



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**EXTRACTO DE *Sesuvium portulacastrum* COMO
BIOESTIMULANTE EN PLÁNTULAS DE TOMATE (*Solanum
lycopersicum* L.) BAJO ESTRÉS HÍDRICO**

Por:

ILIANA VEGA BÁEZ

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Iliana Vega Báez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.

Sañudo Barajas J. Adriana

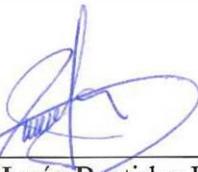
Dra. Josefa Adriana Sañudo Barajas.
Directora de Tesis



MC. Rosabel Vélez de la Rocha
Integrante del comité de tesis



MC. José Armando Carillo Fasio
Integrante del comité de tesis



MC. Pedro de Jesús Bastidas Bastidas
Integrante del comité de tesis

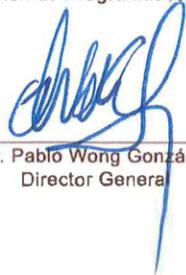
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Extracto de *Sesuvium portulacastrum* como Bioestimulante en Plántulas de Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo Estrés Hídrico” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Iliana Vega Báez, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

En primer orden, doy gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo otorgado para la realización de la presente investigación; así como, al posgrado de Maestría en Ciencias del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.) institución que me abrió sus puertas para cursar y obtener el grado que se sustenta bajo su plan de estudios y sistema de enseñanza.

Agradezco a mis formadores, a cada uno de manera muy especial y con mucho afecto, por sus valiosos aportes e invaluable ayuda y dedicación. A la Dra. Josefa Adriana Sañudo Barajas, por su constante dedicación, exigencia y paciencia, para formarme como profesional, e inspirarme con su ejemplo a seguir sus pasos. A la MC. Rosabel Vélez de la Rocha y el MC. Pedro de Jesús Bastidas Bastidas, les agradezco porque siempre obtuve su apoyo incondicional además de sus enseñanzas en el ámbito profesional y emocional, impulsándome con sus consejos de manera oportuna. Al MC. José Armando Carrillo Fasio por su orientación académica para el logro de los objetivos de la investigación.

A mis profesores Dr. Benigno Valdés Torres por su invaluable apoyo en el área estadística; Dr. César Martín del Campo por su aporte en el área de nutrición vegetal; Dr. Tomas Osuna Enciso por instruirme y adentrarme a la fisiología vegetal.

A cada técnico de laboratorio por su apoyo en la experimentación: Claudia Olmeda Rubio, Isidro Márquez Zequera, Célida Isabel Martínez Rodríguez, Rosalba Contreras Martínez, Laura Aracely Contreras Angulo y Alexis Emus Medina. Al gran apoyo en las necesidades de programas y sistemas de Jorge Luis Manjarrez Vázquez.

Muy especialmente a los laboratorios de Bioquímica Vegetal y Plaguicidas, por siempre acogerme como un miembro más dentro de su equipo de trabajo. A los demás laboratorios que conforman la coordinación Culiacán del CIAD por el apoyo brindado, muchas gracias.

A mis colegas de maestría Nieves Briceida Pérez Meza, Alsino Villareal Wong, Ricardo Vega y Alejandra Colón; así como, de doctorado Brisceida Jiménez Nevárez y Carlos Cota, muchas gracias por escucharme, sacarme de dudas e impulsarme a terminar mi objetivo de formación profesional.

DEDICATORIA

A mis Hijos, mi madre y hermanos por su apoyo y soporte incondicional.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	5
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2 ANTECEDENTES	15
2.1. Estrés Hídrico	15
2.1.1. Efectos del Estrés Hídrico	18
2.1.2. Mecanismos de Defensa al Estrés Hídrico	20
2.1.2.1. Ajuste osmótico.	21
2.1.2.2. Regulación osmótica.....	21
2.1.2.3. Osmolitos.....	22
2.1.2.4. Pinitol.	23
2.1.2.5. Prolina.....	24
2.1.2.6. Glicina betaína	25
2.1.3. Inductores de Estrés Hídrico	27
2.2. Bioestimulante.....	28
2.3. Plantas Halófitas.....	29
2.3.1. Procesos Adaptativos en Plantas Halófitas.....	30
2.4. <i>Sesuvium portulacastrum</i>	32
2.5. El Cultivo de Tomate	34
3. HIPÓTESIS	38
4. OBJETIVOS	39
4.1. Objetivo General	39
4.2. Objetivos Específicos.....	39
5. MATERIALES Y MÉTODOS	40
5.1. Localización del Áreas de Colecta de <i>Sesuvium portulacastrum</i> L.	40
5.2. Preparación de Extracto de <i>S. portulacastrum</i>	41
5.2.1. Eficiencia de Extracción.....	42
5.2.2. Prueba de Fitotoxicidad del extracto de <i>S. portulacastrum</i> L.	43
5.2.3. Identificación de Componentes por Barrido Cromatográfico GC/MS.....	44

CONTENIDO (continuación)

5.2.4. Cuatificación del Osmolito Pinitol en Extracto.....	44
5.3. Material Vegetal.....	45
5.3.1. Inducción de Estrés Hídrico con Polietilenglicol.....	46
5.3.2. Aplicación Foliar de Extracto de <i>S. portulacastrum</i>	46
5.4. Diseño del Experimento.....	47
5.5. Determinación de Contenido Relativo de Agua (CRA).....	48
5.6. Determinación del Contenido de Materia Seca.....	49
5.7. Determinación de Clorofila.....	49
5.8. Determinación de Prolina Libre y Ácido Abscísico.....	50
5.9. Análisis de Datos.....	52
6. RESULTADOS.....	53
6.1. Cinética de Extracción (Sólidos Disueltos y Azúcares Totales).....	53
6.2. Prueba de Fitotoxicidad del Extracto de <i>S. portulacastrum</i>	55
6.3. Identificación de Componentes del Extracto de <i>S. portulacastrum</i>	56
6.4. Efecto del Extracto de <i>S. portulacastrum</i> en el Estrés Hídrico.....	57
6.5. Apariencia Relativa de Hidratación.....	58
6.6. Contenido Relativo de Agua (CRA).....	60
6.7. Contenido de Clorofila (a y b).....	62
6.8. Prolina.....	65
6.9. Ácido Abscísico (ABA).....	68
7. CONCLUSIONES.....	71
8. RECOMENDACIONES.....	72
9. REFERENCIAS.....	73

LISTADO DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema general descriptivo de las respuestas de osmorregulación y detoxificación asociadas al estrés hídrico en plantas de tomate.	16
2. Enrollamiento foliar y reducción de crecimiento de frutos, causado por el desarrollo de estrés hídrico en tomate roma.....	19
3. Estructura molecular de los principales osmolitos con capacidad de osmoprotección en plantas.....	23
4. Bases fisiológicas y moleculares de la tolerancia al estrés hídrico.	27
5. Ilustración de la respuesta a estrés y bioestimulantes en plantas.	29
6. <i>Sesuvium portulacastrum</i> o verdolaga de playa.	33
7. Localización geográfica de los puntos de colecta.	40
8. Arreglo y distribución de macetas con plántulas de tomate tratadas con diferentes dosis de extracto de <i>S. portulacastrum</i>	48
9. Corrida cromatográfica (LC MS-MS) y curva de regresión para la cuantificación de ABA y prolina a partir de estándares.	52
10. Cinética de extracción etanolática de sólidos a partir de biomasa de <i>S. portulacastrum</i>	54
11. Hojas de tomate expuestas a diferentes concentraciones de extracto de <i>S. portulacastrum</i> posteriores a 3 días de aspersión foliar.....	55
12. Contenido relativo de agua (% CRA) en hojas de plantas de tomate Tisey DRD 8551 sometidas a estrés hídrico y tratadas con diferentes dosis de extracto de <i>S. portulacastrum</i>	59
13. Porcentaje de materia seca de hojas de plantas de tomate con estrés hídrico inducido y tratadas con diferentes dosis de extracto de <i>S. portulacastrum</i>	60
14. Diferencias en apariencia de hojas de tomate post-exposición a estrés hídrico con PEG 6000 y tratadas a diferentes concentraciones de extracto de <i>S. portulacastrum</i>	62
15. Contenido de clorofila a (A) y clorofila b (B) en hojas de plantas de tomate con estrés hídrico inducido y tratadas con diferentes dosis de extracto de <i>S. portulacastrum</i>	64
16. Contenido de prolina libre en hojas de plantas de tomate con estrés hídrico inducido y tratadas con diferentes dosis de extracto de <i>S. portulacastrum</i> L.....	67
17. Contenido de ácido abscísico en hojas de plantas de tomate con estrés hídrico inducido y tratadas con diferentes dosis de extracto de <i>S. portulacastrum</i>	69

LISTADO DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Cambios en la fisiología vegetal e interacción planta-ambiente en función de la escala de tiempo de exposición a estrés hídrico.	17
2. Distribución de osmolitos reportados en familias de halófitas entre las plantas angiospermas.	32
3. Condiciones ambientales imperantes al momento de la colecta.	41
4. Composición de la solución nutritiva Steiner al 100% para un volumen de 200 L.	45
5. Condiciones cromatográficas para la separación y cuantificación de prolina y ácido abscísico.	50
6. Configuración del detector de espectro de masas en tándem MS-MS.....	51
7. Compuestos identificados en extracto etanolático de <i>S. portulacastrum</i> mediante barrido en GC-MS en extractos de plantas colectadas en dos localidades costeras.....	57

RESUMEN

Se indujo la condición de estrés hídrico en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv Tisey DRD 8551) para medir la actividad bioestimulante de la aspersión foliar de diferentes dosis de extracto de la planta halófito invasiva *Sesuvium portulacastrum* L. reportada como acumuladora de compuestos con capacidad de osmorregulación. El extracto se obtuvo a partir de *S. portulacastrum* de crecimiento silvestre colectado en la zona costera del municipio de Guasave, Sinaloa, México seleccionado por su contenido del ciclitol pinitol (5.5 mg g^{-1} de peso fresco). Se utilizaron condiciones hidropónicas controladas de aclimatación e inducción de estrés hídrico con polietilenglicol (PEG 6000) a -0.70 MPa de plantas en crecimiento vegetativo a las cuales se aplicaron diferentes concentraciones de extracto equivalentes a 0 (testigo PEG), 0.15 (baja), 0.30 (media) y $0.45 \text{ } \mu\text{mol}$ (alta) de pinitol por planta. Se confirmó la ausencia de daños por fitotoxicidad en condiciones de sobredosis. Las mediciones del efecto de los tratamientos en los indicadores de osmorregulación CRA (contenido relativo de agua), materia seca, deshidratación foliar, clorofila (a y b), prolina y ácido abscísico (ABA) se realizaron por 3 días para comparar el efecto de los tratamientos vs un testigo absoluto sin inducción de estrés. Se obtuvo que el estado de hidratación en las hojas asperjadas con *S. portulacastrum* a dosis de $0.15 \text{ } \mu\text{mol}$ de pinitol, presentaron la mejor apariencia de tejido en estado de turgencia al día 1 y día 3; mientras que la tendencia de los contenidos de clorofila (a y b), prolina y ácido abscísico presentaron un patrón de acumulación progresiva en respuesta al estrés y a la dosis de pinitol. La acumulación de prolina fue el indicador más significativo de este estudio, el cual incrementó de 50 a 100 veces en todos los tratamientos con estrés inducido, comparado con en el testigo que presentó una concentración de $1.3 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$. Los resultados obtenidos representan una aproximación al uso potencial de *S. portulacastrum* como bioestimulante en la reducción de los impactos por estrés hídrico en tomate; sin embargo, son necesarios estudios posteriores para su recomendación en la agricultura.

Palabras claves: halófito, pinitol, ácido abscísico (ABA), glicina betaína, prolina.

ABSTRACT

Tomato plants (*Solanum lycopersicum* cv Tisey DRD 8551) were induced to water stress condition with the objective to measure the osmoprotective effect of foliar sprayed extract of *Sesuvium portulacastrum* L. The invasive halophytic plant *S. portulacastrum* has the ability to biosynthesize metabolites that induces biostimulation, in consequence, representing a candidate to induce an osmoregulatory response and stress alleviation. The extract was obtained from wild collections from saline coastal zone of Guasave, Sinaloa based on pinitol content (5.5 mg g⁻¹ fresh weight). Water stress was induced in acclimatized tomato plants under controlled conditions for subsequent exposure to hydroponically induced stress with PEG 6000 at -0.70 MPa at stage of vegetative growth. Foliar spraying application of *S. portulacastrum* extract at different cyclitol concentration of 0 (control), 0.15 (low), 0.30 (medium) and 0.45 µmol (high) of pinitol per plant was studied after confirmation of negative phytotoxicity. Measurements of the effect of the treatments were carried out for 3 days in the osmoregulation indicators CRA (relative water content), dry matter, foliar dehydration, chlorophyll (a and b), proline and abscisic acid (ABA). As a result, 0.15 µmol of pinitol sprayed from *S. portulacastrum* extract, presented the higher hydration state of the leaves and the appearance of tissue in a state of turgidity was maintained during day 1 and 3; while in general chlorophyll (a and b), proline and abscisic acid presented a pattern of progressive accumulation in response to stress. The most significant stress indicator was the accumulation of proline (50 to 100 times in all treatments induced with PEG vs 1.3 µmol g⁻¹ in the non-stressed control). This study represents an approach to the potential use of *S. portulacastrum* as a biostimulant in agriculture to reduce water stress impact in tomato crop but further studies are needed for agriculture scale recommendation.

Key words: Halophyte, pinitol, abscisic acid (ABA), glycine betaine, proline..

1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una especie de gran utilidad como modelo de estudio de procesos biológicos de plantas de la clase de las dicotiledóneas. Por su consumo y producción, se considera la hortaliza número uno en México con un 23.2% de la producción de hortalizas en el 2018 (datos abiertos SIAP). El Estado de Sinaloa sobresale en la vocación productiva de esta hortaliza que además ocupa la posición principal en las exportaciones de productos frescos. Este cultivo, al igual que otros de manejo intensivo, presenta amenazas tanto de origen biológico como de influencia ambiental, que pueden restringir la productividad y rentabilidad, entre los factores ambientales destacan; la sequía, salinidad y temperaturas extremas, siendo estas últimas las de atención creciente.

Los factores ambientales que derivan de fenómenos multivariados de progresión a largo plazo alteran los ecosistemas y en consecuencia los procesos biológicos durante el desarrollo de los cultivos agrícolas (Rosenzweig *et al.*, 2013), lo que influye en cambios en las prácticas de producción y manejo agronómico como medida para hacer frente a este problema. El crecimiento y desarrollo normal de los cultivos se afecta por diversos tipos de estrés, tales como, salinidad, temperaturas extremas y sequía. De manera particular el déficit hídrico se desarrolla progresivamente durante temperaturas extremas, lo cual induce a cambios fisiológicos, morfológicos, bioquímicos y moleculares en las plantas (Shao *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2016). Entre los mecanismos bioquímicos asociados a la condición de desbalance hídrico se encuentra la producción de metabolitos conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS), moléculas altamente reactivas que causan la inhibición del crecimiento y reducen la tasa fotosintética, entre otras afectaciones. Ante estos estímulos, algunas plantas desarrollaron mecanismos de adaptación o aclimatación en función de los rasgos genotípicos y fenotípicos, como son la tasa de progresión, intensidad y duración del estrés, así como y de los factores ambientales que lo provoquen (Shao *et al.*, 2008). Desde un enfoque fisiológico, bioquímico y metabólico, otros factores extrínsecos como son las interacciones con el microbioma circundante representan además un factor de influencia en la capacidad de respuesta al estrés, el cual no será considerado para los propósitos del presente trabajo de investigación (Ma *et al.*, 2020).

Existen especies silvestres que presentan una fuente de variación genética, las cuales han sido

utilizadas en los programas de mejoramiento genético encaminados a caracterizar las bases genético-fisiológicas de la tolerancia a la sequía con vistas a desarrollar plantas tolerantes al estrés (Foolad, 2007). Sin embargo, los progresos logrados en este campo han sido escasos. Una de las principales respuestas al estrés hídrico es la modificación de la expresión génica, relacionada con la producción de enzimas clave en la vía de síntesis de osmolitos, proteínas con función protectora, enzimas antioxidantes, factores de transcripción y otras proteínas reguladoras de la homeostasis celular. En la presente investigación, se analizó el estrés hídrico y los efectos protectores de un extracto vegetal sobre la inducción en los compuestos orgánicos de masa molecular baja, llamados osmolitos de respuesta, los cuales se encuentran ampliamente referidos como osmoreguladores (Ashraf y Foolad, 2007).

Debido al incremento en la demanda de alimentos, se ha inducido a practicar la agricultura intensiva, necesitando atender problemas relacionados a los diferentes tipos de estrés. En los últimos años, se ha incrementado el uso de productos de bioestimulación (EBIC, 2021); dentro de los cuales se agrupan sustancias o microorganismos que funcionan como promotores del crecimiento saludable y tolerancia a los diversos estreses que impactan directamente en el rendimiento y calidad de los cultivos (du Jardín *et al.*, 2015). En ese segmento, algunos bioestimulantes que se promueven por sus beneficios a la reducción de estrés, derivan de plantas halófitas provistas de sistemas genéticos adaptados a condiciones extremas bajo el fundamento de aprovechar los componentes biológicos que acumulan en sus tejidos, como promotores de activación y protección a condiciones de estrés hídrico.

Hay un interés creciente en las plantas de naturaleza halófitas debido a su fisiología e interacción (ecto y endofítica) con la microbiología ambiental aun en condiciones de salinidad extrema (Gutiérrez-Segura, 2018; Etesami y Beattie, 2018). Fisiológicamente cuentan con mecanismos adaptativos y características que permiten su desarrollo en ambientes salinos. Estos mecanismos van desde la exclusión o acumulación de iones K^+ , compartimentalización iónica a nivel celular y de planta, biosíntesis de solutos que funcionan como osmoprotectores, cambios en la fotosíntesis, activación de sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, así como la modulación de hormonas (Jefferies, 1981; Kumari *et al.*, 2015); además, han desarrollado mecanismos adaptativos como la producción y acumulación de solutos compatibles, llamados osmolitos (Kransensky y Jonak, 2012).

Sesuvium portulacastrum L. conocida con el nombre común de verdolaga de mar, es una planta

halófito facultativa, perenne, dicotiledónea perteneciente a la familia *Aizoaceae*, esta categorizada como planta de metabolismo C3. Es una planta invasiva, perenne, rastrera, suculenta, de hojas carnosas, genera un sistema de raíces en la parte nodal, forma brotos de forma sub terete de color verdoso, rosa o rojo difuminado, sus estomas son paracíticos (Lonard y Judd 1997; Lokhande *et al.*, 2009; Luettge *et al.*, 1989). *S. portulacastrum* es una planta que tolera muy bien el estrés salino e hídrico, por lo que crece en áreas arenosas y húmedas como playas, manglares, dunas, salinas y marismas. Por lo tanto, maneja un metabolismo de protección, produciendo aminoácidos como prolina que alcanzan hasta 200 $\mu\text{mol g}^{-1}$ materia seca, además de glicina betaína (Lokhande *et al.*, 2010a, b; Slama *et al.*, 2006) y pinitol en valores que van de 9 a 58 mol m^{-3} (Luettge *et al.*, 1989).

El presente trabajo se planteó para generar información acerca del posible efecto bioestimulante osmoprotector del extracto de *S. portulacastrum*, en plántulas de tomate roma variedad Tisey DRD 8551 sometidas a estrés hídrico y que pueda formar parte en el diseño de estrategias de riego deficitario controlado que optimicen la eficiencia en el uso del agua.

Para desarrollar los objetivos del proyecto, se realizó un ensayo sobre un cultivo de tomate roma variedad Tisey DRD 8551 en el Laboratorio de Bioquímica Vegetal ubicado en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se utilizaron plantas con 60 ± 10 cm de altura, las plantas fueron divididas en cinco grupos, 2 de ellos de 24 plantas y 3 con 18 plantas: dos grupos control (absoluto y con estrés), y 3 grupos de tratamiento a diferentes dosis (baja, media y alta) y se utilizó PEG 6000 para simular condiciones de estrés hídrico a través de un potencial osmótico (Ψ_s) de -0.7 MPa, evaluando los efectos, por medio de la medición del contenido relativo de agua (CRA), ácido abscísico, prolina y los cambios en la producción de clorofila.

2. ANTECEDENTES

2.1. Estrés Hídrico

A lo largo de la evolución, las plantas al ser organismos sésiles han desarrollado diversas adaptaciones fisiológicas, que les permiten sobrevivir a los diferentes tipos de estrés, entre ellos, la sequía, que es uno de los factores ambientales que más afectan a los cultivos, según la FAO (2021ab), para el año 2050 se deberán producir alimentos para aproximadamente 10 000 millones de personas, lo cual representa un alto consumo de agua.

El estrés hídrico por sequía se produce en las plantas en respuesta a un ambiente en donde el agua es muy escasa, por lo que la tasa de respiración y transpiración son mayores a los niveles de captación de agua (Figura 1). En muchas ocasiones el estrés hídrico se combina con estrés por frío o por salinidad del suelo, lo cual genera una deficiencia mayor de agua en el citoplasma, que se representa por un desbalance o estrés osmótico (Takahashi *et al.*, 2020).

