salinity Stress Responses and Microbe-Induced Tolerance in Plants. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.591911>
- Maggio, A., Barbieri, G., Raimondi, G., & De Pascale, S. (2010). Contrasting Effects of GA3 Treatments on Tomato Plants Exposed to Increasing Salinity. *Journal of Plant Growth Regulation*, *29*, 63–72. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9114-7>
- Malekzadeh, P., Khara, J., & Heydari, R. (2014). Alleviating effects of exogenous Gamma-aminobutyric acid on tomato seedling under chilling stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants: An International Journal of Functional Plant Biology*, *20*, 133–137. <https://doi.org/10.1007/s12298-013-0203-5>
- MAPA (2022). Estadística plantales hortícolas 2022 Comunidad Valenciana. *Subdirección General de Análisis Coordinación y Estadística, Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación*.
- Meena, V., Meena, S., Verma, J., & Meena, R. S. (2015). The needs of nutrient use efficiency for sustainable agriculture. *Journal of Cleaner Production*, *102*. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.04.044>
- Meena, V. S., Maurya, B. R., & Verma, J. P. (2014). Does a rhizospheric microorganism enhance K⁺ availability in agricultural soils? *Microbiological Research*, *169*(5), 337–347. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.003>
- Mei, X., Chen, Y., Zhang, L., Fu, X., Wei, Q., Grierson, D., Zhou, Y., Huang, Y., Dong, F., & Yang, Z. (2016). Dual mechanisms regulating glutamate decarboxylases and accumulation of gamma-aminobutyric acid in tea (*Camellia sinensis*) leaves

- exposed to multiple stresses. *Scientific Reports*, 6, 23685.
<https://doi.org/10.1038/srep23685>
- Merewitz, E., & Krishnan, S. (2014). Drought Stress and Trinexapac-ethyl Modify Phytohormone Content Within Kentucky Bluegrass Leaves. *Journal of Plant Growth Regulation*. <https://doi.org/10.1007/s00344-014-9434-0>.
- Mulet, J. M. (2020). Mitos y realidades de los alimentos transgénicos. *Boletín Colegio Oficial de Docentes*, 289, 13-15. <http://hdl.handle.net/10251/139150>
- Munns, R. (2002). Munns, R.: Comparative Physiology of Salt and Water Stress. *Plant Cell Environ.* 28, 239-250. *Plant, Cell & Environment*, 25, 239–250.
<https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>
- Naeem, M., Basit, A., Ahmad, I., Mohamed, H. I., & Wasila, H. (2020). Effect of Salicylic Acid and Salinity Stress on the Performance of Tomato Plants. *Gesunde Pflanzen*, 72(4), 393–402. <https://doi.org/10.1007/s10343-020-00521-7>
- Nayyar, H., Kaur, R., Kaur, S., & Singh, R. (2014). γ -Aminobutyric Acid (GABA) Imparts Partial Protection from Heat Stress Injury to Rice Seedlings by Improving Leaf Turgor and Upregulating Osmoprotectants and Antioxidants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33, 408–419. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9389-6>
- Nilsen, E. T., Orcutt, D. M., & Hale, M. G. (1996). *The physiology of plants under stress. Abiotic factors*. Wiley.
- Noctor, G., Queval, G., & Gakière, B. (2006). NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions*. *Journal of Experimental Botany*, 57(8), 1603–1620. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj202>
- Nolan, T. M., Vukašinović, N., Liu, D., Russinova, E., & Yin, Y. (2020). Brassinosteroids: Multidimensional Regulators of Plant Growth, Development, and Stress Responses[OPEN]. *The Plant Cell*, 32(2), 295–318.
<https://doi.org/10.1105/tpc.19.00335>
- Orsini, F., Pennisi, G., Mancarella, S., Al Nayef, M., Sanoubar, R., Nicola, S., & Gianquinto, G. (2018). Hydroponic lettuce yields are improved under salt stress by utilizing white plastic film and exogenous applications of proline. *Scientia Horticulturae*, 233, 283–293.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.019>
- Ortas, I. (2019). Under field conditions, mycorrhizal inoculum effectiveness depends on plant species and phosphorus nutrition. *Journal of Plant Nutrition*, 42(18), 2349–2362. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1659336>
- Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. P. (2014). ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. In *New Phytologist* (Vol. 202, Issue 1, pp. 35–49).
<https://doi.org/10.1111/nph.12613>
- Patel, J., Khandwal, D., Choudhary, B., Ardeshana, D., Jha, R. K., Tanna, B., Yadav, S., Mishra, A., Varshney, R. K., & Siddique, K. H. M. (2022). Differential Physio-Biochemical and Metabolic Responses of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) under Multiple Abiotic Stress Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2). <https://doi.org/10.3390/ijms23020660>