Algunas plantas poseen la capacidad de reducir la pérdida de agua, al controlar la velocidad y el área de transpiración; así como, la absorción de radiación, lo que les permite sobrevivir en condiciones de baja disponibilidad de agua, dichos mecanismos se relacionan al ajuste osmótico y a la plasticidad celular (Basu *et al.*, 2016).

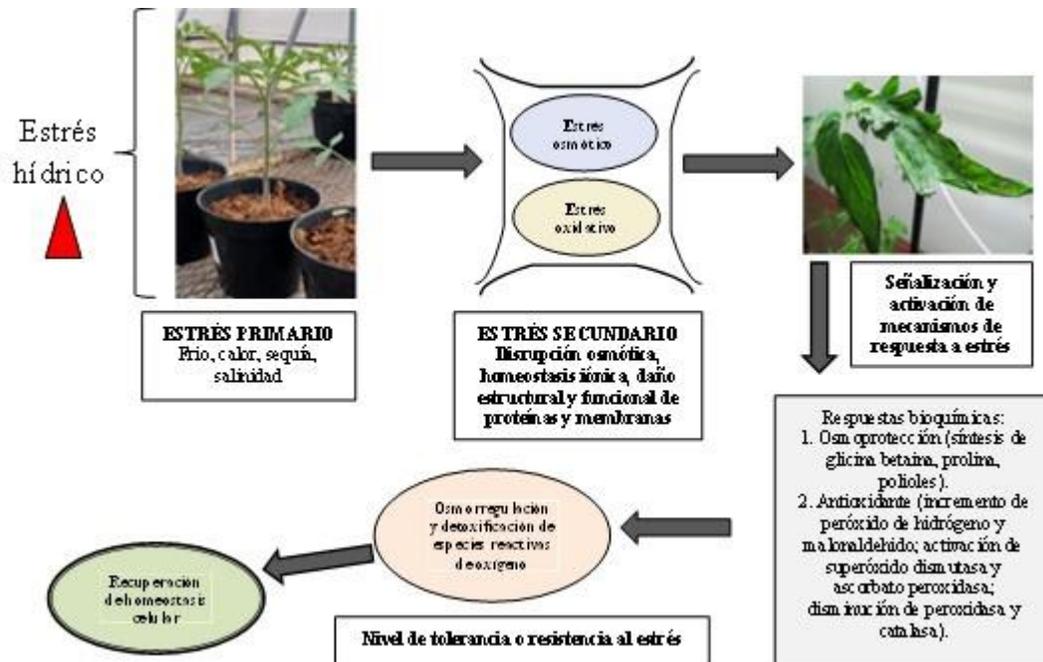


Figura 1. Esquema general descriptivo de las respuestas de osmorregulación y detoxificación asociadas al estrés hídrico en plantas de tomate (Adaptado de Gerzberg y Knatuszco-Konka, 2017).

El estrés hídrico se puede clasificar de la siguiente manera según Imadi *et al.* (2016):

- Estrés leve: corresponde a un potencial hídrico entre -0.20 y -0.80 MPa o el contenido relativo de agua (CRA) en un 8-10% respecto a plantas bien irrigadas, causa el cierre instantáneo de estomas, reduce el área foliar y la tasa fotosintética.
- Estrés moderado: corresponde a un potencial hídrico entre -0.81 y -1.49 MPa o una disminución de CRA entre un 10 y 20%, no afecta gravemente a las plantas.
- Estrés severo: disminución del potencial hídrico mayor a -1.5 MPa o disminución del CRA mayor a un 20%, reduce la densidad de flujo de volumen en la raíz, así como la asimilación de dióxido de carbono y fotosíntesis.

Durante el desarrollo de un cultivo, las plantas enfrentan una alta variabilidad en las condiciones ambientales, enfrentando retos de productividad en frente a una creciente limitación de disponibilidad de agua. Desde un enfoque crítico, los cambios repentinos en el ambiente, por ejemplo, en la temperatura y la humedad, inducen cambios fisiológicos y bioquímicos de corto plazo cuya naturaleza e intensidad dependerá de la duración temporal del estrés (Passioura, 1996).

En el Cuadro 1 se describen algunos de los principales procesos de respuesta fisiológica en asociación con la influencia del tiempo de ocurrencia del estrés y la influencia del medio ambiente; por ejemplo, las características más importantes de una especie tolerante es la fenología, los procesos de crecimiento y de desarrollo, con afectación en función de la escala de tiempo de exposición a la insuficiencia hídrica.

Cuadro 1. Cambios en la fisiología vegetal e interacción planta-ambiente en función de la escala de tiempo de exposición a estrés hídrico. Adaptado de Passioura (1996).

Escala de tiempo	En la planta	En el ambiente
Mínutos o menos	Recambio proteico (síntesis-degradación) de proteínas dañadas por funcionales, cierre estomático	Movimiento de sombras, lluvia o irrigación
Horas	Síntesis de proteínas de protección (dehidrinas o chaperonas), movimiento de hojas, marchitez, ajuste osmótico, respuesta a ABA	Demanda evaporativa diurna, reducción de disponibilidad de agua superficial del suelo, rehumidificación de la capa superficial seca del suelo
1 a 2 días	Cambios fisiológicos de aclimatación celular (acumulación de azúcares, lignificación de paredes celulares y reforzamiento de cutículas), inducción de genes constitutivos de mantenimiento celular; iniciación floral y floración	Clima (frío a calor, aire seco), reducción de agua en la superficie del suelo
3 días a semanas	Retraso en el crecimiento de la copa, senescencia de hojas, desarrollo del sistema radical	Percolación del agua a través del perfil del suelo
Semanas a meses	Afectación en el desarrollo controlado por relojes biológicos (ejemplo: vernalización, tiempo a floración), relleno de grano	Demanda de evaporación estacional, patrón de lluvia predominante

Nielsen *et al.*, (1996), propone considerar a las plantas por los requerimientos de agua en:

- Hidrófitas: sumergidas parcial o totalmente en agua, no toleran potenciales hídricos más negativos de -5 a -10 bares.
- Mesófitas: en general no toleran potenciales hídricos más negativos de -20 bares.
- Xerófitas: en general no toleran potenciales hídricos más negativos de -40 bares

2.1.1. Efectos del Estrés Hídrico

Durante el cultivo del tomate, tal como ocurre en otros cultivos de importancia económica mundial, las plantas se exponen a una combinación de estreses bióticos y abióticos, entre los abióticos la insuficiencia hídrica se considera entre las más críticas (Ximénez-Embún *et al.*, 2018). El cultivo del tomate se establece principalmente en zonas semiáridas donde los cambios climáticos y eventos de sequía ocurren con más frecuencia (Nankishore y Farrell, 2016).

El impacto del estrés hídrico produce un impacto diferencial según la etapa fenológica del cultivo, no obstante, indistintamente afecta la productividad que puede ir desde el desarrollo vegetativo menor, hasta enrollamiento de hojas, pérdida foliar, tallos delgados, floración prematura y frutos de bajo peso (Figura 2), con tendencia a un cierre apical pobre en algunos casos.

La alta sensibilidad del tomate al déficit hídrico ha propiciado que los esfuerzos de mejoramiento se dirijan a la búsqueda y desarrollo de variedades adaptadas o bien tolerantes a la sequía (Hu y Xiong, 2014). No menos importante resulta el estudio ecofisiológico de la interacción y resiliencia evolutiva de las plantas de tomate a las condiciones ambientales.

Durante el desarrollo del estrés hídrico, se ven comprometidos diferentes mecanismos bioquímicos, entre los que podemos mencionar la fotosíntesis neta, el rendimiento efectivo del fotosistema II (PSII), la tasa de transporte de electrones, la síntesis de proteínas; así como, el metabolismo de los lípidos, los cuales se comprometen y afectan la morfología de la planta (Kaur *et al.*, 2016). El calcio es un macroelemento de importancia nutricional con una función importante en la tolerancia a estrés hídrico por su función como mensajero intracelular; sin embargo, la reducción de flujo de agua afecta severamente su transporte y disponibilidad para los procesos de respuesta (Hosseini *et al.*, 2019).



Figura 2. Enrollamiento foliar y reducción de crecimiento de frutos, causado por el desarrollo de estrés hídrico en tomate roma.

Según Diplock *et al.* (1998), se producen alteraciones en el sistema antioxidante debido a que el funcionamiento de la maquinaria metabólica aeróbica genera y consume una amplia variedad de especies de oxígeno reactivas (ROS) de forma continua y controlada. Sin embargo, cuando una alta intensidad de luz se asocia a un déficit hídrico, se produce un exceso de excitación de los fotosistemas, así como una restricción de la difusión del CO_2 atmosférico al interior de la hoja en las regiones lamelares donde abundan los ácidos grasos (aprox. 75% de insaturación). Ello reduce la proporción CO_2/O_2 en el interior del cloroplasto, lo que favorece la foto reducción de O_2 por el fotosistema I. Como consecuencia, se forman ROS que producen daños oxidativos en la célula, produciendo sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA), significando la formación de hidroperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados, por lo cual la determinación de malonaldehído (MDA) es un indicador que evalúa el grado de peroxidación lipídica. Algunas ROS como son, anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilos, oxígeno en estado de singlete reaccionan muy fácilmente con las macromoléculas biológicas más importantes, desencadenando procesos destructivos oxidativos que son capaces de bloquear el metabolismo celular. Se han detectado cambios en enzimas durante el enrollamiento foliar incrementándose la actividad de antioxidantes enzimáticos como son catalasa, peroxidasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa y antioxidantes no enzimáticos como glutatión y ascorbato (Weber *et al.*, 2004).

Tal como se describió en la Figura 1, la capacidad de tolerar o resistir al déficit hídrico estriba en la plasticidad de las reacciones metabólicas de la planta para limitar o revertir los procesos complejos de intercomunicación entre las rutas moleculares y fisiológicas osmóticas-oxidativas (Da Silva y de Oliveira, 2014; Gerszberg y Hnatuszko-Konka, 2017). En general se distinguen

tres etapas en el proceso de estrés abiótico: 1) la etapa de alerta; 2) la etapa de resistencia; y 3) la etapa exhaustiva de respuesta; aunque una cuarta etapa se ha propuesto como etapa de regeneración (Rehem *et al.*, 2012). Es importante definir que estas etapas aplican exclusivamente a factores de estrés dentro del rango correspondiente de evasión o de falla fisiológica no reversible. El mecanismo inicial en todo estrés primario resulta en un daño celular y en consecuencia en la activación del estrés secundario se inician los mecanismos de respuesta para restaurar la homeostasis celular; así como, los procesos de protección y reparación del daño en proteínas y membranas.

2.1.2. Mecanismos de Defensa al Estrés Hídrico

Las plantas han desarrollado mecanismos de aclimatación ante el estrés hídrico, cuya respuesta dependerá del tiempo y el nivel de estrés; cuando el estrés hídrico se instaura de manera paulatina, la planta refleja un menor desarrollo y crecimiento, sobre todo en la expansión foliar que es sumamente importante, ya que de ella depende la fotosíntesis. Entre los cambios a nivel fisiológico se encuentra la relación parte aérea y raíz, debido a que la raíz continúa desarrollándose en busca de agua, mientras deja de crecer la parte foliar (Potters *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2008). También se activa el cierre estomático, ya que estos liberan gran cantidad de agua a la atmosfera. Este, proceso se lleva a cabo cuando las células del mesófilo son afectadas por la deshidratación e interviene el ácido abscísico (ABA) como hormona reguladora en el cierre estomático, provocando una salida de iones de K^+ de las células guarda, calculada en 4-8 veces menos (desde 400-800 mM hasta 100 mM) y de aniones Cl^- o malato²⁻ en las células guarda (Roelfsema y Hedrich, 2002).

Hay algunas plantas que realizan modificaciones en su metabolismo para guardar eficientemente el agua. Estas plantas poseen adaptaciones en su metabolismo C4 y del metabolismo CAM, que les permite desarrollarse en ambientes más áridos. En este tipo de metabolismo se genera acumulación de CO_2 en la vacuola para estar en equilibrio con la atmósfera. Así, hay una separación física entre el proceso de asimilación de CO_2 , que se produce en células del mesófilo y la reducción de éste a carbohidratos, que tiene lugar en otro tejido especializado (parénquima perivascular) donde se acumula el CO_2 .

2.1.2.1. Ajuste osmótico. Es el mecanismo clave mediante el cual las plantas se adaptan a la reducción de la disponibilidad de agua. El ajuste osmótico se estudia a través del potencial hídrico que determina la tendencia para el movimiento neto del agua en un sistema, incluido el biológico. El potencial osmótico es uno de los componentes del potencial hídrico, cuyos valores de medición reflejan la pérdida o acumulación neta de solutos (Misra y Gupta, 2005). A mayor capacidad de ajuste osmótico, mayor capacidad de las células para mantener la turgencia la cual representa otro componente del potencial hídrico y es esencial para que se mantengan los procesos de crecimiento entre otros. Este es un mecanismo importante en la tolerancia a la sequía, porque permite continuar la expansión celular, ajuste estomático y fotosintético, por lo cual contribuye en el crecimiento y rendimiento de la planta. Al desarrollarse el estrés hídrico, algunas plantas cuentan con la maquinaria genética necesaria para llevar a cabo la biosíntesis de compuestos de bajo peso molecular (osmolitos), sin afectar la funcionalidad de macromoléculas celulares (Sairam *et al.*, 2006).

De manera general, los principales compuestos que participan en el proceso de regulación osmótica son azúcares solubles, potasio, ácidos orgánicos, cloruros y aminoácidos libres, y este a su vez es promovido por el desarrollo del estrés.

2.1.2.2. Regulación osmótica. También conocida como la capacidad de mantener un estado de homeostasis o equilibrio en los sistemas celulares mediante el ajuste constante ante las condiciones de cambio internas y externas. Este sistema está mediado por sensores de los cambios en el ambiente los cuales se integran en un mecanismo de retroalimentación para producir una cascada de respuestas de ajuste en el ambiente interno y así evitar el desequilibrio o inestabilidad en las células, los órganos y los sistemas de interacción de la planta. De esta manera, se consideran mecanismos mediados por estímulos los cuales posteriormente a su percepción, se traducen en señales mediadas por un receptor, mensajeros y efectores específicos para cada respuesta biológica. Ante un déficit hídrico, se activa el proceso de osmorregulación lo que implica el balance de osmolitos para mantener un equilibrio entre solutos y agua entre los compartimentos intra e intercelulares los cuales a su vez definen el balance hídrico con el ambiente (Bhargava y Sawant, 2012). Es un mecanismo crucial de autodefensa en plantas, el cual tiene como función mantener la presión osmótica y reducir la pérdida de agua en respuesta a un estrés hídrico. La

hormona ABA es la principal involucrada en los mecanismos de cierre de estomas, homeostasis iónica, expresión de genes de respuesta a estrés y de otros cambios metabólicos. Las capacidades de auto-regulación en las plantas son de respuesta colectiva para la aclimatación, evasión o detoxificación de los factores de estrés (Isah, 2019). Concomitante a la regulación hormonal del estrés, también se presentan regulaciones epigenéticas en la expresión de las familias de genes codificantes de proteínas y de activadores enzimáticos de las proteínas involucradas en la síntesis de moléculas asociadas, entre ellos la metilación e inducción de modificaciones a nivel de histonas y otras proteínas clave en la funcionalidad del proceso de señalización.

2.1.2.3. Osmolitos. Son solutos orgánicos biocompatibles de bajo peso molecular que comprenden a una variedad de compuestos principalmente de carga eléctrica neutra que no interfieren con las reacciones del metabolismo normal celular (figura 3). Las especies de plantas tolerantes a estrés hídrico son excelentes acumuladoras de osmolitos en el citoplasma celular (en las diferentes etapas de desarrollo vegetal) donde cumplen la función de equilibrar el balance del potencial osmótico y la descompesación tónica de las vacuolas. Dichas propiedades ofrecen la ventaja de contribuir al mantenimiento de las funciones fisiológicas y de la actividad celular. Adicionalmente a la función de osmorregulación, los osmolitos cumplen funciones clave en la protección de las estructuras subcelulares contra el daño secundario que se presenta por el desequilibrio oxidativo y la alta producción de especies reactivas de oxígeno. Los osmolitos pueden clasificarse en tres categorías; polioles (azúcares como manitol, D-ononitol y D-pinitol), aminoácidos (prolina y ectoinas), y betaínas (compuestos de amonio cuaternario como la glicina betaína, β -alanina betaína, prolina betaína, colina y pipercolato betaína). No obstante, según su naturaleza química, los osmolitos pueden ser azúcares, azúcares alcohol, aminoácidos, compuestos de amonio cuaternario o compuestos de sulfónico terciario (Slama *et al.*, 2015). Existe suficiente evidencia sobre los efectos de osmoprotección que brindan dichos osmolitos ante estreses hídricos y otros de naturaleza abiótica, por lo cual ante los progresivos cambios climáticos que afectan la disponibilidad de agua, la salinización de suelos y la demanda evaporativa atmosférica, su estudio se considera de gran interés tanto con el enfoque de mejoramiento genético de cultivos de importancia alimentaria como para la búsqueda de fuentes de alto contenido por sus beneficios probados por aplicación exógena (Tarczynski *et al.*, 1993;

Heuer, 2003; Garg *et al.*, 2002; Yang y Lu, 2005; Rezahei *et al.*, 2012; Yildizli *et al.*, 2017; Ashraf y Foolad, 2007; Kahlaoui *et al.*, 2018). Las plantas de más baja tolerancia a estrés hídrico pueden acumular naturalmente compuestos osmoprotectores a niveles reducidos o bien acumularlos intracelularmente en distintos compartimentos según se demande para mantener la homeostasis celular. Los osmoprotectores suelen estar confinados al citosol, cloroplastos y otros compartimentos citoplasmáticos que ocupan el 20% o menos del volumen de células maduras, en parte también por la elevada actividad metabólica de dichos compartimentos (Takahashi, 2020).

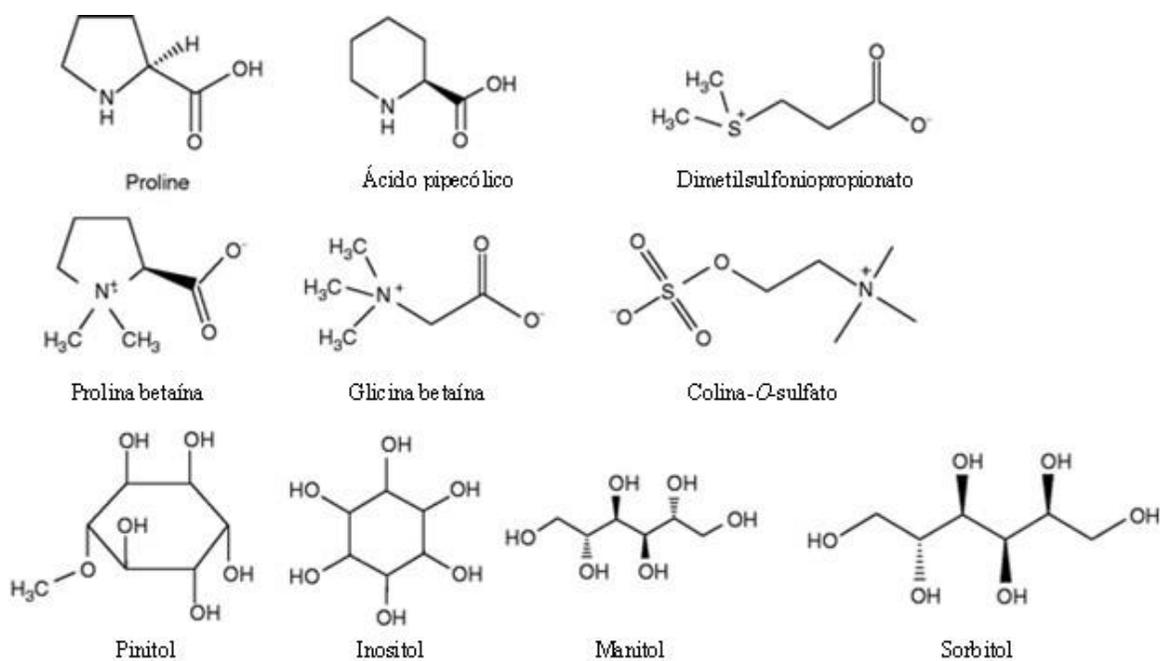


Figura 3. Estructura molecular de los principales osmolitos con capacidad de osmoprotección en plantas. Adaptado de Slama *et al.* (2015).

2.1.2.4. Pinitol. El pinitol (D-3-O-metil-qui-ro-inositol), forma parte de los compuestos osmoprotectores, encontrados en algunas plantas con mecanismos de defensa ante el estrés, también forma parte de los cilitoles, entre los que se encuentran mioinositol y ononitol (D-4-O-metil-mioinositol) (Dittrich y Brandl, 1987). El D-pinitol desempeña un papel en la sequía y el estrés por alta salinidad, los déficits hídricos inducidos por el calor, el desarrollo embrionario y la nodulación (en leguminosas). La biosíntesis de D-pinitol (1-D-3-O-metil qui-ro-inositol)

comienza con un precursor de glucosa fosfato, que se convierte en mioinositol por la acción de dos enzimas: mioinositol 1-fosfato sintasa (INPS) y mioinositol monofosfatasa (IMP) (Ishitani *et al.*, 1996). Luego, el D-pinitol se sintetiza a partir del mioinositol mediante un proceso de conversión de dos pasos (Dittrich y Brandl, 1987). En el primer paso, la mioinositol metiltransferasa (IMT) transfiere un grupo metilo de la S-adenosil-L-metionina (SAM) al mioinositol que produce D-ononitol (1-D-4-O-metilmioinositol). En el segundo paso, el D-ononitol se convierte en D-pinitol por la acción de una ononitol epimerasa y la desmetilación de D-pinitol da lugar a D-qui-ro-inositol (Ishitani *et al.*, 1996). El D-ononitol es un intermediario transitorio y se encuentra en concentraciones muy bajas durante la producción de D-pinitol (Streeter, 1985). Los genes IMT se han clonado de varias plantas entre ellas arroz silvestre (*Oryza sativa*; OsIMT), soya (*Glycine max*; GmIMT) y planta de hielo (*Mesembryanthemum crystallinum*; McIMT), en las cuales se ha reportado su expresión en respuesta a estrés osmótico (Ahn, 2011; Vernon *et al.*, 1992). La sobreexpresión de McIMT1 en tabaco y GmIMT en *Arabidopsis* incrementaron la tolerancia al estrés hídrico por sequía y salinidad, incrementando la atención sobre su función regulatoria (Sengupta *et al.*, 2008). Por otra parte, su función se asocia a la acumulación de D-pinitol, tal como ocurre en soya en respuesta al estrés por sequía (Streeter, 1985; Streeter *et al.*, 2001); el D-pinitol es un constituyente común de leguminosas. De igual manera, esta función coincide con la acumulación de pinitol en respuesta a estrés salino de la planta *M. crystallinum* perteneciente a la misma familia halófila de *S. portulacastrum* (Paul y Cockburn, 1989). El mioinositol y sus derivados son una familia de compuestos que son cruciales para el desarrollo y la señalización en las plantas. Principalmente actúan como mediadores metabólicos o participan en varias vías de señalización en respuesta al estrés, las hormonas y los nutrientes, mediante la regulación transcripcional de los genes de respuesta a estímulos. Además, los metabolitos y las vías asociadas son tan numerosas como altamente coordinadas para contribuir a la tolerancia al estrés en las plantas (Valluru y Van den Ende, 2011).

2.1.2.5. Prolina. La prolina se considera un crioprotector y forma parte del grupo de moléculas clasificadas como osmolitos u osmoprotectores. Su presencia en altas concentraciones es indicador de tolerancia a estrés, en este sentido, se ha demostrado que incrementa la tolerancia a congelación de levaduras y plantas. En plantas los niveles de prolina intracelular pueden

acumularse en respuesta a estrés ambiental, a concentraciones que superan significativamente su concentración fisiológica natural, demostrando su función clave en el proceso de adaptación-tolerancia-resistencia (Szabados y Saviouré, 2010). Dicha acumulación es un indicador de la adaptación a estrés hídrico por lo que se utiliza como criterio de selección de especies con tolerancia o resistencia sobresaliente (Arteaga *et al.*, 2020). La acumulación y compartimentalización de prolina permite a las plantas mantener bajos niveles de potencial hídrico intercelular para favorecer la retención del agua o bien la absorción cuando se encuentra disponible. La prolina cumple funciones en citosol, cloroplastos y mitocondrias, específicamente en el control de la homeostasis y la modulación de las funciones de estos organelos ante condiciones de alto potencial redox. Puede actuar como señalizador molecular de genes específicos que detonan los procesos de proliferación o muerte celular; adicionalmente la prolina cumple funciones en la reducción de la acidificación intracelular, como soluto de protección de macromoléculas ante condiciones desnaturizantes y reservorio energético disponible para las reacciones de regulación del potencial redox (Szabados y Saviouré, 2010; Kahlaoui *et al.*, 2018). La aplicación exógena en plantas en condición de estrés hídrico ha mostrado actividad biológica tanto en la prevención como en la reducción de los impactos post-estrés; sin embargo, las plantas sintetizadoras de prolina pueden producirla a partir de glutamato u ornitato, bajo la predominancia del primero como respuesta al estrés (Delauney y Verma, 1993). El control de la acumulación de prolina se realiza por una vía de la prolina oxidasa que la convierte en su precursor glutamato. En tomate, se demostró la regulación de la actividad enzimática del metabolismo de prolina en respuesta a condiciones variables de estrés hídrico (Fujita *et al.*, 2003).

Los mecanismos moleculares de como la prolina protege a las células durante el estrés no son totalmente entendidos, pero parecen involucrar sus propiedades químicas y sus efectos en los sistemas redox, como el grupo de glutatión. La función de la prolina en la adaptación al estrés a menudo se explica por su propiedad como un osmolito y su capacidad para equilibrar el estrés hídrico (Delauney y Verma, 1993).

2.1.2.6. Glicina betaína. También conocida como N,N, N-trimetil glicina, es una amina cuaternaria, aislada por primera vez de la caña de azúcar, su síntesis ha sido localizada en cloroplastos (plantas halotolerantes) acumulando grandes cantidades de acuerdo al nivel de estrés

en plantas, peroxisomas y citoplasma, se dice que en dicotiledóneas las síntesis se lleva a cabo en el cloroplasto, mientras que en monocotiledóneas ocurre en el peroxisoma (Nakamura *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2008; Mitsuya *et al.*, 2011). La glicina betaína se sintetiza en algunas plantas superiores y puede ser inducida tanto por estrés hídrico como por estrés salino, por sobreexpresión de las enzimas colina monooxigenasa (CMO) y betaína aldehído deshidrogenasa (Nakamura *et al.*, 2001). Se distribuye en todos los órganos vegetales en respuesta a condiciones de estrés, pero principalmente en hojas quizá por el impacto del estrés hídrico en la maquinaria fotosintética. Algunos factores de influencia en su distribución son la etapa de desarrollo; tal como se reporta en cebada (*Hordeum vulgare* L. Haruna-nijyo) cuya acumulación fue principalmente en hojas viejas en asociación con una activación de la enzima CMO (Nakamura *et al.*, 1996). Existe una aparente regulación asincrónica entre la síntesis de glicina betaína foliar y radicular, la raíz tiene la habilidad de sintetizar glicina betaína, siempre y cuando la expresión de CMO y betaína aldehído deshidrogenasa sea baja en comparación con las hojas. Por otro lado, en caña la betaína aldehído deshidrogenasa se sintetiza en hojas y raíces tanto jóvenes como viejas entonces concluimos que la síntesis de glicina betaína es limitada por la disponibilidad de CMO (Bhuiyan *et al.*, 2007; Fujiwara *et al.*, 2008; Yamada *et al.*, 2009). Entre las funciones de este osmolito está la de contribuir al mantenimiento del volumen celular y la de osmorregulación celular y/o fuente de aporte de grupos metilo, a través de reacciones de transmetilación (Takabe *et al.*, 2006). La glicina betaína ha demostrado proteger enzimas y membranas, así como estabilizar complejos proteína-pigmento de PSII en condiciones de estrés, por lo tanto, ayuda a mantener la actividad de la fotosíntesis (Papageorgiou y Murata, 1995; Ohnishi y Murata 2006; Murata *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008). La aplicación exógena de glicina betaína promueve la tolerancia al estrés en numerosas especies de plantas, mejorando subsecuentemente el crecimiento y rendimiento; cuando se aplica de manera foliar, se absorbe rápidamente, aún si se realizan aplicaciones dirigidas a raíz. En tomate cv PS, la aplicación foliar exógena de glicina betaína a concentración de 5 y 10 mM en plantas reducidas en frecuencia de riego, presentó un incremento en el número, tamaño de las hojas, elongación de raíces, CRA, número de flores y fruto (Rezaei *et al.*, 2012). Existe una diversa línea de abordaje de los mecanismos de respuesta al estrés hídrico desde los ámbitos de salinidad, temperatura y sequía. De manera general en la figura 4, se resumen las distintas respuestas a nivel fisiológico, bioquímico y genético.

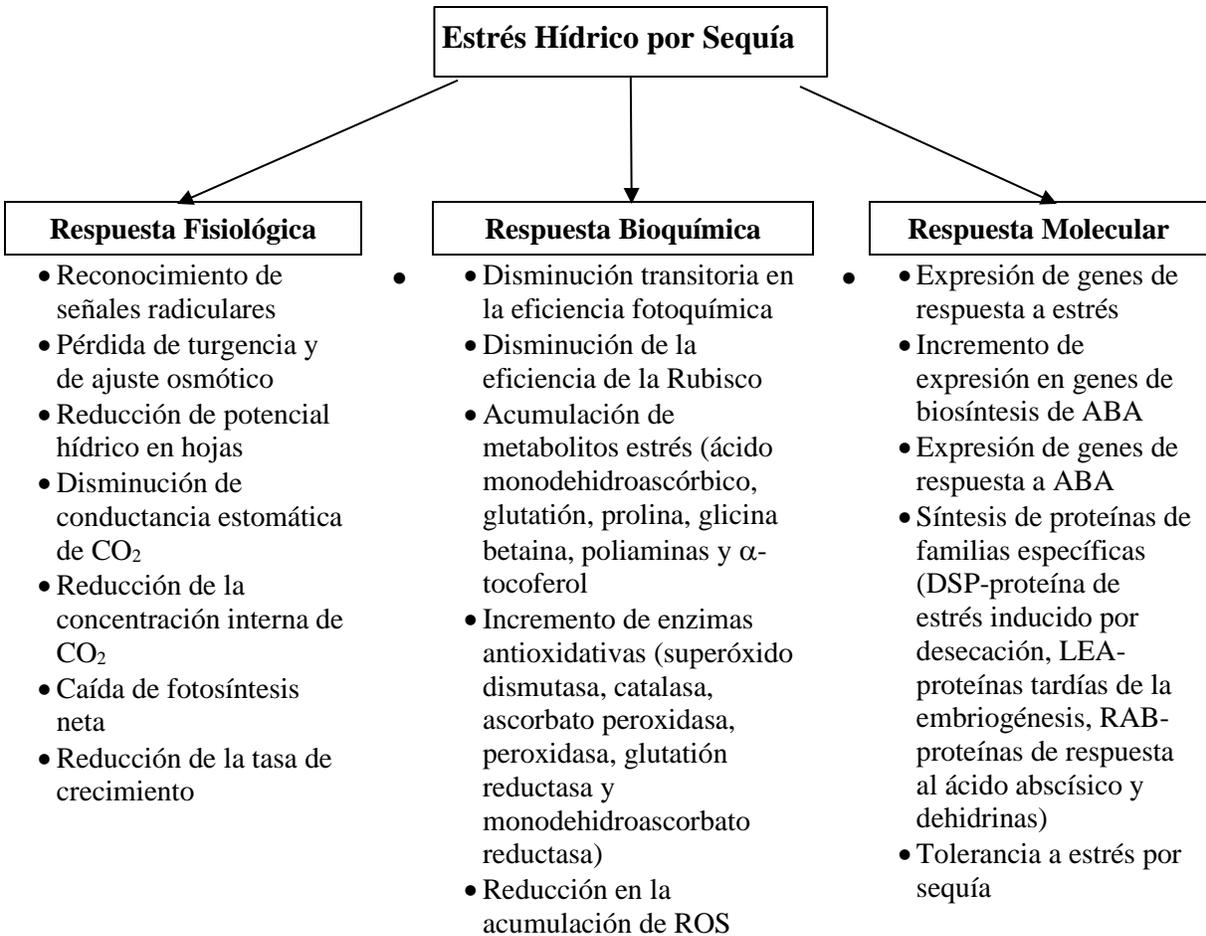


Figura 4. Bases fisiológicas y moleculares de la tolerancia al estrés hídrico.

2.1.3. Inductores de Estrés Hídrico

Para seleccionar *in vitro* plantas tolerantes a déficit hídrico es necesario simular este tipo de estrés. Como agentes inductores de estrés a nivel de laboratorio se usan sustancias denominadas osmoestresantes que al incorporarse a los medios de cultivo disminuyen su potencial osmótico, retienen las moléculas de agua y dificultan su absorción por parte de los tejidos vegetales. De esta manera se puede inducir en las plantas una sequía fisiológica. Algunos ejemplos de sustancias osmoestresantes son el manitol, sorbitol, sacarosa y polietilenglicol (PEG). De todas ellas, la última es una de las más empleadas (Rai *et al.*, 2011).

Diversas investigaciones han propuesto el uso de PEG 6000, para la inducción de estrés hídrico,

en forma de % (P/V); así como su equivalencia en potencial osmótico (ψ), expresado en MPa medidos mediante un osmómetro; sin embargo, a falta de éste se puede recurrir al modelo sugeridos por Michel y Kaufmann (1973), expresado de la siguiente manera:

$$\varphi S = -(1.18 \times 10^{-2})C - (1.18 \times 10^{-4}) C^2 + (2.67 \times 10^{-4})CT + 8.39 \times 10^{-7} C^2 T$$

Donde:

φS = Potencial osmótico (MPa)

C: Concentración de PEG 6000 ($\text{gKg}^{-1} \text{H}_2\text{O}$)

T: Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

2.2. Bioestimulante

Este término define a toda sustancia bioquímica o microorganismo que funciona como señalizador, activador de mecanismos biológicos, y promotor del desarrollo y crecimiento vegetal (Sharma *et al.*, 2013; du Jardin, 2015); en consecuencia, confiere a las plantas una tolerancia al estrés y resistencia a enfermedades (figura 5). Se le conocen también como bioefectores y su uso se ha difundido ampliamente a escalas comerciales por sus beneficios en el manejo de cultivos de importancia económica, por sus beneficios de promoción de crecimiento o por sus confirmadas funciones de protección ante las condiciones indeseables del ambiente (Van Oosten *et al.*, 2017). Algunas investigaciones en el área agrícola se han dirigido al incremento en la rentabilidad, restándole importancia en muchas ocasiones a la calidad del producto y al uso racional de los recursos naturales. Sin embargo, se ha propiciado un cambio de paradigma donde se privilegian además de la rentabilidad, la calidad de la alimentación, la producción sustentable, el aprovechamiento de los recursos y la restauración de los suelos (Viscarra-Rossel y Bouma, 2016).

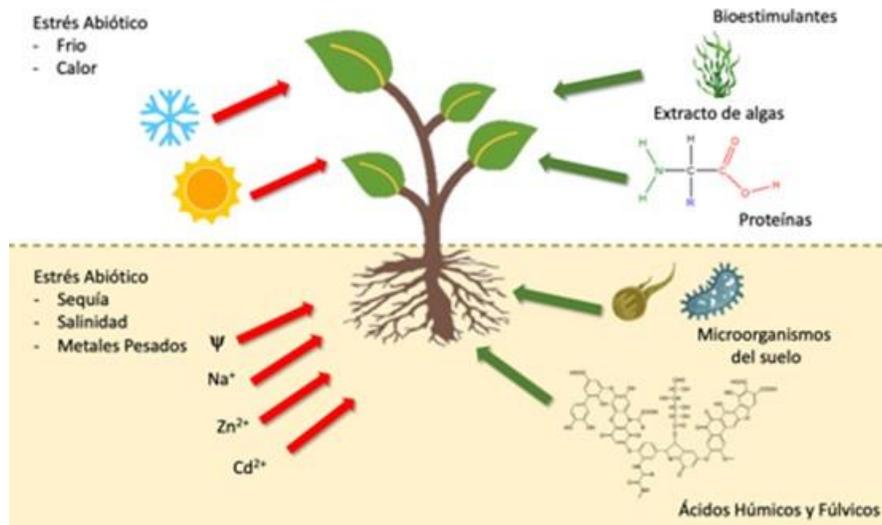


Figura 5. Ilustración de la respuesta a estrés y bioestimulantes en plantas (modificado de Van Oosten *et al.*, 2017).

2.3. Plantas Halófitas

Las plantas extremófilas, en particular las halófitas, aún permanecen en gran parte inexploradas y subutilizadas a pesar de su alto potencial como fuente de materias primas industriales como antioxidantes naturales en industrias relacionadas con productos farmacéuticos, cosméticos e ingredientes funcionales. Los halófitos marinos pueden crecer en lugares extremos, como las marismas, caracterizados por varias restricciones abióticas como alta salinidad, sequía, calor, frío y luminosidad. Para soportar esas condiciones, estas plantas están equipadas con potentes sistemas antioxidantes compuestos por enzimas y metabolitos secundarios altamente bioactivos, como compuestos fenólicos y alcaloides, con efectos terapéuticos beneficiosos para la salud humana (Ksouri *et al.*, 2008; Rahman *et al.*, 2021). De manera natural, además almacenan osmolitos de protección a las condiciones extremas de baja disponibilidad de agua, pero además para la bioprotección del aparato fisiológico fotosintético y reproductivo. Se clasifican de manera amplia en halófitas obligadas y halófitas facultativas. *S. portulacastrum* o también conocida como verdolaga de mar, es una halófito facultativa de naturaleza suculenta y utilizada como remediador de suelos por sus propiedades secuestrantes de metales pesados y compuestos tóxicos (Ghnaya *et al.*, 2005; Ghnaya *et al.*, 2007; Lokhande *et al.*, 2012; Uddin *et al.*, 2020).

Las plantas halófitas crecen en ambientes inhóspitos a cualquier otra especie vegetal de importancia alimentaria. En esas condiciones, la concentración extrema de sales provoca la acumulación de niveles de iones de alta toxicidad. Intrínsecamente, esta acumulación conduce a anomalías en la fisiología de las plantas, principalmente regidas por el daño oxidativo en los organelos y compartimentos celulares por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto como consecuencia de los desbalances iónicos, afectación del intercambio gaseoso, pérdida de homeostasis hídrica y alteraciones en las rutas metabólicas (Rahman *et al.*, 2021).

2.3.1. Procesos Adaptativos en Plantas Halófitas

El proceso adaptativo de este tipo de plantas, ocurre debido a la coordinación entre los procesos fisiológicos, los cambios metabólicos y la expresión de genes, sus estrategias de supervivencia incluyen mecanismos tales como: exclusión o acumulación de iones, apertura y cierre de estomas, compartimentalización iónica a nivel celular y de la planta en general, biosíntesis de solutos compatibles y osmoprotectores, cambios en la fotosíntesis, activación de sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, e inducción y modulación de las hormonas vegetales, entre otras (Gutiérrez-Segura, 2018). La mayoría de las especies de esta familia presentan características de tipo xeromórfico que les permiten desarrollarse en ambientes extremos y cambiantes; incluso favoreciendo su crecimiento reproductivo que incluye floración tardía y vitalidad de flores, polen y semillas; lo anterior como resultado de un proceso adaptativo que les ha permitido optimizar los mecanismos de nutrición durante el crecimiento vegetativo y la alteración hormonal (Yuang *et al.*, 2019). Los mecanismos fisiológicos asociados a esta adaptación de halófitas se pueden dividir en los siguientes:

a) La exclusión de sales es un mecanismo de hidro-halófitas y algunas freatófitas que poseen la habilidad de excluir la absorción de sodio por raíces mediante un mecanismo tipo ultrafiltración y cuando se absorbe, no se transloca a tejidos vegetativos en crecimiento donde el sistema fotosintético se encuentra muy activo. Para ello, están provistas de barreras apoplásticas en las células de la epidermis y endodermis de raíces que obstruyen el flujo masivo de iones durante el proceso de transpiración. Aun se dirigen esfuerzos para conocer los mecanismos que regulan la

ultrafiltración del sistema radicular, ya que representan una oportunidad para dirigir los programas de mejoramiento genético a la reducción del impacto de la salinización de suelos en la agricultura.

b) La secreción de sales, este mecanismo particularmente de las recretohalófitas que consiste en la eliminación de sales por la vía de exudación de glándulas especializadas (glándulas de sal) presentes en las hojas y tricomas, de esta manera mantienen un estado de regulación de la homeostasis iónica celular. Las glándulas de sal son células que están rodeadas de cutículas engrosadas provistas de un gran número de plasmodesmos y mitocondrias, pero sin presencia de cloroplastos. Algunos iones secretados por las glándulas de sal son Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Cl^- , Br^- , I^- , SO_4^{-2} , PO_4^{-3} y NO_3^- , dependiendo del ambiente. Si bien, los tejidos con glándulas de sal pueden sufrir toxicidad derivada de los cristales de sal que se secretan en la superficie de los brotes, en otro enfoque puede representar parte del mecanismo de secreción y recirculación ya que el desprendimiento de los tejidos muertos o viejos retorna las sales al suelo.

c) La succulencia, es otro mecanismo de regulación homeostática de halófitas y se considera la principal estrategia de las plantas de la familia *Aizoaceae*. Desde el enfoque de evasión, este mecanismo contrarresta la concentración total de iones en el protoplasma con el incremento progresivo de retención de K^+ , iones que coexisten con osmolitos de protección como prolina, glicina betaína e inositoles, entre otros (Cuadro 2). Esa capacidad está presente principalmente en las células de parénquima las cuales utilizan un mecanismo de reducción de la actividad de los canales de vacuolas ante la exposición a los ambientes salinos. La retención superior de K^+ se encuentra más asociada a una actividad de inactivación de radicales libres por mecanismos de la ruta antioxidativa no-enzimática lo que hace posible la evasión del daño por la acumulación por secuestro de sodio en las vacuolas de células de parénquima. Otras plantas halófitas que comparten este mecanismo son *Salsola drummondii*, *Achras sapota* y *Sarcocornia fruticosa* (Zeng *et al.*, 2018; Rahman *et al.*, 2021).

d) Otros mecanismos individuales o concomitantes son el ajuste osmótico, los cambios en rutas fotosintéticas, redistribución generalizada de sales, simbiosis microbianas, entre otros mecanismos en descubrimiento y evolución (Sairam *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2020; Rahman *et al.*, 2021).