- Pedranzani, H., Racagni, G., Alemano, S., Miersch, O., Ramírez, I., Pena-Cortes, H., Taleisnik, E., Machado, E., & Abdala, G. (2003). Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regulation*, *41*, 149–158. <https://doi.org/10.1023/A:1027311319940>
- Pingali, P. (2012). Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*, 12302–12308. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912953109>
- Posmyk, M. M., & Szafrńska, K. (2016). Biostimulators: A new trend towards solving an old problem. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 7, Issue MAY2016). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00748>
- Poupin, M. J., Timmermann, T., Vega, A., Zuñiga, A., & González, B. (2013). Effects of the Plant Growth-Promoting Bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN throughout the Life Cycle of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, *8*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069435>
- Prasad, M., Srinivasan, R., Chaudhary, M., Choudhary, M., & Jat, L. K. (2019). Chapter Seven - Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Sustainable Agriculture: Perspectives and Challenges. In A. K. Singh, A. Kumar, & P. K. Singh (Eds.), *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture* (pp. 129–157). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815879-1.00007-0>
- Priya, M., Sharma, L., Kaur, R., Bindumadhava, H., Nair, R. M., Siddique, K. H. M., & Nayyar, H. (2019). GABA (γ -aminobutyric acid), as a thermo-protectant, to improve the reproductive function of heat-stressed mungbean plants. *Scientific Reports*, *9*(1), 7788. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44163-w>
- Raoufi, A., Rahemi, M., Salehi, H., & Javanshah, A. (2020). Selecting high performance rootstocks for pistachio cultivars under salinity stress based on their morpho-physiological characteristics. *International Journal of Fruit Science*, *20*(S2), S29–S47. <https://doi.org/10.1080/15538362.2019.1701616>
- Ribaut, J. M., & Pilet, P. E. (1994). Water stress and indol-3yl-acetic acid content of maize roots. *Planta*, *193*(4), 502–507. <https://doi.org/10.1007/BF02411554>
- Rios, G., Cabedo López, M., Rull, B., Yenush, L., Serrano, R., & Mulet, J. (2012). Role of the yeast multidrug transporter Qdr2 in cation homeostasis and the oxidative stress response. *FEMS Yeast Research*, *13*. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12013>
- Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R., & Willmitzer, L. (2000). Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R.N. & Willmitzer, L. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant J.* *23*, 131-142. *The Plant Journal*, *23*, 131–142. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00774.x>
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González Sanchez, J., Hilal, M., & Prado, F. (2009). Soluble sugars: Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. *Plant Signaling & Behavior*, *4*, 388–393. <https://doi.org/10.4161/psb.4.5.8294>
- Rouphael, Y., Franken, P., Schneider, C., Schwarz, D., Giovannetti, M., Agnolucci, M., Pascale, S. De, Bonini, P., & Colla, G. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi act as