Cuadro 2. Distribución de osmolitos reportados en familias de halófitas entre las plantas angiospermas. Adaptado de Slama *et al.* (2015).

Orden	Familia	Osmolitos
<i>Monocotyledoneae</i>		
Poales	Cyperaceae	Sacarosa
	Juncaceae	Sacarosa*
	Poaceae	Sacarosa*, prolina*, bajo nivel de glicina betaína
<i>Dicotyledoneae</i>		
Alismatales	Cymodoceaceae	Prolina, glicina, inositol
	Juncaginaceae	Prolina, pipecolato, fructosa, maltosa, sacarosa
	Posidoniaceae	Prolina, glicina, sacarosa
	Zosteraceae	Prolina, sacarosa
Asterales	Asteraceae	Prolina, glicina betaína, mio-inositol, sacarosa
Brassicales	Brassicaceae	Prolina*, sacarosa*
Caryophyllales	Aizoaceae	Prolina*, mio-inositol, ononitol, pinitol, glicina betaína
	Amaranthaceae	Glicina betaína* o prolina, compuestos "onio" metilados (amonio y sulfonio)*, azúcares
	Frankeniaceae	Glicina betaína
	Plumbaginaceae	β -Alanina betaína*, colina- <i>O</i> -sulfato*, prolina, pipecolato, sacarosa, glicina betaína en pocas especies
	Portulaceae	Prolina
Fagales	Casuarinaceae	Prolina
Lamiales	Acanthaceae	Glicina betaína
Malpighiales	Rhizophoraceae	Prolina, sacarosa
Myrtales	Combretaceae	Manitol
	Myrtaceae	Prolina (análogos), prolina metilada
Plantaginales	Plantaginaceae	Sorbitol*, prolina, ramnosa
Rosales	Fabaceae	Prolina, glicina betaína, pinitol, azúcares
Solanales	Solanaceae	Glicina betaína

* Osmolitos predominantes en la familia correspondiente.

2.4. *Sesuvium portulacastrum*

Sesuvium portulacastrum, es una especie vegetal de la familia *Aizoaceae*, usualmente crece en ambientes salinos como playas, manglares, dunas y marismas. Es una planta suculenta, halófito facultativa, crece en ambientes con baja y alta concentración de sales, de crecimiento perenne,

naturaleza rastrera, produce rizomas en forma de yemas adventicias en la región nodal de los tallos subterráneos, desarrolla hojas simples de estructura succulenta y de estomas paracíticos (figura 6). La planta produce durante todo el año flores de color rosa a púrpura y muy rara vez blancas, sus frutos son circuncidados (cápsula) conteniendo pequeñas semillas lisas de color negro, cada fruto produce 50 semillas por cápsula (Lonard y Judd, 1997; Lokhande *et al.*, 2009; Luettge *et al.*, 1989). Variaciones en la cantidad de luz, temperatura y salinidad causan una pobre germinación por eso el método de propagación es por estolones (Martínez *et al.*, 1992).



Figura 6. *Sesuvium portulacastrum* o verdolaga de playa: a) planta rastrera; b) flor, hojas, estolones y rizomas; c) semillas.

Los datos emergentes sobre la adaptabilidad de las plantas expuestas a varios factores abióticos revelan que *S. portulacastrum* mantiene su crecimiento mediante el secuestro de iones salinos y metales pesados en las vacuolas para mantener el equilibrio osmótico entre la vacuola y el citoplasma (Messedi *et al.*, 2004; Ghnaya *et al.*, 2005; Ghnaya *et al.*, 2007; Ramani *et al.*, 2006; Moseki y Buru 2010). Se ha logrado destacar su importancia en la desalinización, fitoremediación y protección al ambiente, mediante el conocimiento de los mecanismos del comportamiento halófito, así como la señalización metabólica para el manejo del estrés.

Las plantas de la familia *Aizoaceae* acumulan gran cantidad de prolina y aminoácidos a menudo contribuyen a osmoprotección, cuando se exponen a estrés osmótico. En comparación con otras

plantas *S. portulacastrum* apareció como un alto acumulador de prolina, con niveles que alcanzan 300 mmol g⁻¹ hoja, base seca (Slama *et al.*, 2006). En adición a la producción de prolina a una mayor salinidad también provoca una mayor acumulación de glicina betaina (Lokhande *et al.*, 2010).

En un estudio realizado en *S. portulacastrum* los niveles de prolina y pinitol aumentaron considerablemente en la estación seca, los valores medidos fueron para prolina de 5 a 53 mol m⁻³ y pinitol de 9 a 58 mol m⁻³ en tiempo de lluvia y seco, respectivamente (Luetge *et al.*, 1989).

A partir de la glucosa-6-fosfato, se obtiene mionositol y, este funciona como precursor de pinitol (Vernon *et al.*, 1992). La aplicación exógena de mioinositol de origen sintético vía foliar en *Capsicum annuum* sometido a sequía, demostró su potencial como inductor de tolerancia a dicho estrés (Yildizli *et al.*, 2017). Las condiciones experimentales de prueba fue la comparación de la acumulación de indicadores de daño del estrés (físicos, químicos y bioquímicos) en plantas testigo absoluto no expuestas a sequía (riego diario) vs plantas con 7 días sin riego (testigo) sin y con tratamiento a tres dosis de mioinositol (5, 15, 25 µM). Las plantas tratadas a dosis de 15 y 25 µM presentaron un claro efecto sobre los indicadores de daño (H₂O₂, daño en membrana, prolina y la actividad de catalasa). Adicionalmente, otros indicadores favorecidos, fueron el contenido relativo de agua y la movilidad de calcio, por lo que los autores plantearon la hipótesis de que la aplicación exógena de mioinositol es una alternativa para reducir el daño por estrés hídrico en plantas, así como plantean la necesidad de estudios posteriores para una mejor comprensión de la ruta de señalización que induce la producción de osmoprotectantes bajo la condición descrita.

2.5. El Cultivo de Tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las Solanaceas, género *Solanum* cuya importancia económica reside en su aportación nutricional, económica y cultural en varias regiones del mundo. Es originaria del continente americano y México, es el principal productor a nivel mundial con una producción de tomates rojos (jitomates) estimada para el 2021 de 3,409,224 ton y una superficie sembrada de 23,333 ha (datos abiertos SIAP). Los estados de mayor producción en México son Sinaloa, Sonora y Michoacán, éste

último con un incremento notable del año 2020 al 2021. Sinaloa encabezó la producción de las entidades federativas con un 60% de la producción nacional cuyas variaciones en volumen de cosecha están asociadas a la estacionalidad de las siembras. Derivado de lo anterior, el sistema productivo del tomate en Sinaloa representa una gran fuente de empleo y en consecuencia, influye en la economía a los distintos niveles de la cadena. No obstante, la agricultura de Sinaloa atraviesa recurrentemente por eventos climatológicos desde leves hasta extremos que comprometen la actividad productiva del estado. Tal es el caso de la reducción en la disponibilidad de agua que presiona por alternativas sustentables de producción de alimentos; a esta condición de escasez de agua, se le suman problemas de gestión del recurso y de baja eficiencia en los sistemas de riego convencionales (IICA, 2015).

El tomate es la principal hortaliza cultivada, tanto a cielo abierto como bajo condiciones protegidas (malla sombra e invernadero), en todo el mundo. Aunque, la producción bajo invernadero tiene varias ventajas sobre la producción a campo abierto: Mayor eficiencia en el uso de agua, tierra y fertilizantes, ampliación y ajuste de la temporada de siembra y cosecha, de acuerdo con la demanda del mercado. Al tener un mejor control en las variables ambientales y agronómicas, la producción en ambientes controlados favorece una mejora en la calidad y cantidad del producto a la obtenida bajo sistemas de producción abierto (Flores *et al.*, 2007). La crisis del agua es un problema latente en la agricultura, por lo que se requiere la innovación de los sistemas hídricos y de la gestión de un uso eficiente, por lo que este recurso se ha convertido en una gran limitante en la producción sostenible de alimentos (Rijsberman, 2006). El agua de riego para el cultivo de tomate varía en función de las regiones ecogeográficas, variedad del cultivo, estructura y capacidad de retención de humedad del suelo (Flores *et al.*, 2007). La eficiencia del riego y del uso racional del agua son prioridad en la producción agrícola y en el cuidado del medio ambiente, aunado a la creciente escasez de este recurso natural (Dinar, 2016). Ante esta problemática se ha recurrido a diversas estrategias para mejorar la eficiencia del riego, como el riego deficitario, el riego parcial de raíz y el uso de sustancias con actividad antitranspirante para reducir la pérdida por evapotranspiración de las estructuras vegetativas de los cultivos. En el cultivo de tomate el riego deficitario tiene un costo-beneficio ya que reduce el rendimiento de fruta, pero por otra parte aumenta significativamente algunos aspectos de calidad como los sólidos solubles totales, la vitamina C y los ácidos orgánicos del fruto; además en contraparte permite un uso eficiente del recurso hídrico (Tamayo-Ruiz *et al.*, 2020). Estas

condicionantes en disyuntiva, requieren de un análisis más profundo en cuanto a seguridad alimentaria y medio ambiente.

El cultivo del tomate es susceptible a afectaciones causadas por factores abióticos y bióticos, entre los primeros los que conducen a las plantas a diferentes niveles de estrés como los desórdenes fisiológicos causados por bajas temperaturas, suelos salinos y déficit hídrico. La susceptibilidad de los cultivos difiere en su etapa vegetativa, reproductiva y en la fruta posterior a la cosecha; el cultivo del tomate es diferencialmente susceptible a ambientes no favorables; es susceptible a heladas, medianamente tolerante a calor y salinidad, pero de baja tolerancia a la sequía, pese a que posee mecanismos de defensa. No obstante, cuando las condiciones sobrepasan los umbrales de tolerancia, el cultivo presenta desde afectaciones leves hasta severas. Los esfuerzos de mejoramiento genético a través de estrategias transgénicas con la inserción de genes como la secuencia codificante del disacárido trehalosa *TPSI* (trehalosa-6-fosfato sintasa) de *Saccharomyces cerevisiae* (Cortina y Culiáñez-Macia, 2005), que sintetiza la enzima trehalosa-6-fosfato sintasa, así como la aplicación exógena de osmolitos como lo son glicina betaína a una concentración de 5 a 10 mM, aumentando el contenido relativo de agua en las hojas, así como el incremento de hojas, número de flores y rendimiento (peso y talla) de fruto (Rezaei, 2012).

Según Ragab *et al.* (2018), las plantas de tomate no acumulan de manera natural glicina betaína, ya que carecen de la ruta biosintética para dicho osmolito. Esta condición de la especie fue planteada por Yang y Lu (2005) como una ventaja ya que puede utilizarse la aplicación exógena de glicina betaína para evaluar su posible utilidad como inductor de tolerancia al estrés. Se cuentan con reportes controversiales alrededor de la función inductora de tolerancia de la glicina betaína, no obstante, en tomate tuvo un efecto de inducción de tolerancia a condiciones de estrés hídrico (salinidad y sequía), tal como lo reportan (Makela *et al.*, 1998ab; Heuer, 2003). No obstante, reportan que la concentración umbral de efecto positivo es de 100 mM, ya que dosis superiores, causaron toxicidad en planta (quemaduras de hoja). Ragab *et al.* (2018) investigaron la efectividad de la aplicación foliar de 4 dosis (0, 5, 10 y 20 mM) de glicina betaína para reducir el estrés hídrico de plantas de tomate híbrido “Marwa” cultivadas en suelo arenoso y campo abierto con eficiencia hídrica de 100, 85, 70 y 55% de ET_0 (evapotranspiración de referencia de una estación climática). En dicho estudio se reportó que la reducción en la disponibilidad hídrica redujo significativamente el crecimiento vegetativo, los pigmentos fotosintéticos (carotenoides, clorofilas a y b) el contenido relativo de agua en tejido foliar, el número de flores y frutos por

planta. No obstante, las aplicaciones exógenas de glicina betaína redujeron el efecto negativo del estrés hídrico, principalmente la dosis de 10 mM la cual puede ser una estrategia para subsanar la influencia de reducir el 15% de la suficiencia hídrica (85% ET₀).

Por lo anterior, se planteó el presente trabajo de investigación, donde se utilizaron plantas de tomate como modelo de estudio de las propiedades de extractos de *Sesuvium portulacastrum* aplicados exógenamente vía foliar como inductor de respuestas bioquímicas de tolerancia a condiciones simuladas de estrés por sequía.

3. HIPÓTESIS

1. El extracto de *Sesuvium portulacastrum* acumula el metabolito osmoprotector D-pinitol.
2. Plantas de tomate en etapa vegetativa presentan una condición de respuesta fisiológica cuando se induce estrés hídrico mediante el uso de PEG 6000.
3. La aplicación foliar de extracto de *S. portulacastrum* presenta propiedades de inducción fisiológica para reducir el efecto del estrés hídrico en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en alguna de las dosis evaluadas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto osmorregulador de la aspersion foliar de extractos de *Sesuvium portulacastrum* L. a diferente concentración de pinitol, en plantas de tomate (*Solanum lycopersicon*) sometidas a condiciones de estrés hídrico.

4.2. Objetivos Específicos

1. Identificar los compuestos con potencial actividad de bioestimulación osmorregulatoria de colectas de plantas de *Sesuvium portulacastrum* L. mediante el barrido GC/MS.
2. Cuantificar la concentración de osmolitos de importancia biológica de extractos de *Sesuvium portulacastrum* L. y su capacidad de osmorregulación de plantas sometidas a estrés hídrico.
3. Evaluar el efecto de la inducción de estrés hídrico en tomate y la dosis de aplicación foliar de extractos de *Sesuvium portulacastrum* L. en la respuesta fisiológica de variables como acumulación de clorofila, prolina y ácido abscísico.
4. Valorar el uso potencial de *Sesuvium portulacastrum* L. como bioestimulante de la fisiología vegetal de tomate sometido a estrés hídrico.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Localización del Áreas de Colecta de *Sesuvium portulacastrum* L.

La localización geográfica de los puntos de colecta de material de *S. portulacastrum* L. (hojas, estolones y raíz) se estableció en 2 diferentes zonas costeras del estado de Sinaloa identificadas como Buenavista, Guasave y Nuevo Altata, Navolato Sinaloa. La elección de los puntos de muestreo se fundamentó en: la existencia de dunas y marismas y la presencia predominante de la especie invasora. Con estas consideraciones, se eligieron dos localidades, cuya localización georreferenciada y la vista en Google Maps se pueden observar a detalle en la figura 7. Se detallan además las condiciones ambientales promedio de ambas localidades en el cuadro 3.

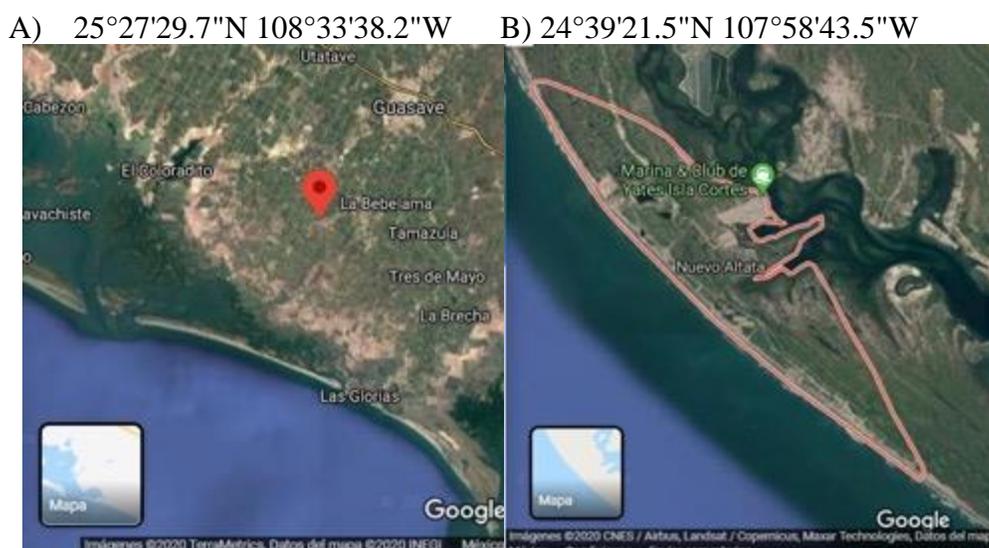


Figura 7. Localización geográfica de los puntos de colecta A) Buenavista, Guasave, Sinaloa. B) Nuevo Altata, Navolato, Sinaloa.

Cuadro 3. Condiciones ambientales imperantes al momento de la colecta.

Condición	Buenavista, Guasave	Nuevo Altata, Navolato
Tipo de suelo	Regosol, Litosol, Yermosol	Regosol
Temperatura	Máx. 33-35 °C Mín. 22-24 °C	Máx. 28-30 °C Mín. 22-26 °C
Sensación térmica	37 °C	29 °C
Humedad Relativa	46 %	82 %
Velocidad del viento	19 Km/h	16 Km/h

Las muestras obtenidas se estudiaron en el laboratorio de Bioquímica Vegetal ubicado en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). A la recepción, se retiró la tierra-arena residual de la cosecha, se realizó un lavado con jabón y un enjuague abundante con agua potable. Se dejó a secar por escurrimiento sobre papel absorbente y se guardaron submuestras de 200 g de tejido vegetal en bolsas plásticas para posteriormente, resguardar una parte del material en congelación a -40 °C y otra en refrigeración de 4° C a 12° C para su uso posterior.

5.2. Preparación de Extracto de *S. portulacastrum*

Se preparó el extracto de *S. portulacastrum* con una solución de ácido láctico 1.5% en etanol 3% (v/v). Se realizaron pruebas preliminares para obtener la proporción masa:volumen más adecuada para hacer el proceso de extracción factible y práctico, se seleccionó la proporción 1:5 (w/v) como la más adecuada en términos de fluidez en la filtración (datos no mostrados). El uso de etanol y ácido láctico como co-diluyentes se seleccionaron con base en una prueba de extractabilidad de sólidos durante 4 horas de proceso de extracción. Por la naturaleza de los sólidos esperados para

el arrastre en la extracción, la eficiencia del uso de co-diluyentes se determinó mediante la medición gravimétrica de sólidos disueltos totales (SDT) y espectrofotométrica de los azúcares totales (AT) por el método de antrona (Yemm y Willis, 1954). La preparación del extracto se realizó a partir de 50 g de biomasa completa *S. portulacastrum* y 200 mL de cada solución de extracción correspondiente, se realizó una molienda mecánica con una licuadora industrial marca Waring Blender 7010G Modelo WF2211212, en 2 intervalos de 1 min cada uno. Se tomaron muestras a los tiempos 0, 1, 2, 3 y 4 h para construir la cinética de extracción y determinar las horas de proceso con mayor arrastre de sólidos. La cuantificación de los indicadores de eficiencia de extracción se realizó sobre muestras filtradas con papel filtro whatman no. 1 y se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta su análisis.

5.2.1. Eficiencia de Extracción

Para la medición de SDT, se colocaron charolas de aluminio en el horno a 105 °C durante 24 h hasta peso constante, posteriormente después de este tiempo, se tomaron las muestras refrigeradas, se ambientaron a 25 °C, para posteriormente agitarlas vigorosamente y centrifugarlas a 5000xg durante 10 min a 25 °C. Se pesaron 2 mL del sobrenadante en las charolas (secas y debidamente taradas como corresponde a un ensayo gravimétrico), se secó a 60 °C durante 24 h en el horno, se enfrió y registró el peso el cual primeramente se corrigió el con peso del mismo volumen de solución extractante y posteriormente se convirtió en % mediante el algoritmo descrito por el APHA (2012).

$$\%SDT = \frac{\text{peso seco} - \text{peso constante} * 100}{\text{peso muestra liquida}} .$$

Los AT se midieron por el método de antrona descrito por Yemm y Willis (1954). Se tomaron las muestras refrigeradas, se ambientaron a 25 °C, para posteriormente agitarlas vigorosamente y centrifugarlas a 5000xg durante 10 min a 25 °C, se tomaron 20 µL de sobrenadante y completó

el volumen a 500 μ L con agua destilada en un tubo de ensayo, se añadió 1 mL de solución de antrona al 0.2% en ácido sulfúrico, se colocaron los tubos en baño maría a 100 °C durante 15 min, posteriormente se dejaron enfriar en una campana de extracción. Se midió la absorbancia a 620 nm, en un espectrofotómetro de UV-visible (Cary 60, Agilent), para la cuantificación se realizó simultáneamente una curva de calibración de 0 a 80 μ g con un estándar de glucosa (Sigma®).

5.2.2. Prueba de Fitotoxicidad del Extracto de *S. portulacastrum* L.

Se realizó previo al establecimiento del experimento en plantas de tomate Cuauhtémoc (Harris Moran) en etapa productiva cultivadas en invernadero. Se aplicaron diferentes dosis de extracto de *S. portulacastrum* por vía foliar. La proporción de extracto en las soluciones de aspersión foliar utilizadas fueron de 100, 200, 300, 400, 500 y 600 mL/L cada una por triplicado a cobertura total de las plantas y las evaluaciones del daño se hicieron a los 3 días posteriores a la aplicación. Para evaluar el efecto tóxico se utilizó la siguiente escala de fitotoxicidad del Consejo Europeo de Investigaciones en Malezas (European Weed Research Council o EWRC, por sus siglas en inglés).

Escala EWRC para tolerancia de las plantas:

- 1 No hay efecto
- 2 Efectos muy leves: algún retraso y amarillamiento apenas visible
- 3 Efectos leves: retraso y amarillamiento obvios; efectos reversibles
- 4 Clorosis substancial y/o retraso: muchos efectos probablemente reversibles
- 5 Fuerte clorosis/retraso; adelgazamiento de tallo
- 6-8 Incremento gradual severidad del daño
- 9 Todas las plantas muertas

5.2.3. Identificación de Componentes por Barrido Cromatográfico GC/MS

Con la finalidad de identificar ciclitoles y asignarles identidad en el extracto de *S. portulacastrum*, se realizó un barrido espectral utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 7890B con analizador de trampa de iones (GC-IT/MS), con puerto de inyección split/splitless y columna capilar DB-17 MS de 30 m x 0.25 mm x μm , bajo las siguientes condiciones: 250°C de temperatura de inyector, 100 - 300°C de temperatura de horno, 250°C y helio como gas cargador a un flujo de 1.0 $\mu\text{L min}^{-1}$ en modo pulsed splitless. Los espectros de masas se obtuvieron mediante el software MS Workstation versión 6.5 y comparados con la biblioteca del equipo (NIST 2011b Mass Spectral Library usando la búsqueda NIST MS, o la probabilidad basada en el formato de búsqueda por coincidencia como parte de tecnologías Agilent estación de trabajo MS Software Versión 7.0.1).

5.2.4. Cuantificación del Osmolito Pinitol en Extracto

La cuantificación de ciclitoles de importancia biológica (mioinositol, ononitol y pinitol), se basó en el pinitol identificado y cuantificado como base para la preparación de las soluciones y dosis de estudio. El ensayo se realizó por cromatografía de gases con el método de derivatización a acetatos de alditol de Albersheim *et al.* (1967), que consistió en la hidrólisis de la muestra con 500 μL de ácido trifluoroacético (2 N conteniendo 50 μg de mioinositol como estándar interno, toda vez que no se detectó dicho ciclitol en el extracto) durante 1 h a 121 °C, posteriormente se eliminó el TFA por evaporación con metanol; se inició la derivatización con una reacción de reducción con 150 μL NaBH_4 (20 mg mL^{-1} en NH_4OH 1N) y una posterior acetilación con 200 μL anhídrido acético y 20 μL de 1-metilimidazol como catalizador. El material derivatizado se lavó consecutivamente con agua:cloroformo y por separación de fases se recuperó la fase de solvente, se evaporó y los acetatos de alditol se resuspendieron en acetona para su inyección en un cromatógrafo de gases Agilent 7890B, equipado con detector FID, columna capilar DB-23 de 30 m x 0.25 mm y helio como gas acarreador. La integración de áreas se realizó con el software MS Workstation versión 6.5 (SP1) y el cálculo de la concentración se realizó a partir de una curva de estándar de pinitol.

5.3. Material Vegetal

Se utilizaron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) variedad Tisey DRD 8551 de (Seminis Seeds), se germinaron en charolas de germinación de 338 cavidades, utilizando como sustrato peak most y vermiculita. Las charolas se irrigaron a capacidad de campo y se colocaron en oscuridad durante 72 h, posteriormente a las 8 semanas post germinación, las plántulas se trasplantaron previo lavado de raíces para retirar el sustrato, a macetas de unisel No. 60 (capacidad de 1774 mL) a las que se añadieron 1000 mL de solución nutritiva Steiner al 25% con pH 5.6 % ajustado con ácido sulfúrico al 50% (cuadro 4).

Previo al experimento, las plantas se mantuvieron en el laboratorio de Bioquímica Vegetal a una temperatura promedio de 25° C, humedad relativa de 60%, luz blanca controlada mediante lámparas led (60W, 5000K), ciclos de luz/oscuridad de 12 h/12 h y una distribución homogénea de la luz determinada con un medidor de luz PAR. Estas condiciones se mantuvieron durante las 5 semanas posteriores a la germinación y los requerimientos nutricionales de las plantas en crecimiento se suplieron con cambios de la solución nutritiva cada dos días a las 11:00 AM, misma que semanalmente fue aumentando en concentración con intervalos de 10% hasta alcanzar una proporción de 60%. Durante ese periodo que fue de 63 días, se consideró que las plantas se encontraban aclimatadas y listas para los experimentos de inducción de estrés hídrico.

Cuadro 4. Composición de la solución nutritiva Steiner al 100% para un volumen de 200 L.

Compuesto	Fórmula	Cantidad (g)
Nitrato de calcio	Ca(NO ₃) ₂	194
Nitrato de potasio	KNO ₃	55
Sulfato de potasio	K ₂ SO ₄	60.22
Fosfato de potasio	KH ₂ PO ₄	40.98
Sulfato de magnesio	MgSO ₄	97.22
	Fe	0.6
	Mn	0.28
Microelementos quelatados (Tradecorp AZ)	Zn	0.056
	B	0.052
	Cu	0.0224
	Mo	0.024

5.3.1. Inducción de Estrés Hídrico con Polietilenglicol

Se utilizó polietilenglicol 6000 (PEG 6000) para simular condiciones de estrés hídrico, tal como fue previamente reportado por las respuestas fisiológicas y bioquímicas análogas al estrés hídrico por sus propiedades de absorción de agua (Kumar *et al.*, 2011). Para este fin y con base en la revisión de literatura, se consideró un valor de potencial osmótico (Ψ_s) de -0.7 MPa como inductor de estrés hídrico el cual se alcanzó con 244 g de PEG 6000 por L⁻¹ de H₂O según la ecuación de Michel y Kaufmann (1973).

$$\psi_s = -(1.18 \times 10^{-2})C - (1.18 \times 10^{-4})C^2 + (2.67 \times 10^{-4})CT + (8.39 \times 10^{-7})C^2T$$

Dónde:

ψ_s : Potencial osmótico (Mpa)

C: Concentración de PEG-6000 (g Kg⁻¹ H₂O)

T: Temperatura (°C)

PEG 6000 Equivalente a un potencial osmótico de $\psi = -0.70$ MPa para 16 L de solución nutritiva.

Volumen por maceta (1 L*)

Temperatura 25°C

244 g de PEG por L = 3.904 Kg

* El agua se sustituyó por la solución nutritiva Steiner al 25%. Los tratamientos inducidos a estrés osmótico de -0.70 MPa se indican como PEG.

5.3.2. Aplicación Foliar de Extracto de *S. portulacastrum*

Los tratamientos consistieron en la aplicación foliar del extracto de *S. portulacastrum* cuyo ajuste en la concentración fue con base en el contenido de pinitol tomando de base el antecedente de

uso de su precursor mioinositol (Yildizli *et al.*, 2017). Según el volumen promedio de aspersión por planta (8.88 mL), las dosis efectivas de aplicación fueron de 0 (testigo), 0.15 (baja), 0.30 (media) y 0.45 μmol (alta) de pinitol por planta equivalentes a la aspersión de soluciones de 0, 17, 34 y 51 μM , respectivamente.

5.4. Diseño del Experimento

Las condiciones de aclimatación, crecimiento y arreglo de los tratamientos se muestran en la figura 8. El experimento se mantuvo en las condiciones controladas y homogéneas de luz, temperatura y humedad relativa previamente descritas. Las plantas se distribuyeron en 15 macetas de 8 plantas cada una; 3 macetas para cada uno de los siguientes tratamientos:

- a) Testigo: Sin inducción de estrés hídrico (solución nutritiva Steiner) y asperjado con solo solución de extracción con 0 μmol de pinitol.
- b) Testigo PEG: Estrés hídrico inducido (-0.70 MPa) y asperjado con solo solución de extracción con 0 μmol de pinitol.
- c) 0.15 μmol : Estrés hídrico inducido (-0.70 MPa) y asperjado con dosis baja de extracto de *S. portulacastrum* equivalentes a 0.15 μmol de pinitol.
- d) 0.3 μmol : Estrés hídrico inducido (-0.70 MPa) y asperjado con dosis media de extracto de *S. portulacastrum* equivalentes a 0.3 μmol de pinitol.
- e) 0.45 μmol : Estrés hídrico inducido (-0.70 MPa) y asperjado con dosis alta de extracto de *S. portulacastrum* equivalentes a 0.45 μmol de pinitol.

Las plantas se mantuvieron en un estante con tres niveles previamente ajustados a la misma intensidad de luz y en cada nivel se aleatorizó el orden de acomodo de los tratamientos. Diariamente se utilizaron dos plantas por maceta para un total de 6 plantas muestreadas por cada tratamiento durante 3 días post-inducción del estrés hídrico.



Figura 8. Arreglo y distribución de macetas con plántulas de tomate tratadas con diferentes dosis de extracto de *S. portulacastrum*. Imagen tomada el 14 de octubre del 2020.

5.5. Determinación de Contenido Relativo de Agua (CRA)

De las plantas colectadas se disectaron hojas y rápidamente se cortaron 9 discos de tejido, con la ayuda de un sacabocado de 8 mm de diámetro, se pesaron individualmente para obtener el peso fresco (PF), posteriormente se sumergieron en 10 mL de agua destilada a 4°C, contenida en una caja con 6 pocillos, esta se colocó dentro de una caja para protegerlas de la luz, se mantuvieron a 4°C durante 4 h, después se retiraron los discos del agua y se secó el exceso de humedad con ayuda de una toalla de papel, se pesó nuevamente para obtener el peso turgente (PT), se colocaron los discos en un horno de secado durante 1 h a 90°C y después de este tiempo se pesaron nuevamente para determinar el peso seco (PS) para la obtención de las variables de cálculo del CRA con la ecuación de Barrs (1962) siguiente:

$$CRA = \frac{(PF - PS)}{(PT - PS)} \times 100$$

5.6. Determinación del Contenido de Materia Seca

Se tomaron muestras de las hojas, se pesaron individualmente para obtener el peso fresco (PF), posteriormente se colocaron dentro de un horno de secado durante 1 h a 90°C para obtener el peso seco (PS). Se calculó la materia seca con la ecuación siguiente:

$$\% \text{ Materia seca} = \frac{(PF - PS)}{(PF)} \times 100$$

5.7. Determinación de Clorofila

Se recolectaron las hojas del quinto peciolo y se colocaron 200 mg, en tubos de 15 mL, se congelaron con nitrógeno líquido, se almacenaron en un ultracongelador a -80°C hasta su utilización. Para el análisis, se utilizó la metodología descrita por Sbartai *et al.* (2012). Brevemente, a los tubos conteniendo la muestra congelada se añadieron 2 mL de acetona al 80% fría y con un homogeneizador de tejidos se hicieron extracciones sucesivas. Se filtró entre extracciones con ayuda de una bomba de vacío, utilizando papel filtro whatman no.5, los filtrados se reunieron, homogenizaron y se mantuvieron en baño de hielo para prevenir la oxidación. Finalmente se tomaron las lecturas de absorbancia (DO) a 645 y 663 nm en un espectrofotómetro UV- visible marca Agilent, modelo Cary 60. El cálculo de la concentración de clorofila a y b se hizo mediante las siguientes ecuaciones

$$\text{Clorofila } a = 12.70 \times DO(663) - 2.69 \times DO(645)$$

$$\text{Clorofila } b = 22.90 \times DO(645) - 4.60 \times DO(663)$$

$$\text{Concentración clorofila (mg g}^{-1}\text{)} = \text{Clorofila } a \times V / (P \times 1000)$$

Dónde:

V = Volumen final de extracto

P = Peso de muestra

1000 = Conversión de µg a mg

5.8 Determinación de Prolina Libre y Ácido Abscísico

El método utilizado fue una combinación del método de extracción recomendado por Carrillo *et al.* (2008) para prolina, con la recomendada por Lei *et al.* (2016) para ácido abscísico. La cuantificación se realizó a partir de 200 mg de material fresco se extraen en frío con 2 mL de etanol:agua (40:60 v/v). La mezcla se reposó durante la noche a 4°C (refrigerador) y posteriormente centrifugó a 14000xg (5 min). No se consideró una segunda extracción sobre el material sólido debido a que se obtuvieron recuperaciones > 90%. Los extractos se almacenaron a -20°C y diluyeron en fase móvil para el análisis por LC-MS/MS.

Los estándares y las muestras se inyectaron de forma automática a través de un sistema Sample Manager – FTN Acquity de Waters a un UPLC Acquity serie H al sistema de espectrometría de masas Xevo TQS bajo las condiciones reportadas en el cuadro 5.

Cuadro 5. Condiciones cromatográficas para la separación y cuantificación de prolina y ácido abscísico.

CONDICIONES LC-MS	
Modo de ionización:	ESI(+/-)
Voltaje del capilar:	3.0 kV
Ion Counting thr	40
Temperatura de desolvatación:	400 °C
Flujo del gas de desolvatación	600 L h ⁻¹
Temperatura de la fuente:	150 °C
Flujo del gas del cono:	300 L h ⁻¹
Flujo del gas de colisión:	0.14 mL min ⁻¹
Columna:	AccQTag C18 130A 3.0 mm x 100 mm 1.7 µm
Fase móvil A:	5 mM formiato de amonio pH 3.0
Fase móvil B:	Metanol + 5 mM formiato de amonio + 0.1% ácido fórmico
Temperatura de la columna:	40 °C
Flujo de la fase móvil:	0.2 mL min ⁻¹
Volumen de inyección:	5 µL

Gradiente					
Tiempo (min)	Flujo mL min⁻¹	%A	%B	Curva	
Inicial	0.200	100	0	-	
0.7	0.200	98	2	6	
3.0	0.200	95	10	6	
3.1	0.200	10	90	6	
5.0	0.200	10	90	6	
6.0	0.200	100	0	6	

Los iones se monitorearon usando MRM (Multiple Reaction Monitoring) para al menos una transición (figura 9) bajo las siguientes condiciones de tándem MS (cuadro 6).

Cuadro 6. Configuración del detector de espectro de masas en tándem MS-MS

Analito	Ion precursor m/z	Iones producto m/z	Tiempo de colecta (s)	Voltaje del cono (V)	Energía de colisión (V)
Analito	Parent m/z	Daughter m/z	Dwell (s)	Cone (V)	Collision (V)
Prolina	116.00	43.00	0.003	30	25
		70.00	0.003	30	20
ABA(-)	263.10	152.00	0.115	11	15
		219.00	0.115	11	10

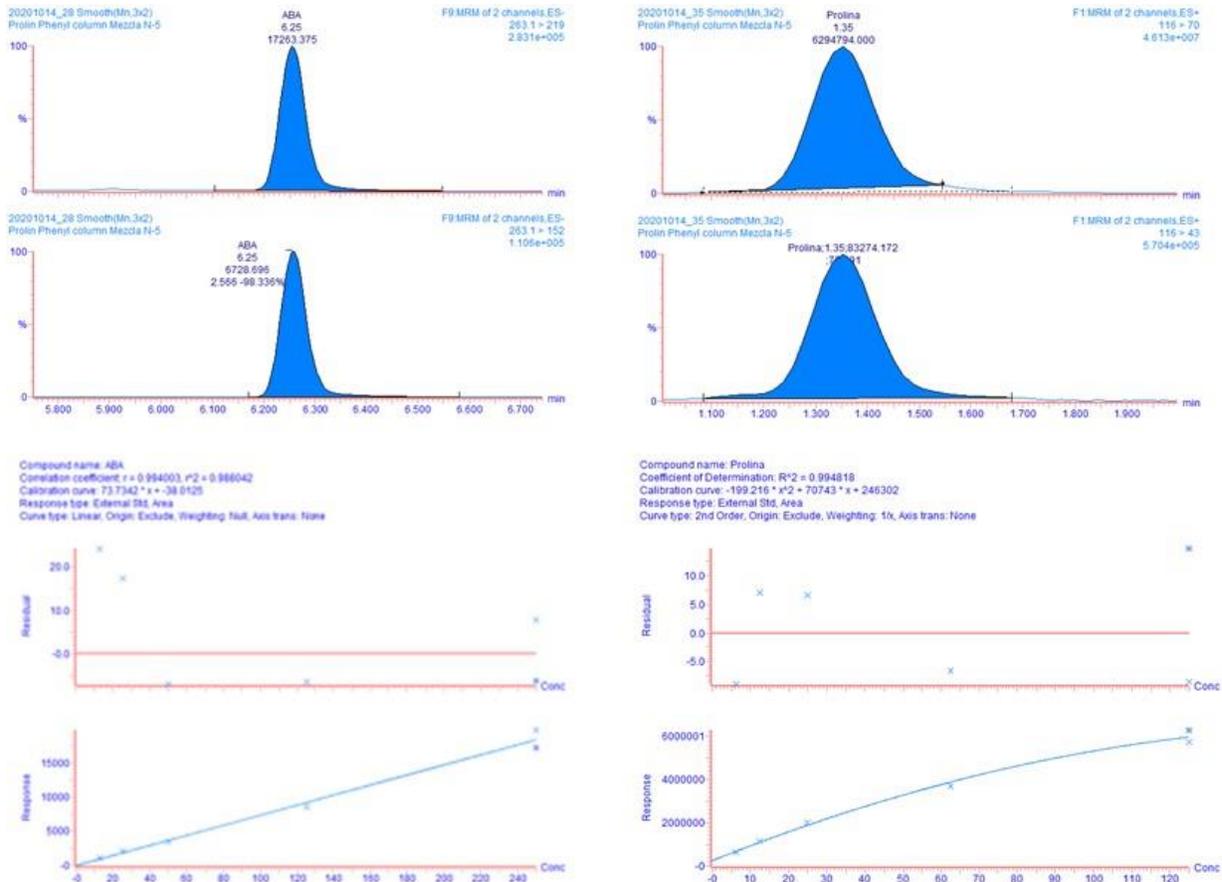


Figura 9. Corrida cromatográfica (LC MS-MS) y curva de regresión para la cuantificación de ABA y prolina a partir de estándares.

5.9. Análisis de Datos

Para la interpretación de datos se realizó un diseño completamente al azar con dos factores (dosis de extracto y tiempo) para la prueba de laboratorio e invernadero; y una comparación de medias para las variables evaluadas en cada tiempo de muestreo post-inducción de estrés. Los resultados fueron analizados en Minitab 19, las diferencias de medias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor $p \leq 0.05$

6. RESULTADOS

6.1. Cinética de Extracción (Sólidos Disueltos y Azúcares Totales)

Los procesos de expansión de la agricultura y la demanda de alimentos bajo esquemas de producción amigable con el medio ambiente, ha impulsado la atención hacia el aprovechamiento de los recursos naturales. Los extractos a base de plantas es un campo de oportunidad de creciente demanda en la agricultura debido a su importancia en la agricultura sustentable ya que se promueve como una solución alternativa al uso de sustancias químicas (algunas de ellas tóxicas) para solución de problemas agronómicos (Isman y Grieneisen, 2014; Pavela, 2016; Kocira *et al.*, 2021; da Silva-Carvalho *et al.*, 2022).

En la presente investigación, se obtuvo que el uso de los co-diluyentes alcohol etílico y ácido láctico fueron eficientes para incrementar significativamente la extractabilidad de sólidos solubles a partir del tejido de biomasa de *S. portulacastrum* tal como se muestra en la figura 10 (base sólidos disueltos totales y azúcares totales, respectivamente). La extractabilidad promedio de sólidos con la solución etanoláctica fue de 2.9 % (p/v) y 2.5 mg mL⁻¹ de sólidos disueltos totales y azúcares totales, respectivamente; vs 1.75 % (p/v) y 2 mg mL⁻¹ con la extracción acuosa, respectivamente. Dicha extracción fue equivalente a una eficiencia de arrastre p/p de 135 a 150 mg de sólidos disueltos totales (11 a 15 mg de azúcares totales) por g⁻¹ de biomasa de *S. portulacastrum*. La eficiencia en la extracción puede estar influenciada por la naturaleza suculenta de las hojas de dicha especie y el aumento de la polaridad del solvente con la adición del ácido láctico y el etanol. En cuanto al comportamiento de dichos sólidos a través de la cinética de extracción, los resultados muestran que 1 h de proceso fue suficiente para el arrastre del contenido celular del tejido de *S. portulacastrum* (Figura 10). Se conoce que el solvente más económico y ambientalmente amigable es el agua, no obstante, tanto el ácido láctico como el etanol son compuestos orgánicos de creciente demanda en la industria de la extracción por su origen a partir de procesos de la fermentación y su bajo costo. Por lo anterior, se consideran candidatos dentro del grupo de procesos de bajo impacto y adición de valor en el creciente aprovechamiento para los procesos extractivos de biomasa a partir de especies vegetales con

potencial uso en la agricultura (Yang *et al.*, 2012). No obstante, el posible efecto de acidificación y deshidratación por el ácido láctico y el etanol hizo necesario un ensayo previo para descartar toxicidad de los extractos o de los metabolitos propios de *S. portulacastrum*.