- biostimulants in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 196, 91–108.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.002>
- Saia, S., Aissa, E., Luziatelli, F., Ruzzi, M., Colla, G., Ficca, A. G., Cardarelli, M., & Roupheal, Y. (2020). Growth-promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi differentially benefit tomato and corn depending upon the supplied form of phosphorus. *Mycorrhiza*, 30(1), 133–147. <https://doi.org/10.1007/s00572-019-00927-w>
- Sami, F., Yusuf, M., Faizan, M., Faraz, A., & Hayat, S. (2016). Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 54–61.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.005>
- Saporta, R., Bou, C., Frías, V., & Mulet, J. M. (2019). A method for a fast evaluation of the biostimulant potential of different natural extracts for promoting growth or tolerance against abiotic stress. *Agronomy*, 9(3).
<https://doi.org/10.3390/agronomy9030143>
- Shi, S. Q., Shi, Z., Jiang, Z. P., Qi, L. W., Sun, X. M., Li, C. X., Liu, J. F., Xiao, W. F., & Zhang, S. G. (2010). Effects of exogenous GABA on gene expression of *Caragana intermedia* roots under NaCl stress: Regulatory roles for H₂O₂ and ethylene production. *Plant, Cell and Environment*, 33(2), 149–162.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02065.x>
- Shukla, P. S., Mantin, E. G., Adil, M., Bajpai, S., Critchley, A. T., & Prithviraj, B. (2019). Ascophyllum nodosum-Based Biostimulants: Sustainable Applications in Agriculture for the Stimulation of Plant Growth, Stress Tolerance, and Disease Management. *Frontiers in Plant Science*, 10.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00655>
- Sofy, M., Seleiman, M., Alhammad, B., Alharbi, B., & Mohamed, H. (2020). Minimizing Adverse Effects of Pb on Maize Plants by Combined Treatment with Jasmonic, Salicylic Acids and Proline. *Agronomy*, 10, 699.
<https://doi.org/10.3390/agronomy10050699>
- Souana, K., Taïbi, K., Ait Abderrahim, L., Amirat, M., Achir, M., Boussaid, M., & Mulet, J. M. (2020). Salt-tolerance in *Vicia faba* L. is mitigated by the capacity of salicylic acid to improve photosynthesis and antioxidant response. *Scientia Horticulturae*, 273, 109641. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109641>
- Taïbi, K., del Campo, A. D., Aguado, A., & Mulet, J. M. (2015). The effect of genotype by environment interaction, phenotypic plasticity and adaptation on *Pinus halepensis* reforestation establishment under expected climate drifts. *Ecological Engineering*, 84, 218–228.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.09.005>
- Takeuchi, K., Gyohda, A., Tominaga, M., Kawakatsu, M., Hatakeyama, A., Ishii, N., Shimaya, K., Nishimura, T., Riemann, M., Nick, P., Hashimoto, M., Komano, T., Endo, A., Okamoto, T., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Terakawa, T., & Koshiba, T. (2011). RSOsPR10 Expression in Response to Environmental Stresses is Regulated Antagonistically by Jasmonate/Ethylene and Salicylic Acid Signaling Pathways in Rice Roots. *Plant and Cell Physiology*, 52(9), 1686–1696.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcr105>