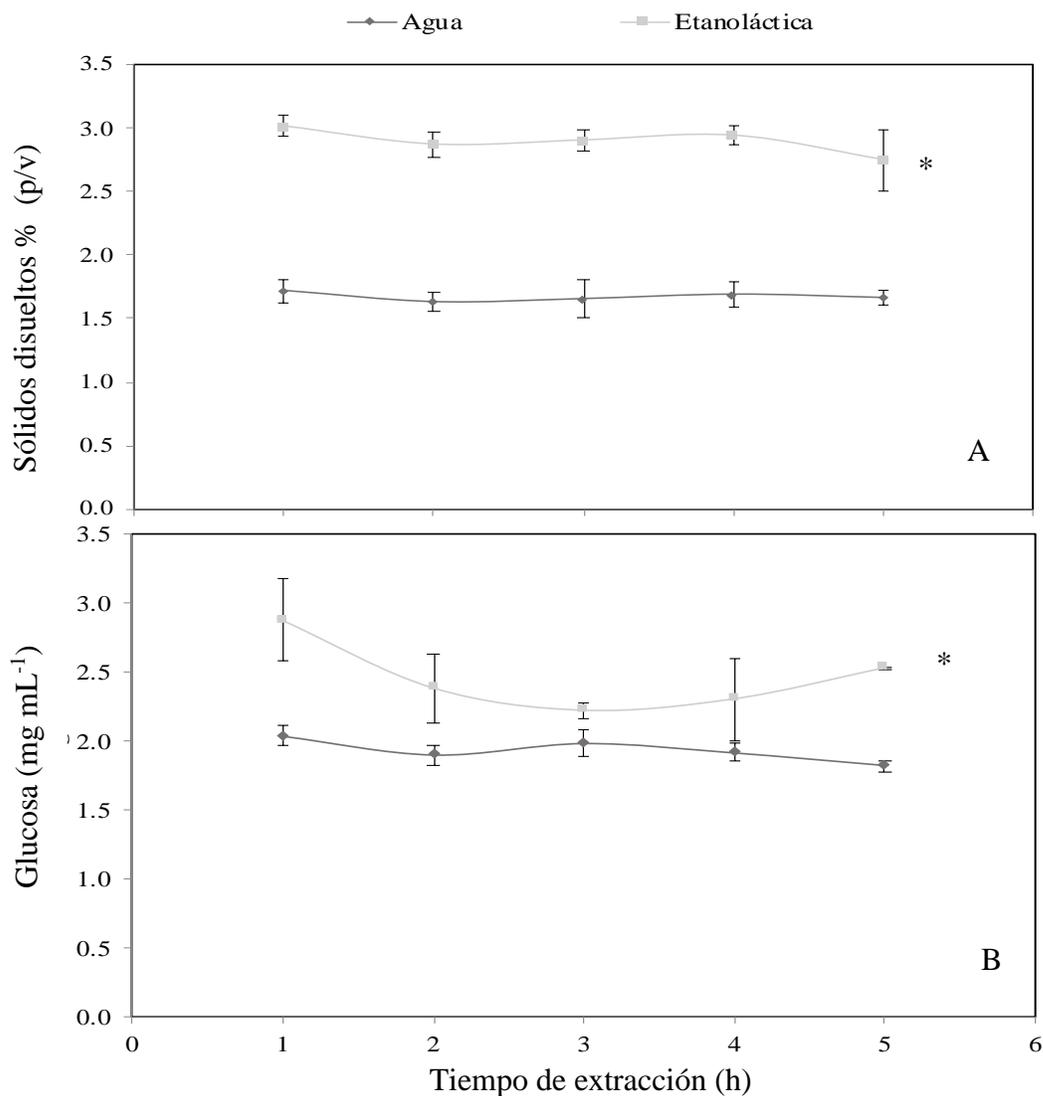


Figura 10. Cinética de extracción etanoláctica de sólidos a partir de biomasa de *S. portulacastrum*. A, sólidos disueltos totales; B, azúcares totales. Tiempo de extracción 5 h a temperatura de 25°C. La condición de extracción significativamente con mayor rendimiento de arrastre se indica con * a un valor $p \leq 0.05$. I=desviación estándar, n=5.

6.2. Prueba de Fitotoxicidad del Extracto de *S. portulacastrum*

Los fitocompuestos pueden actuar como solutos compatibles, pero se reconoce que algunos de ellos pueden llegar a presentar fitotoxicidad en función de la dosis, de donde se origina el principio de compartimentalización y exclusión en vacuolas. Adicionalmente, las condiciones de polarización que confiere el uso de etanol y de acidificación del ácido láctico, pudieron resultar en efectos adversos en los lípidos de las membranas cuticulares de los tejidos foliares más jóvenes de las plantas de tomate. No obstante, lo previamente considerado, se confirmó que la aplicación consecutiva de exceso de dosis del extracto de *S. portulacastrum* no indujo alguna respuesta fitotóxica en el tejido de las plantas en el desarrollo fenológico empleado para este estudio (figura 11). Después de 3 días de aspersión foliar de 200, 400, 500 y 600 mL de extracto por planta, la fitotoxicidad según la escala de referencia del método EWRC fue de nula señal de toxicidad con resultado de daño en 1. En un estudio con ciclitoles sintéticos se reportó citotoxicidad en raíces de *Cicer arietinum* L. expuestas a dosis superior de 2.5 μmol por planta, las cuales causaron degeneración celular e incremento del índice mitótico (Çevik *et al.*, 2014). Con base en lo anterior, las concentraciones de ensayo experimental se establecieron en dosis inferiores al umbral reportado.



Figura 11. Hojas de tomate expuestas a diferentes concentraciones de extracto de *S. portulacastrum* posteriores a 3 días de aspersión foliar.

6.3. Identificación de Componentes del Extracto de *S. portulacastrum*

La selección del material colectado en las dos localidades geográficas pertenecientes a las zonas costeras centro norte (Guasave) y centro (Navolato) de Sinaloa (ver figura 7), se estableció con base en la composición de los extractos etanoláticos.

Los principales componentes detectados en los extractos de *S. portulacastrum* se describen en el cuadro 7 que resume el barrido cromatográfico cualitativo. En general los fitocompuestos principales encontrados fueron fitol, estigmasterol y sitosterol, los cuales forman parte del grupo fitoesteroles, de los cuales se han descrito actualmente hasta 250 fitoesteroles diferentes. Destaca por su abundancia en la mayoría de las especies de plantas el β -sistosterol, por otro lado, el colesterol se encuentra en mínimas cantidades (Burciaga, 2019).

La variación en composición entre localidades de procedencia permitió identificar que las plantas de la localidad de Buenavista, Guasave acumularon 4-C-metil-mioinositol, perteneciente al grupo de los osmorreguladores (cuadro 7). Debido a que el mioinositol metilado es un precursor del polirol cíclico pinitol cuya función es la protección de las plantas contra el estrés salino e hídrico, se dirigió la búsqueda a la cuantificación de dicho ciclitol (Çevik *et al.*, 2014; Ahn *et al.*, 2018; Çevik *et al.*, 2019). El extracto etanolático de Guasave presentó una concentración de pinitol de 1.097 mg mL^{-1} equivalentes a 5.5 mg g^{-1} (peso fresco). A partir de dicha concentración en el extracto, se definieron los volúmenes para la preparación de soluciones a 0.15, 0.30 y 0.45 μmol que constituyeron los tratamientos con base en antecedentes de aplicación exógena de mioinositol, el cual pertenece al mismo grupo de ciclitoles de importancia en procesos biológicos del crecimiento y desarrollo vegetal (Çevik *et al.*, 2014; Hu y Xiong, 2014; Yildizli *et al.*, 2017; Çevik *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2020).

Es importante mencionar que los osmoprotectantes pueden agruparse en 3 grupos principales: las betaínas y compuestos relacionados (dimetilsulfoniopropionato y sulfato de colina); los aminoácidos (prolina y ectoína); y finalmente los polioles (sorbitol, manitol, D-ononitol, D-pinitol) y azúcares (trehalosa). Entre los polioles el D-pinitol juega una función central en la respuesta a estrés salino, déficit hídrico (por sequía o altas temperaturas), nodulación radicular (leguminosas) y desarrollo embrionario (Ahn *et al.*, 2018).

Algunos reportes sobre la capacidad de acumulación de prolina y glicina betaína en callos

cultivados *in vitro* de *S. portulacastrum* y sometidos a concentraciones crecientes de NaCl de 0, 100, 200 y 400 mM (Lokhande *et al.*, 2010a). De igual manera Kannan *et al.* (2013) reportaron la acumulación de prolina y glicina betaína en plantas expuestas por 28 días a 0, 100, 200, 300, 400, 500 y 600 mM de NaCl, las cuales alcanzaron concentraciones de 1.7 a 4.4 mg g⁻¹ de prolina y de 1.4 a 3.3 mg g⁻¹ de glicina betaína. Lo anterior difiere de nuestros hallazgos pese a que se realizaron ensayos dirigidos a la cuantificación de dichos compuestos y solo se identificaron trazas de glicina betaína (datos no mostrados).

Cuadro 7. Compuestos identificados en extracto etanolático de *S. portulacastrum* mediante barrido en GC-MS en extractos de plantas colectadas en dos localidades costeras.

Localidad			
Nuevo Altata, Navolato		Buenavista, Guasave	
Tiempo de retención (min)	Compuesto (NIST)	Tiempo de retención (min)	Compuesto (NIST)
8.495	5-metil-1-nitropirazole	16.494	4-C-metil-mioinositol
18.903	Fitol	18.91	Fitol
33.706	Escualeno	33.69	Escualeno
31.6	dl- α -tocoferol	45.184	Estigmasterol
43.731	Estigmasterol	41.197	Cholesterol
44.731	Γ -sitoesterol	46.8	β -Amyrin

6.4. Efecto del Extracto de *S. portulacastrum* en el Estrés Hídrico

Las características de contenido relativo de agua (CRA), hidratación aparente visual, pigmentos fotosintéticos, contenido de prolina, glicina betaína y ácido abscísico, se utilizaron como indicadores de la respuesta de las plantas de tomate al estrés hídrico inducido con PEG, así como para medir la influencia protectora de las aplicaciones foliares del extracto de la planta halófila *S. portulacastrum* conteniendo el ciclitol pinitol.

6.5. Contenido Relativo de Agua (CRA) Foliar

Los efectos de los tratamientos con PEG y aspersiones foliares de *S. portulacastrum* a diferentes dosis se muestra en la figura 12. En general, el marco de fluctuaciones de valores CRA para los distintos tratamientos fue de 91 a 71%, mientras que el testigo en mejor condición de hidratación se mantuvo entre 91 y 85% durante el periodo de monitoreo de este estudio. Los valores mayores de 80% se consideran indicativos de buena hidratación y a medida que el CRA disminuye se presenta progresivamente el estado de estrés por descompensación hídrica (Ortiz *et al.*, 2003). El comportamiento de disminución en los valores de CRA presentó cambios significativamente hacia la reducción a partir del día 1 en los tratamientos de mayor dosis de aspersión del extracto, sugiriendo un efecto negativo en el estado de hidratación de las hojas, aunque éste no fue correspondiente con lo observado en la apariencia de pérdida de turgencia (figura 14) ni en el estado general de las plantas (datos no mostrados).

De acuerdo con los datos de CRA, fue la dosis de 0.15 μmol la que indujo una mayor retención de agua en los tejidos foliares, con un efecto más diferenciado a partir del día 2, manteniendo en promedio de 82.5 a 90% el índice CRA en condiciones similares al testigo absoluto no inducido con PEG. El Testigo PEG redujo por debajo del 80% el CRA a partir del día 2, mostrando que las condiciones experimentales propuestas, fueron efectivas en la inducción del estrés hídrico. Por otro lado, las dosis de 0.30 y 0.45 μmol de pinitol, presentaron la condición de CRA menor a partir del día 1 alcanzó un valor cercano al 73% para el día 3.

Las hojas juegan una función importante en los procesos metabólicos de la fotosíntesis y la transpiración. Los estudios sobre el efecto de corto plazo del estrés hídrico sobre el estado de hidratación de hojas totalmente expandidas utilizan la variable Contenido Relativo de Agua (CRA) debido a que es un indicador representativo de la suma progresiva de afectaciones metabólicas esperadas ante la condición de estrés presente y en consecuencia de la estabilidad homeostática celular (Claussen, 2005). La pérdida de agua en mayor o menor grado, detona la activación de los sistemas de ajuste osmótico para contrarrestar los diferenciales de potencial hídrico que se causan en el sistema suelo-planta-atmósfera, y de esta manera reducir las afectaciones metabólicas (Moreno, 2009).

El CRA se utiliza para conocer el nivel de agua de un tejido, este es relacionado con el potencial

hídrico ya que éste y sus componentes, potencial de presión y solutos, están en función del volumen de agua del protoplasma (Argentel *et al.*, 2006).

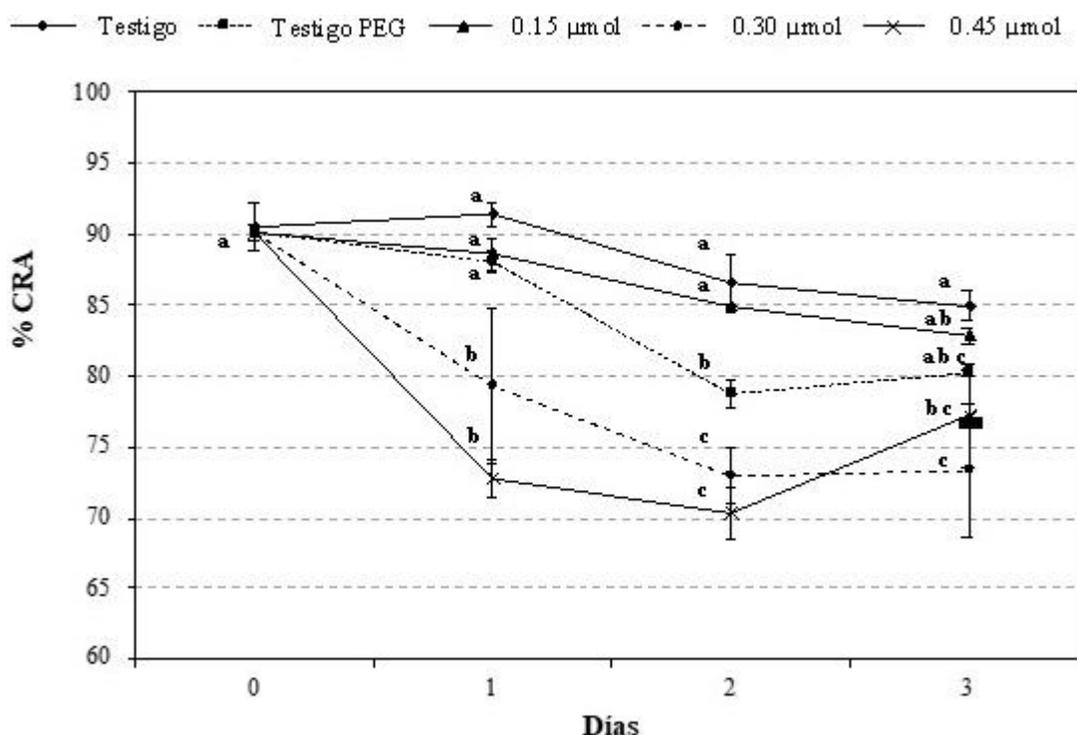


Figura 12. Contenido relativo de agua (% CRA) en hojas de plantas de tomate Tisey DRD 8551 sometidas a estrés hídrico y tratadas con diferentes dosis de extracto de *S. portulacastrum*. Las diferencias de medias por días que no comparten letra son significativamente diferentes $p \leq 0.05$.

En concordancia con el valor CRA, el contenido de materia seca fue en comportamiento de aumento confirmando una condición de reducción de humedad en los tejidos, mayormente afectado por la dosis de 0.45 µmol y el día 3 de post-inducción de estrés. Los efectos principales de la aplicación de las dosis foliares de pinitol con base en el valor de materia seca, reiteran que la dosis baja de 0.15 µmol fue la que revirtió el efecto de deshidratación del PEG a los valores más cercanos al testigo no inducido (figura 13). El valor promedio de materia seca en los materiales de tomate en estudio fue de 11.5%, la inducción con PEG produjo una deshidratación que provocó un efecto de aparente incremento de materia seca a valor de 15% y la dosis alta a 21%; no obstante, este efecto se vio influido por la consecuencia propia de la deshidratación de

los tejidos que se obtuvo según los valores de CRA, en la misma correspondencia de los tratamientos. El valor promedio en general para la dosis de 0.15 μmol fue de 13%, la cual se consideró con base en la retención de humedad en el tejido, la de mayor protección del estrés hídrico. Es importante hacer notar que con base en este efecto de deshidratación, los valores de acumulación de clorofila, prolina y ácido abscísico presentan una influencia de concentración derivada de la reducción del contenido de agua en los tratamientos de dosis media y alta de pinitol la cual no fue transformada a materia seca debido a la alta variación que se tuvo en la condición de microensayo a falta de suficiente tejido foliar.

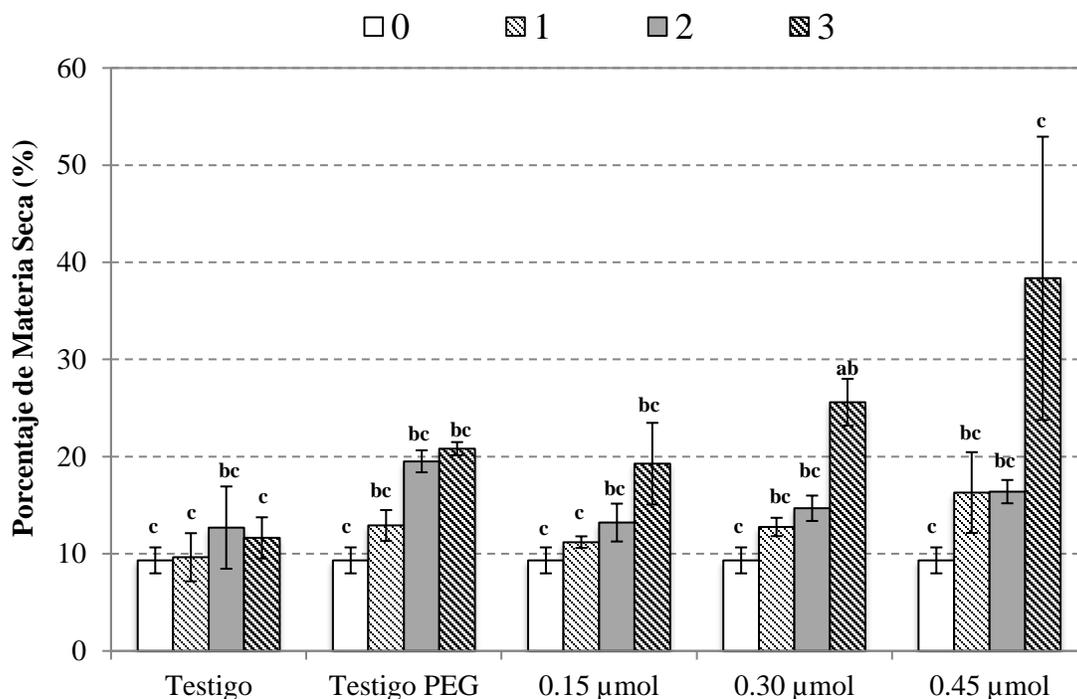


Figura 13. Porcentaje de materia seca de hojas de plantas de tomate con estrés hídrico inducido y tratadas con diferentes dosis de extracto de *S. portulacastrum*. Las diferencias de medias por días que no comparten letra son significativamente diferentes $p \leq 0.05$.

6.6. Apariencia Relativa de Hidratación

La influencia del estrés hídrico en la apariencia del estado de hidratación de hojas se muestra en

la figura 14. La adición de PEG 6000 a la solución nutritiva de sostenimiento de las plantas de tomate, provocó una apreciable pérdida de turgencia visual en las hojas, las cuales fueron escindidas e inmediatamente descritas comparativamente a partir de un registro fotográficamente a partir del día 1 post exposición, mientras que el marchitamiento del tejido en forma de enrollamiento fue notable a partir del día 2.

Las hojas del tratamiento testigo mostraron una apariencia hidratada correspondiente a un estado de desarrollo normal en la planta; mientras que el efecto inductor de estrés hídrico inducido en las hojas del testigo PEG mostraron síntomas de deshidratación con la correspondiente pérdida de turgencia el cual puede observarse cuantitativamente en los resultados de la variable CRA (figuras 12 y 14). Los efectos de deshidratación en los tratamientos de 0.30 y 0.45 μmol de pinitol, pueden ser considerados como un efecto combinado de reacción con el estrés hídrico y se descartan como efecto negativo debido a que las dosis empleadas del extracto de *S. portulacastrum* para la prueba de fitotoxicidad, no indujeron daño en plantas aun cuando superaron las proporciones de dichos tratamientos (figura 11).

En lo general, se puede observar en el comparativo fotográfico que los síntomas de deshidratación en los tejidos de las hojas se presentaron en los tiempos y tratamientos que cuando los valores CRA estuvieron cercanos a 88%, se relacionaron los síntomas ya visibles de pérdida de turgencia en la hoja del testigo PEG, mientras que los síntomas de enrollamiento foliar por marchitez fueron visibles a partir de un CRA de 80% o menos (figuras 12 y 14). No se presentaron clorosis ni amarillamientos.

Por otro lado, la apariencia de hidratación de las hojas asperjadas con *S. portulacastrum* equivalente a 0.15 μmol de pinitol, presentaron la mejor apariencia de tejido en estado de turgencia al día 1 y día 3 (excepto el día 2) por lo cual se consideró que la dosis baja presentó una respuesta más favorable de protección contra el efecto osmótico del PEG en las plantas de tomate. No obstante, del presente resultado puede interpretarse es necesario conducir más experimentos, por ejemplo considerando dosis intermedias entre 0 y 0.30 μmol de pinitol, reducir la concentración de PEG para una menor presión de deshidratación o bien probar efectos de aspersiones previo a la aclimatación e inducción del estrés para explorar más ampliamente los potenciales beneficios del extracto de *S. portulacastrum* como bioinsumo de la agricultura ecológica en creciente expansión y demanda de alternativas de ingredientes con funcionalidad en la fitoprotección de los cultivos.