- Tian, X., Wu, X., Li, Y., & Zhang, S. (2005). The effect of gamma-aminobutyric acid in superoxide dismutase, peroxidase and catalase activity response to salt stress in maize seedling. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*, *38*, 75–79.
- Vijayakumari, K., & Puthur, J. (2015). Aminobutyric acid (GABA) priming enhances the osmotic stress tolerance in *Piper nigrum* Linn. plants subjected to PEG-induced stress. *Plant Growth Regulation*, *78*. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0074-6>
- Wu, D., Cai, S., Chen, M., Ye, L., Chen, Z.-H., Zhang, H., Dai, F., Wu, F., & Zhang, G. P. (2013). Tissue Metabolic Responses to Salt Stress in Wild and Cultivated Barley. *PLoS One*, *8*, e55431. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055431>
- Wu, H., Zhang, X., Giraldo, J. P., & Shabala, S. (2018). It is not all about sodium: revealing tissue specificity and signalling roles of potassium in plant responses to salt stress. *Plant and Soil*, *431*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3770-y>
- Xia, J. (Jeff), & Wishart, D. (2011). Metabolomic Data Processing, Analysis, and Interpretation Using MetaboAnalyst. *Current Protocols in Bioinformatics / Editorial Board, Andreas D. Baxevanis ... [et Al.], Chapter 14*, Unit 14.10. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1410s34>
- Yasar, F., Talhouni, M., Ellialtioglu, S., & Kusvuran Çankırı Karatekin Üniversitesi, S. (2013). SOD, CAT, GR and APX Enzyme Activities in Callus Tissues of Susceptible and Tolerant Eggplant Varieties under Salt Stress the use of dihaploidization technique and biotechnological applications in pepper breeding View project. In *Article in Research Journal of Biotechnology*. <https://www.researchgate.net/publication/262335700>
- Zhang, Y., Li, Y., Hassan, M. J., Li, Z., & Peng, Y. (2020). Indole-3-acetic acid improves drought tolerance of white clover via activating auxin, abscisic acid and jasmonic acid related genes and inhibiting senescence genes. *BMC Plant Biology*, *20*(1), 150. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02354-y>
- Zhang, Y., Smith, P., Maximova, S. N., & Guiltinan, M. J. (2015). Application of glycerol as a foliar spray activates the defence response and enhances disease resistance of *Theobroma cacao*. *Molecular Plant Pathology*, *16*(1), 27–37. <https://doi.org/10.1111/mpp.12158>
- Zuzunaga-Rosas, J., González-Orenga, S., Calone, R., Rodríguez-Heredia, R., Asaff-Torres, A., Boscaiu, M., Ibáñez-Asensio, S., Moreno-Ramón, H., & Vicente, O. (2023). Use of a Biostimulant to Mitigate the Effects of Excess Salinity in Soil and Irrigation Water in Tomato Plants. *Plants*, *12*(5). <https://doi.org/10.3390/plants12051190>

11.ANEXO

Tabla 1. Metabolitos significativamente acumulados, *Fold Change*, valor logarítmico y p-valor en los diferentes tratamientos en hoja en condiciones normales. Obtenido del *Vulcano Plot*. *Fold Change*: 1,5 y t-test: 0,05. BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal).

BS				BS+AMF			
Metabolito	FC	log ₂ (FC)	p-valor	Metabolito	FC	log ₂ (FC)	p-valor
Glucosa	5,5206	2,4648	0,002092	Glucosa	4,9547	2,3088	0,001058
AMF				Urea	0,33816	-1,5642	0,002239
Metabolito	FC	log ₂ (FC)	p-valor	Ácido glicérico	2,3042	1,2042	0,001182
Ácido nicotínico	3,7565	1,9094	0,002972	Triptófano	0,23573	-2,0848	0,003541
Alanina	0,24633	-2,0213	0,004771	Ácido oxálico	0,34419	-1,5387	0,004236
Fructosa	0,25186	-1,9893	0,005234	Fructosa	0,36891	-1,4387	0,007416
PGPB				BS+PGPB			
Metabolito	FC	log ₂ (FC)	p-valor	Metabolito	FC	log ₂ (FC)	p-valor
Glucosa	4,9742	2,3145	0,001219	Glucosa	4,9399	2,3045	0,001111
Ácido glutámico	0,36275	-1,4629	0,007513	Ácido glicérico	3,1916	1,6743	0,001424
Ácido oxálico	0,66505	-0,5884	0,008541	Ácido quínico	2,8123	1,4918	0,00477
Fructosa	0,33824	-1,5639	0,009369	Ácido oxálico	1,9886	0,99173	0,008043
				Ácido glucónico	2,9818	1,5762	0,009147

Tabla 2. Metabolitos significativamente acumulados, *Fold Change*, valor logarítmico y p-valor en los diferentes tratamientos en hoja en condiciones de estrés salino. Obtenido del *Vulcano Plot*. *Fold Change*: 1,5 y t-test: 0,05. BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal).

BS				PGPB			
Metabolito	FC	log ₂ (FC)	p-valor	Metabolito	FC	log ₂ (FC)	p-valor
-	-	-	-	Glicerol	2,7625	1,466	0,000295
AMF				Ácido quínico	1,9413	0,957	0,000657
Metabolito	FC	log ₂ (FC)	p-valor	Triptófano	1,876	0,90766	0,00235
Ácido cítrico	4,9729	2,3141	0,001501	Ácido nicotínico	4,178	2,0628	0,002577
BS+PGPB				Ácido fumárico	1,7498	0,80719	0,004638
Metabolito	FC	log ₂ (FC)	p-valor	Ácido málico	5,3345	2,4154	0,004871
Ácido fumárico	0,35214	-1,5058	0,003949	Ácido glicérico	3,404	1,7672	0,005507
Ácido oxálico	0,21699	-2,2043	0,004983	Ácido treónico	1,9661	0,97534	0,006625
Glicerol	2,4441	1,2893	0,005051	Ácido cítrico	0,51705	-0,95164	0,008786
GABA	2,4324	1,2824	0,005762	BS+AMF			
Ácido málico	2,2028	1,1394	0,009028	Metabolito	FC	log ₂ (FC)	p-valor
Alanina	0,43814	-1,1905	0,009389	Glicerol	2,0304	1,0218	0,004246
Ácido fosfórico	0,34192	-1,5483	0,009518	Ácido fosfórico	0,23785	-2,0719	0,006007

Tabla 3. Metabolitos significativamente acumulados, *Fold Change*, valor logarítmico y p-valor en los diferentes tratamientos en raíz en condiciones normales. Obtenido del *Vulcano Plot*. *Fold Change*: 1,5 y t-test: 0,05. BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal).

BS				PGPB			
Metabolito	FC	log ₂ (FC)	p-valor	Metabolito	FC	log ₂ (FC)	p-valor
Ácido succínico	5,7874	2,5329	0,000582	Triptófano	0,22809	-2,1323	0,034412
Eritritol	19,85	4,3111	0,000143	BS+AMF			
Ácido glucónico	4,3725	2,1285	0,000195	Metabolito	FC	log ₂ (FC)	p-valor
GABA	0,096298	-3,3763	0,000213	Ácido glucónico	4,12	2,0427	0,001319
Putrescina	6,4251	2,6837	0,000255	Ácido glicérico	2,3049	1,2047	0,014306
Glicerol	6,6669	2,737	0,000424	Gluconolactona	6,4946	2,6992	0,004306
Prolina	3,9767	1,9916	0,000509	Ácido cítrico	2,4095	1,2687	0,018535
Ácido piroglutámico	11,912	3,5743	0,005729	Ácido treónico	2,5028	1,3236	0,00328
Ácido glicérico	4,2094	2,0736	0,000756	Ácido gultámico	3,2393	1,6957	0,0045
Ácido fumárico	4,4012	2,1379	0,024014	Glicerol	1,6137	0,69033	0,00769
Fructosa	0,32097	-1,6395	0,002753	BS+PGPB			
Sacarosa	0,15526	-2,6872	0,037159	Metabolito	FC	log ₂ (FC)	p-valor
Gluconolactona	3,4006	1,7658	0,004438	GABA	0,2446	-2,0315	0,029764
Glicina	10,839	3,4382	0,006354	Isoleucina	0,24338	-2,0387	0,003808
Ácido aspártico	3,5074	1,8104	0,008178	Gluconolactona	2,5419	1,3459	0,005418
AMF				Sacarosa	0,34241	-1,5462	0,008918
Metabolito	FC	log ₂ (FC)	p-valor				
Ácido cítrico	2,6262	1,393	0,003086				
Ácido glicérico	1,6912	0,75806	0,006237				

Tabla 4. Metabolitos significativamente acumulados, *Fold Change*, valor logarítmico y p-valor en los diferentes tratamientos en raíz en condiciones de estrés salino. Obtenido del *Vulcano Plot*. *Fold Change*: 1,5 y t-test: 0,05. BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal).