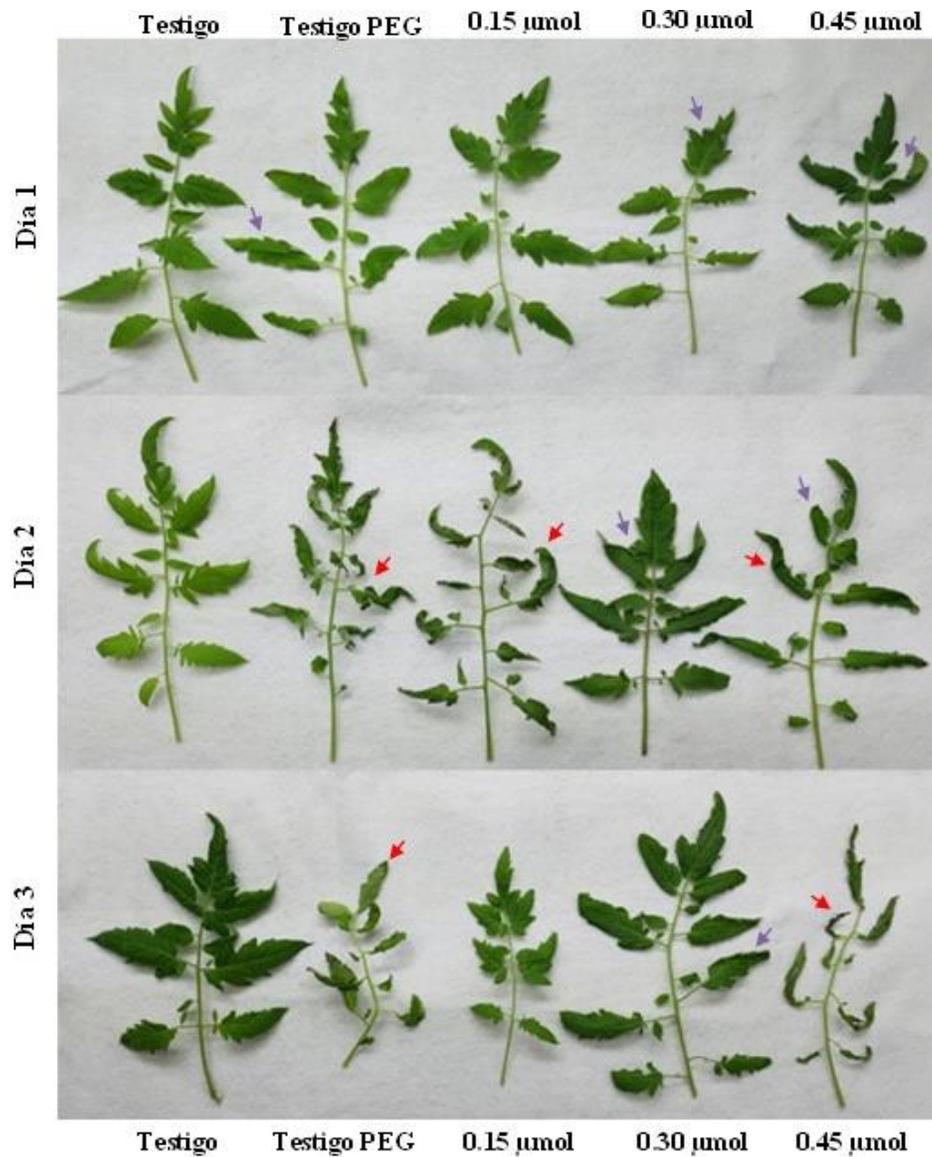


Figura 14. Diferencias en apariencia de hojas de tomate post-exposición a estrés hídrico con PEG 6000 y tratadas a diferentes concentraciones de extracto de *S. portulacastrum*; (→) apariencia de pérdida de turgencia (→) enrollamiento por marchitez.

6.7. Contenido de Clorofila (a y b)

Los resultados obtenidos de la determinación de clorofila están presentados en la figura 15; se puede observar que la tendencia a través del tiempo en el contenido de clorofila a y b fue similar, con una mayor proporción de clorofila a. La variabilidad en la medición de estos indicadores

fisiológicos se consideró moderadamente alta lo que redujo el hallazgo de efectos definidos y significativos entre los tratamientos. No obstante, se obtuvo en términos generales que el tratamiento testigo no inducido, no presentó variaciones en concentración a través del tiempo con valores promedio de 0.99 a 1.25 mg g⁻¹ de clorofila a y de 0.72 a 0.51 mg g⁻¹ de clorofila b. El resto de los tratamientos inducidos con PEG y tratados con alguna dosis foliar de pinitol, tendieron a aumentar la concentración de ambos tipos de clorofila a partir del día 1, diferenciándose hacia el día 3 una concentración intermedia de 1.75 mg g⁻¹ de clorofila a y 0.8 mg g⁻¹ de clorofila b en las dosis 0 y 0.15 μmol de pinitol. El valor promedio de clorofila a fue de 3.1 mg g⁻¹ y clorofila b de 1.65 mg g⁻¹ tanto en las dosis de 0.30 y 0.45 μmol con una tendencia marcada hacia una aparente acumulación que se pudo ver al menos en parte influida por la deshidratación del tejido. Se esperaba una disminución en la concentración de clorofilas a y b, en el grupo testigo PEG y un efecto de reducción de dicho efecto por la aspersión de extracto de *S. portulacastrum*.

En diversos estudios de plantas sometidas a estrés hídrico, se reporta la disminución en el contenido de clorofila. En cacahuete inducido a estrés hídrico mediante la exposición a diferentes concentraciones de PEG 6000 (5, 10, 15 y 20%) en un periodo de 24 h, se midió la concentración de clorofilas a y b; en el control fue de (1.606 y 0.474 mg g⁻¹), de igual manera para las concentraciones PEG 5% (1.34 y 0.7 mg g⁻¹), 10% (1.1 y 0.56 mg g⁻¹), 15% (0.874 y 0.528 mg g⁻¹) y 20% (0.66 y 0.386 mg g⁻¹), respectivamente, con lo cual se apreció un efecto de disminución de la concentración tanto de clorofila a como b (Meher-Shivakrishna *et al.*, 2018).

Otro estudio realizado por Kumar *et al.* (2011) en frijol gandul (*Cajanus cajan* L. Millspaugh), en el cual se indujo un estrés progresivo simulando dos potenciales osmóticos (-0.51 y -1.22 MPa), reportó que a valores de potencial osmótico de -0.51 MPa las concentraciones de clorofila a y b en el control fueron mayores (1.25 y 1.14 mg g⁻¹, respectivamente) con respecto a la reducción inducida por el estrés de -1.22 MPa (0.78 y 0.58 mg g⁻¹, respectivamente).

La fotosíntesis está influenciada y a menudo limitada por diversos factores internos y externos como son la concentración de gases (CO₂ y O₂), temperatura, circulación del aire, estado hídrico, nutrientes, desarrollo, morfología de la hoja, actividad/concentración de los aceptores de electrones o enzimas implicados y resistencia foliar al intercambio gaseoso, entre otros.

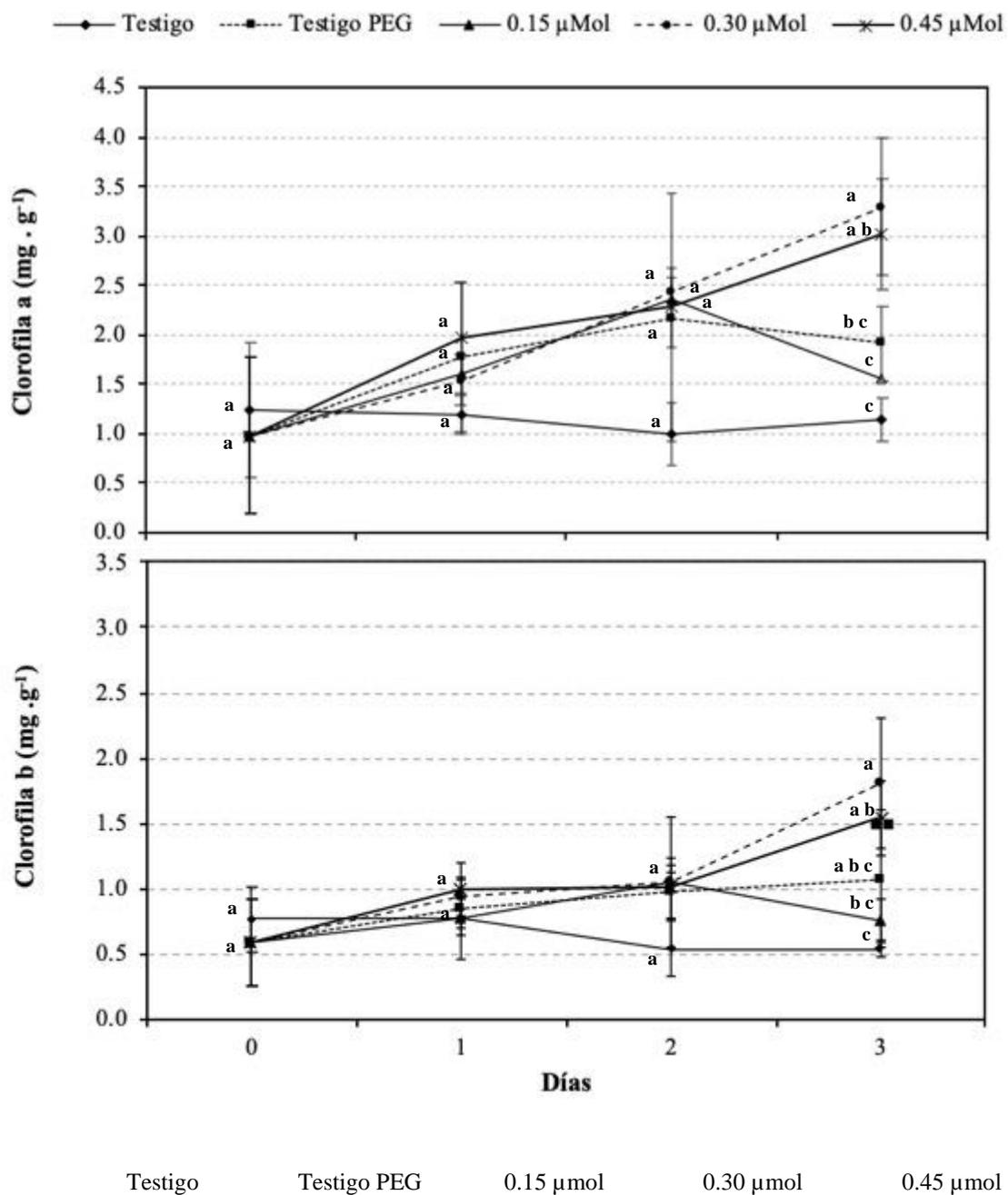


Figura 15. Contenido de clorofila a (A) y clorofila b (B) en hojas de plantas de tomate con estrés hídrico inducido y tratadas con diferentes dosis de extracto de *S. portulacastrum*. Las diferencias de medias por días que no comparten letra son significativamente diferentes $p \leq 0.05$.

Varios estudios han demostrado una disminución de la actividad fotosintética debido al estrés

hídrico. Esta disminución se asocia con alteraciones de procesos y componentes bioquímicos, siendo el fotosistema II el más sensible de estos componentes a la baja disponibilidad hídrica (Saínz *et al.*, 2010). La disminución del contenido de clorofila bajo estrés debido al estrés oxidativo podría ser el resultado de la fotooxidación de los pigmentos y degradación de la clorofila (Anjum *et al.*, 2011).

No obstante, otros autores consideran que la disminución del contenido de clorofila inducida por la sequía constituye un mecanismo de defensa de la planta para reducir la presión causada por el exceso de energía sobre los fotosistemas I y II (Cardona-Ayala *et al.*, 2014). Además, es crucial la función de los pigmentos carotenoides al regular el transporte de electrones fotosintéticos (Ready *et al.*, 2004) dado que son los mediadores del proceso utilizado por las plantas para disipar el exceso de energía lumínica (Demming-Adams y Adams, 1996).

6.8. Prolina

La influencia del estrés hídrico y la aplicación de extractos de *S. portulacastrum* sobre la acumulación del osmolito prolina sugieren un incremento de manera considerable en las plantas inducidas al estrés hídrico con PEG con menor efecto de acumulación (valor promedio de 71 $\mu\text{mol g}^{-1}$) en la dosis de 0.15 μmol (figura 16). El contenido de prolina se mantuvo, a lo largo del tiempo, sin presentar signos de acumulación en el testigo (1.3 $\mu\text{mol g}^{-1}$); mientras que la acumulación de 50 a 100 veces en los tratamientos inducidos con PEG y asperjadas con las dosis con pinitol con la mayor tendencia de acumulación a partir de los días 2 y 3 post-inducción. Este osmolito fue el indicador fisiológico más significativo de este estudio y a diferencia del resto de los indicadores, la magnitud de su acumulación fue claramente responsiva frente a la inducción de estrés hídrico y por inducción de la aspersión de 0.15 μmol de pinitol, en asociación con las variables de CRA y materia seca. La aspersión del extracto de *S. portulacastrum* ajustado a 0.30 μmol de pinitol tuvo el valor más alto de prolina en el día 3 y el dato más bajo fue de la dosis de 0.15 μmol , descartando la influencia de la pérdida de agua en la dosis alta. De este resultado deriva la sugerencia de realizar estudios posteriores con variación en el diseño que incluyan conocer el efecto de la frecuencia de aplicación, así como la inclusión de gradientes de estrés

hídrico con inducción pre- y post-aspersión con extractos de *S. portulacastrum*, además de que partiendo de estos estudios, incluir pinitol sintético como testigo para confirmar las propiedades biológicas de osmorregulación previamente reportadas.

La prolina es referida como un importante regulador osmótico de las plantas bajo estrés osmótico, cuya acumulación está regulada en respuesta a la hormona ABA con diferenciación de la respuesta en los tejidos de los cuales las hojas son consideradas de alta expresión biosintética cuya acumulación varía entre plantas y puede llegar a ser 100 veces mayor que su concentración en condiciones controladas ausentes de estrés. La acumulación de prolina se ha propuesto como un mecanismo adaptativo de tolerancia debido a que este osmolito puede actuar como un aminoácido aportador de carbono y nitrógeno en condiciones de estrés osmótico y oxidativo; además, entre sus funciones moleculares se le considera un estabilizador de la estructura proteica y un amortiguador de pH citosólico para estabilizar el potencial redox celular (Verbruggen y Hermans, 2008; Wang *et al.*, 2022).

Los valores de acumulación de prolina de este estudio son 500 veces superiores a lo reportado en un estudio con 7 variedades de tomate inducidas mediante restricción de riego a un estrés hídrico de 50 a 55 % de humedad con respecto a la capacidad de campo (Sakya *et al.*, 2018), donde la variedad con mayor capacidad de acumulación de prolina fue de 16.14 $\mu\text{g g}^{-1}$ (peso fresco) equivalentes a 0.14 $\mu\text{mol g}^{-1}$ (peso fresco) vs 450 $\mu\text{mol g}^{-1}$ (peso fresco) detectados en hojas del tratamiento inducido PEG asperjado con dosis media de *S. portulacastrum* o bien, los ligeramente superior a 250 $\mu\text{mol g}^{-1}$ (peso fresco) de prolina detectados en el tratamiento testigo PEG.

Por otro lado, el bajo contenido de prolina en las plantas sin inducción de estrés coincide con los datos reportados por (Claussen, 2005), quien reportó valores de prolina de 1.5 $\mu\text{mol g}^{-1}$ (peso fresco) en tomate cultivar Counter. Goel (2010), en tomate transgénico sometido a estrés salino acumuló 85 $\mu\text{g g}^{-1}$ (peso fresco) de prolina (0.73 $\mu\text{mol g}^{-1}$ peso fresco); mientras Wang *et al.* (2022) reportó una acumulación de prolina en hojas de sandía (*Citrullus lanatus* L.) de 3.04 $\mu\text{mol g}^{-1}$ (peso fresco).

La prolina es uno de los osmolitos más estudiados en tomate y su concentración se incrementa significativamente después de la exposición al estrés, aunque no se había logrado un consenso entre la tolerancia al estrés y la acumulación de prolina (Ashraf y Foolad, 2007). Algunos autores plantean que la acumulación se considera como un síntoma de daño y no de tolerancia al estrés, mientras que otros autores informan que los incrementos observados en los niveles de prolina

están relacionados principalmente con mecanismos de tolerancia a corto plazo (Ashraf y Foolad, 2007; Sakya *et al.*, 2018).

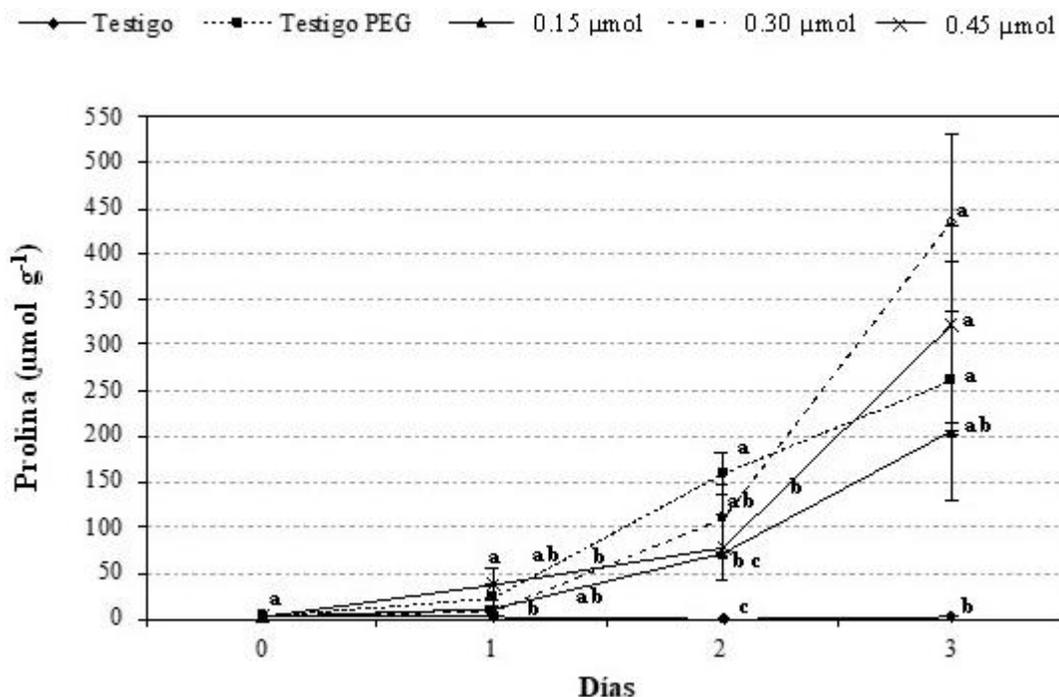


Figura 16. Contenido de prolina libre en hojas de plantas de tomate con estrés hídrico inducido y tratadas con diferentes dosis de extracto de *S. portulacastrum* L. Las diferencias de medias por días que no comparten letra son significativamente diferentes $p \leq 0.05$.

En el estudio del efecto bioestimulador del ciclitol sintético *dl*-ciclopentano-1,2,3-triol aplicado exógenamente tres días previo a la inducción de estrés hídrico en plantas de cebada (*Hordeum vulgare*) con una prolongación de 6 días post-inducción, se encontró que dicho ciclitol estimuló el cierre estomático y la expresión de proteínas de respuesta a sequía de la ruta de captura de especies reactivas de oxígeno, metabolismo energético, fotosíntesis y osmorregulación, así como una reducción en la biosíntesis de ABA. En dicho estudio se reporta que tanto el ABA como la prolina, incrementan su biosíntesis en correlación con la severidad de la condición de estrés hídrico (Çervik *et al.*, 2019). El valor CRA de la condición de estrés más severa en cebada fue de 60% el cual indujo una acumulación de $24.4 \mu\text{mol g}^{-1}$ peso fresco vs el contenido basal de $0.1 \mu\text{mol g}^{-1}$ peso fresco del testigo sin estrés; mientras que, la aplicación exógena de *dl*-ciclopentano-1,2,3-triol provocó una reducción en la severidad de la deshidratación con un CRA ligeramente

superior a 65% y una acumulación de prolina correspondiente a 27.3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ peso fresco. En ese sentido, la rehidratación de las plantas indujo una respuesta reversible del estrés y las plantas dejaron de acumular prolina aun en el tratamiento con el ciclitol a 0.2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ peso fresco. Derivado de esos hallazgos y los previamente reportados en garbanzo (Çervik *et al.*, 2014) donde se realizaron importantes contribuciones del uso potencial de dicho ciclitol sintético como osmoprotectante modulador del movimiento estomático y maquinaria fotosintética en plantas bajo condición de estrés hídrico, se propone su futura explotación comercial en la agricultura para conservar condiciones productivas en condiciones ambientales desfavorables.

Por lo anteriormente expuesto, la oportunidad de profundizar los estudios con los extractos de *S. portulacastrum*, una fuente importante de ciclitoles naturales como el pinitol, así como su caracterización más extensiva tanto química como de inducción de respuesta de osmoprotección, es de gran importancia en esta nueva era de explotación de biorecursos con potencial uso en la reducción de la dependencia de insumos sintéticos.