BS				BS+AMF			
Metabolito	FC	log ₂ (FC)	p-valor	Metabolito	FC	log ₂ (FC)	p-valor
Ácido glucónico	0,51747	-0,95045	0,005832	Ácido nicotínico	0,25467	-1,4593	0,022103
AMF				BS+PGPB			
Metabolito	FC	log ₂ (FC)	p-valor	Metabolito	FC	log ₂ (FC)	p-valor
Ácido nicotínico	0,33337	-1,5848	0,001166	Ácido nicotínico	0,28454	-1,8133	0,00544
Sacarosa	6,2384	2,6412	0,007324	Ácido málico	0,20599	-2,2793	0,008599
PGPB							
Metabolito	FC	log ₂ (FC)	p-valor				
Ácido nicotínico	0,4509	-1,1491	0,00451				

Tabla 5. Metabolitos significativamente acumulados (MSA) y su presencia en los diferentes tratamientos en hoja en condiciones normales. Obtenido del diagrama de Venn. *Fold Change*: 1,5 y t-test: 0,05. BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal).

TRATAMIENTO	MSA
[PGPB] + [BS+AMF]	Ácido glutámico
	Ácido oxálico
[AMF] + [BS+AMF]	Ácido nicotínico
	Alanina
[AMF] + [PGPB] + [BS+AMF]	Fructosa
[BS] + [PGPB] + [BS+AMF]	Glucosa
[BS+AMF] + [BS+PGPB]	Ácido glicérico
	Triptófano
[BS+AMF]	Urea
[BS+PGPB]	Ácido málico
	Ácido quínico
	Ácido glucónico

Tabla 6. Metabolitos significativamente acumulados (MSA) y su presencia en los diferentes tratamientos en hoja en condiciones de estrés salino. Obtenido del diagrama de Venn. *Fold Change*: 1,5 y t-test: 0,05. BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal).

TRATAMIENTO	MSA
[AMF] + [PGPB] + [BS+PGPB]	Ácido cítrico
[PGPB] + [BS+AMF] + [BS+PGPB]	Glicerol
	Ácido fosfórico
[PGPB]	Ácido treónico
	Ácido nicotínico
[PGPB] + [BS+PGPB]	Alanina
	Fructosa
	Ácido glutámico
	Ácido oxálico
	Urea
	Ácido glicérico
	GABA
	Triptófano
	Ácido quínico
	Ácido málico
	Ácido glucónico
	Ácido fumárico

Tabla 7. Metabolitos significativamente acumulados (MSA) y su presencia en los diferentes tratamientos en raíz en condiciones normales. Obtenido del diagrama de Venn. *Fold Change*: 1,5 y t-test: 0,05. BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal).

TRATAMIENTO	MSA
[AMF] + [BS+AMF]	Ácido cítrico
[BS] + [BS+AMF] + [BS+PGPB]	Ácido glucónico
[BS] + [BS+AMF]	Glicerol
[BS] + [BS+PGPB]	Sacarosa
	GABA
[BS] + [AMF] + [BS+AMF]	Ácido glicérico
[PGPB]	Triptófano
[BS+AMF]	Ácido treónico
	Ácido glutámico
[BS+PGPB]	Isoleucina
[BS]	Ácido succínico
	Eritritol
	Putrescina
	Prolina
	Ácido piroglutámico
	Ácido fumárico
	Fructosa
	Glicina
Ácido aspártico	

Tabla 8. Metabolitos significativamente acumulados (MSA) y su presencia en los diferentes tratamientos en raíz en condiciones de estrés salino. Obtenido del diagrama de Venn. *Fold Change*: 1,5 y t-test: 0,05. BS (bioestimulante); AMF (hongo micorrícico arbuscular); PGPB (bacteria promotora del crecimiento vegetal).

TRATAMIENTO	MSA
[AMF] + [PGPB] + [BS+AMF] + [BS+PGPB]	Ácido nicotínico
[BS]	Ácido glucónico
[AMF]	Sacarosa
[BS+PGPB]	Ácido málico