La prolina puede proporcionar protección contra el daño oxidativo de dos maneras: directamente actuando como un eliminador de especies reactivas de oxígeno (ROS), e indirectamente al consumir NADPH durante su biosíntesis y producir NADP⁺, el aceptor final de electrones fotosintéticos, para evitar la transferencia de exceso de poder reductor al agua generando especies reactivas de oxígeno. Cualquier condición que disminuya el uso de la energía fotosintética en el metabolismo del carbono disminuirá el ritmo de flujo de electrones desde el agua al NADP⁺ debido a la falta de regeneración de aceptores de electrones. El hecho de que la síntesis de prolina a partir de glutamato involucre un importante consumo de NADPH y ATP, sugiere que la biosíntesis de prolina podría ser un mecanismo adaptativo para mejorar el desequilibrio entre la energía lumínica absorbida, la energía usada en el transporte de electrones y el metabolismo del carbono bajo condiciones de estrés (Mattioli *et al.*, 2009).

6.9. Ácido Abscísico (ABA)

El incremento en la acumulación de la hormona ABA tuvo un efecto significativamente dependiente de la condición de estrés y tiempo post-inducción en plantas de tomate (figura 17).

Pese a las variaciones en la determinación analítica que afectaron la definición de significancia estadística en este estudio, la concentración de ABA cuantificada en las plantas inducidas con PEG, fue significativamente superior a reportes previos donde los niveles más altos de ABA apenas alcanzaron los 0.87 ng mL^{-1} y fueron ligeramente reducidos por la aplicación exógena de un ciclitol sintético (Çevik *et al.*, 2019).

El contenido reducido de ABA en plantas sin estrés hídrico, demostraron que el tratamiento con PEG fue efectivo para inducir la condición simulada de estrés planteada como objetivo en esta investigación; mientras que la acumulación de la fitohormona a concentraciones hasta de $0.48 \mu\text{mol g}^{-1}$ de tejido de tomate fue en general indistinguible en magnitud entre los tratamientos con PEG con o sin aspersión foliar de extracto de *S. portulacastrum* vs el testigo sin estrés que mantuvo valores promedio de $0.11 \mu\text{mol g}^{-1}$.

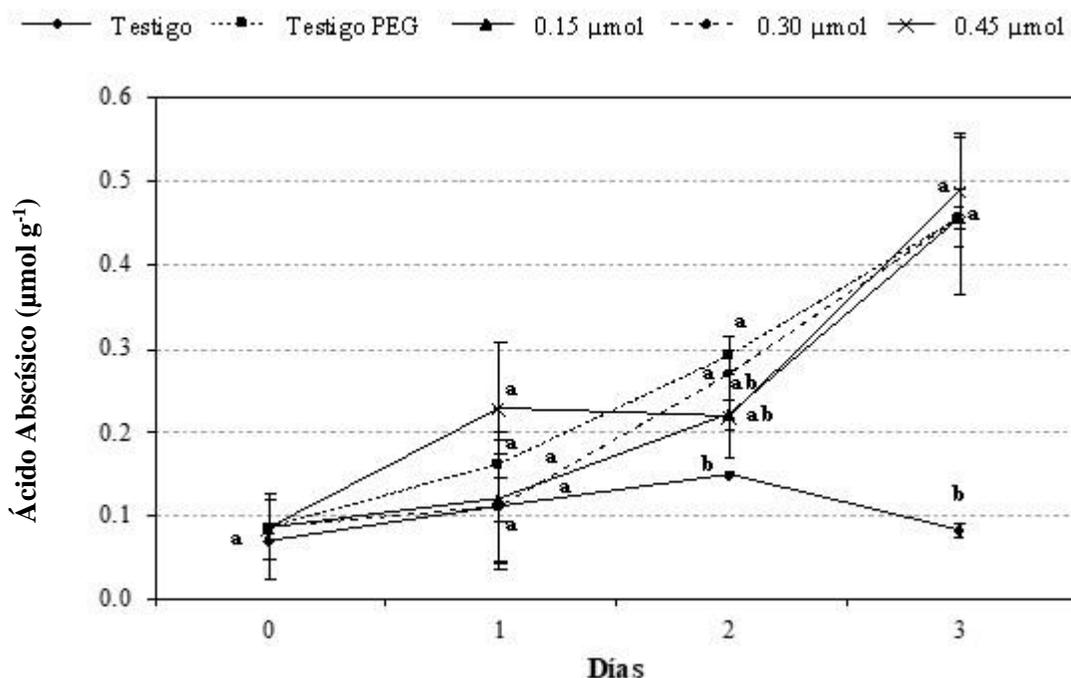


Figura 17. Contenido de ácido abscísico en hojas de plantas de tomate con estrés hídrico inducido y tratadas con diferentes dosis de extracto de *S. portulacastrum*. Las diferencias de medias por días que no comparten letra son significativamente diferentes $p \leq 0.05$.

Achuo *et al.* (2006), reportó la concentración de ácido abscísico en tomate sin estrés de aproximadamente $2500 \text{ picomol g}^{-1}$ y el respectivo aumento por influencia del estrés salino y

notablemente acumulado en concentración superior por efecto del estrés hídrico (2700 y 5100 picomol g⁻¹, respectivamente). Dichos valores son muy inferiores a los encontrados en este estudio, confirmando además tanto las habilidades del material genético de tomate utilizado, como la eficiencia del método inductivo de estrés con PEG 6000.

La acumulación de ABA inducido de solutos compatibles como prolina, puede ser esencial para evitar la deshidratación (Kishor *et al.*, 2005). Dicha fitohormona juega un papel crucial en el desarrollo de estructuras radiculares y se considera como la hormona reguladora de las respuestas al estrés ya que es capaz de coordinar varios aspectos de la respuesta al estrés abiótico; tal como, lo reportan diversos autores al estudiar su relación con el incremento en la tolerancia a estrés por déficit hídrico (Zhang *et al.*, 2005; Peleg *et al.*, 2011; Wilkinson y Davies, 2010; Cramer *et al.*, 2011). En tomate, estudios recientes mostraron que plantas transgénicas tolerantes a la sequía indujeron la sobreexpresión de una dehidrina de tomate (TAS14), y lo que se asoció con un incremento rápido en los niveles de ABA en hojas (Muñoz-Mayor *et al.*, 2008), lo cual corroboró el papel de esta fitohormona en la tolerancia. La acción del ABA puede estar involucrada en la supresión de la producción de etileno (LeNoble *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2007).

7. CONCLUSIONES

Se identificaron colectas de *S. portulacastrum* acumuladoras del ciclitol pinitol en la región costera de Buenavista, Guasave, Sinaloa, cuya concentración de dicho osmolito y potencialmente otros de importancia biológica que utiliza para sus mecanismos de adaptación a condiciones de salinidad y sequía, lo convierten en un potencial recurso natural para estudio en su explotación agroecológico.

El método de mejor arrastre de sólidos para la preparación de extractos de *S. portulacastrum* es con la adición de ácido láctico y etanol, lo cual permite incrementar el arrastre de sólidos solubles potencialmente bioactivos por aplicación exógena en plantas con estrés hídrico.

La inducción de estrés con PEG 6000 fue efectiva para inducir respuestas de osmorregulación en plantas de tomate cultivadas hidropónicamente y la aspersion de pinitol de fuente natural de *S. portulacastrum* a concentración de $0.15\mu\text{mol}$ (denominada dosis baja) fue la condición de bioestimulación de la actividad fisiológica de adaptación al estrés.

De las variables indicadoras fisiológicas de la capacidad de respuesta o de inducción de osmorregulación, fue la capacidad de acumulación de prolina la que presentó un comportamiento sobresaliente en la variedad de tomate y condiciones de bioestimulación probadas. En comparación con las referencias consultadas, Lo anterior sugiere que el material genético utilizado posee una alta capacidad de biosíntesis de dicho aminoácido y que los extractos de *S. portulacastrum* son altamente estimuladores por aplicación exógena foliar. La acumulación de prolina representó el indicador de mayor asociación a la condición de estrés estudiada y su progresividad a través del tiempo de post-inducción de estrés.

8. RECOMENDACIONES

La búsqueda de alternativas para hacer frente a las necesidades de mantener e incrementar la producción de alimentos con base en estrategias con sustentabilidad en la agricultura se encuentra en auge. Los nuevos retos que el cambio climático nos demanda, provoca una tendencia creciente para la definición de nuevas especies o biorecursos con posibilidad de explotarse e integrarse en la cadena de producción de alimentos. Entre los posibles aprovechamientos se encuentra la propuesta de especies vegetales invasivas y halófitas con propiedades de bioestimulación para reducir los impactos del medio ambiente como son la sequía y la salinidad. En ese sentido, este trabajo suma elementos para valorar definiciones más específicas y futuro uso potencial de la planta costera *Sesuvium portulacastrum* o también conocida como verdolaga de mar a quien se le atribuyen numerosas propiedades en ámbitos de la alimentación, salud, medio ambiente y agricultura.

Este trabajo es apenas una aproximación a la caracterización de colectas escasas en la zona costera de Sinaloa, pero contribuye de manera sustancial sus propiedades de osmorregulación en el cultivo de tomate. Se sugiere ampliar el estudio de otras variables indicadoras de su propiedad de bioestimulación, tales como la inducción de malonaldehído (MDA), conocido como indicador del daño por oxidación presentado tanto en estrés hídrico, salino y por temperatura, así como las maquinarias enzimáticas que contrarrestan el estrés oxidativo asociado al estrés abiótico.

La presente investigación, nos permitió avanzar en el conocimiento de los efectos de la aplicación de extractos vegetales a partir de plantas de naturaleza halófitas, que gracias a sus cualidades metabólicas de sobrevivencia en ambientes extremos, proveen de compuestos que nos ayudan a bioestimular a las plantas en la defensa ante el estrés, por lo que recomendamos en próximas investigaciones, la evaluación de dosis menores a $0.15 \mu\text{mol}$ durante un tiempo más prolongado, así como la definición de los efectos específicos que se atribuyen al ciclitol pinitol o la posible presencia de otros metabolitos de importancia biológica en ese tipo de plantas. Experimentalmente, se recomienda modificar las condiciones de pre- y post-inducción de estrés, así como las frecuencias y vías de aplicación de los extractos.

9. REFERENCIAS

- Achuo EA, Prinsen E, Höfte M (2006) Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici*. *Plant Pathology* 55(2): 178-186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01340.x>
- Ahn CH, Hossain MA, Lee E, Kanth BK, Park PB (2018) Increased salt and drought tolerance by D-pinitol production in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 504(1): 315-320. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.183>
- Ahn CH, Park U, Park PB (2011) Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 415(4): 669-674. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.10.134>
- Albersheim P, Nevins D, English P, Karr A (1967) A method for the analysis of sugars implant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate Research* 5: 340-345. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)80510-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)80510-8)
- APHA (2012) Standard methods for the examination of water and wastewater. Edition 22. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF). ISBN 67828. Washington, USA. <https://www.standardmethods.org>
- Argentel L, González LM, Ávila C, Aguilera R (2006) Comportamiento del contenido relativo de agua y la concentración de pigmentos fotosintéticos de variedades de trigo cultivadas en condiciones de salinidad, *Cultivos Tropicales* 27(3): 49-53. <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193215825008.pdf>
- Arteaga S, Yabor L, Díez MJ, Prohens J, Boscaiu M, Vicente O (2020) The use of proline in screening for tolerance drought and salinity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. *Agronomy* 10(817): 1-16. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060817>
- Ashraf M, Foolad MR (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59: 206-216. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006>
- Barrs HD, Weatherley PE (1962) A re-examination of the relative turgidity techniques for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* 15: 413-428. <http://dx.doi.org/10.1071/B19620413>
- Basu S, Ramegowda V, Kumar A, Pereira A (2016) Plant adaptation to drought stress. *F1000 Research* 5: F1000 Faculty Rev-1554. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7678.1>
- Bhargava S, Sawant K (2012). Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding* 132: 21-32. <https://doi.org/10.1111/pbr.12004>
- Bhuiyan NH, Hamada A, Yamada N, Rai V, Hibino T, Takabe T (2007) Regulation of betaine synthesis by precursor supply and choline monooxygenase expression in *Amaranthus tricolor*. *Journal of Experimental Botany* 58(15): 4203-4212. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm278>

- Burciaga-Monge AD (2019) Metabolismo de esteroides esterificados en plantas: implicación en el desarrollo y respuesta al estrés. Tesis de Doctorado en Biotecnología. Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación. Universitat de Barcelona. Barcelona, España. http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/150445/1/ADBM_TESIS.pdf
- Carillo P, Gibon Y (2011) Protocol: Extraction and determination of proline. *PrometheusWiki contributors*. <http://prometheuswiki.publish.csiro.au/tiki-index.php?page=PROTOCOL%3A+Extraction+and+determination+of+proline>
- Chen TH, Murata N (2008) Glycinebetaine: An effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends in Plant Science* 13(9): 499-505. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.06.007>
- Claussen W (2005) Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Science* 168: 241-248. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.07.039>
- CONABIO. Biodiversidad Mexicana. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Consulta 13 de enero de 2022. <https://www.biodiversidad.gob.mx/search?utf8=√&busqueda=basica&id=&q=sesuvium+portulacastrum>
- CONABIO (2015) Método de evaluación rápida de invasividad (MERI) para especies exóticas en México. México D.F. 12 pp. https://www.biodiversidad.gob.mx/media/1/especies/Invasoras/files/Instrutivo_MERI_2020.pdf
- Cortina C, Culiáñez-Macià FA (2005) Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science* 169: 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.02.026>
- Cramer GR, Urano K, Delrot S, Pezzotti M, Shinozaki K (2011) Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology* 11: 163-176. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-163>
- Carvalho R, da Silva MA, Ribeiro MTM, Forti VA (2022) Plant extracts in agriculture and their applications in the treatment of seeds. *Ciência Rural* 52(5): e20210245. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210245>
- Çevik S, Güzel D, Yildizli A, Doğanyığıt N, Gök A, Ünyayar S (2019) Proteomic and physiological analyses of *dl*-cyclopentane-1,2,3-triol-treated barley under drought stress. *Plant Molecular Biology Reporter* 37: 237-251. <https://doi.org/10.1007/s11105-019-01151-8>
- Çevik S, Yildizli A, Yandim G, Göksu H, Gultekin MS, Güzel D, Çelik A, Şimşek K, Ünyayar S (2014) Some synthetic cyclitol derivatives alleviate the effect of water deficit in cultivated and wild-type chickpea species. *Journal of Plant Physiology* 171: 807-816. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2014.01.010>
- Da Silva GJ, de Oliveira AC (2014) Genes acting on transcriptional control during abiotic stress responses. *Advances in Agriculture* 2014: 587070. <https://doi.org/10.1155/2014/587070>
- Datos abiertos SIAP. Estadística de Producción Agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Gobierno de México. <http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php>

- Delauney AJ, Verma DPS (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal* 4(2): 215-223. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04020215.x>
- Dinar A (2016) Theme overview: Water scarcity, food production, and environmental sustainability-can policy make sense?. *Choices*. Quarter 3. <https://www.choicesmagazine.org/choices-magazine/theme-articles/theme-overview-water-scarcity-food-production-and-environmental-sustainabilitycan-policy-make-sense/theme-overview-water-scarcity-food-production-and-environmental-sustainabilitycan-policy-make-sense>
- Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Viña-Ribes J (1998) Functional food science and defense against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition* 80(1): S77-112. <https://doi.org/10.1079/bjn19980106>.
- Dittrich P, Brandl A (1987) Revision of the pathway of D-pinitol formation in leguminosae. *Phytochemistry* 26: 1925-1926. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81730-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81730-6)
- du Jardin P (2015) Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae* 196: 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Etesami H, Beattie GA (2018) Mining halophytes for plant growth-promoting halotolerant bacteria to enhance the salinity tolerance of non-halophytic crops. *Frontiers in Microbiology* 9(148): 1-20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00148>
- FAO (2021a). Ante una población mundial en aumento, debemos asegurarnos de disponer de agua suficiente. https://www.fao.org/fao-stories/article/es/c/1382322/?utm_source=twitter&utm_medium=social+media&utm_campaign=faoenespanol
- FAO (2021b). Rastrear el agua en aras de su pleno aprovechamiento | Historias de la FAO | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <https://www.fao.org/fao-stories/article/es/c/1382322/>
- Feng J, Lin Y, Yang Y, Shen Q, Huang J, Wang S (2018) Tolerance and bioaccumulation of Cd and Cu in *Sesuvium portulacastrum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147: 306-312. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.056>
- Flores J, Ojeda-Bustamante W, López I, Rojano A, Salazar I (2007) Requerimientos de riego para tomate de invernadero. *Terra Latinoamericana* 25(2): 127-134. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57325204>
- Florido-Bacallao M, Bao-Fundora L (2014) Tolerancia a estrés por déficit hídrico en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales* 35(3): 70-88. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193232155008>
- Foolad MR (2007) Tolerance to abiotic stresses. En: Razdan, M. K. y Matoo, A. K. Eds. Genetic improvement of *Solanaceous* crops: Tomato. Science Publishers, Enfield, USA. Vol. 2, 521-590 pp.
- Fujita T, Maggio A, Rio MG, Stauffache C, Bressan RA, Csonka LN (2003) Identification of regions of the tomato γ -glutamyl kinase that are involved in allosteric regulation by proline. *Journal of Biological Chemistry* 278(16): 14203-14210.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M212177200>

- Fujiwara T, Hori K, Ozaki K, Yokota Y, Mitsuya S, Ichianagi T, Hattori T, Takabe T (2008) Enzymatic characterization of peroxisomal and cytosolic betaine aldehyde dehydrogenases in barley. *Physiologia Plantarum* 134: 22-30. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01122.x>
- Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala AP, Do-Choi Y, Kochian LV, Wu RJ (2002) Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of de United States of America* 99(25): 15898-15903. <https://doi.org/10.1073/pnas.252637799>
- Gerszberg A, Hnatuszko-Konka K (2017) Tomato tolerance to abiotic stress: a review of most often engineered target sequences. *Plant Growth Regulation* 83: 175-198. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0251-x>
- Ghnaya T, Nouairi I, Slama I, Messedi D, Grignon C, Abdelly C, Ghorbel MH (2005) Cadmium effects on growth and mineral nutrition of two halophytes: *Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum*. *Journal of Plant Physiology* 162(10): 1133-1140. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.11.011>
- Ghnaya T, Slama I, Messendi D, Grignon C, Ghorbel MH, Abdelly C (2007) Effect of Cd²⁺ on K⁺, Ca⁺ and N uptake in two halophytes *Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum*: consequences on growth. *Chemosphere* 67: 72-79. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.09.064>
- Goel D, Singh AK, Yadav V, Babbar SB, Bansal KC (2010) Overexpression of osmotin gene confers tolerance to salt and drought stresses in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Protoplasma* 245(1-4): 133-141. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0158-0>
- Gutiérrez-Segura J (2018) Halófitas como alternativa en la fitorremediación, producción agrícola y otros usos. Universidad de Jaén Facultad de Ciencias Experimentales. http://tauja.ujaen.es/jspui/bitstream/10953.1/8697/1/TFG_Gutierrez_Segura_Jose.pdf
- Heuer B (2003) Influence of exogenous application of proline and glycine betaine on growth of salt-stressed tomato plants. *Plant Science* 165: 693-699. <https://doi.org/10.1007/s12298-015-0292-4>
- Hosseini SA, Réthoré E, Pluchon S, Ali N, Billiot B, Yvin JC (2019) Calcium application enhances drought stress tolerance in sugar beet and promotes plant biomass and beetroot sucrose concentration. *International Journal of Molecular Sciences* 20(15): 3777. <https://doi.org/10.3390/ijms20153777>
- Hu H, Xiong L (2014) Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. *Annual Review of Plant Biology* 56: 715-741. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040000>
- Hu L, Zhou K, Yang S, Liu Y, Li Y, Zhang Z, Zhang J, Gong X, Ma F (2020) MdINT1 enhances apple salinity tolerance by regulating the antioxidant system, homeostasis of ions and osmosis. *Plant Physiology and Biochemistry* 154: 689-698. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.06.041>
- IICA (2015) Innovación y gestión del agua para el desarrollo sostenible en la agricultura:

documento para ser presentado por la Dirección General del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura ante la Junta Interamericana de Agricultura (JIA). México. Septiembre de 2015. San José, Costa Rica. 104 p. ISBN:978-92-9248-581-8. https://www.redinnovagro.in/pdfs/gestion_del_agua.pdf.

- Imadi SR, Gul A, Dikilitas M, Karakas S, Sharma I, Ahmad P (2016) Water stress. Types, causes, and impact on plant growth and development. Chap. 21. In: Ahmad P (ed). *Water Stress and Crop Plants: A Sustainable Approach*. <https://doi.org/10.1002/9781119054450.ch21>
- Isah T (2019) Stress and defense responses in plant secondary metabolite production. *Biological Research* 52: 39. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>
- Ishitani M, Majumder AL, Bornhouser A, Michalowski CB, Jensen RG, Bohnert, HJ (1996) Coordinate transcriptional induction of myo-inositol metabolism during environmental stress. *The Plant Journal* 9(4): 537-548. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1996.09040537.x>
- Isman MB, Grieneisen ML (2014) Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. *Trends in Plant Science* 19(3): 140-145. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.11.005>
- Jefferies RL (1981) Osmotic adjustment and the response of halophytic plants to salinity. *BioScience* 31(1): 42-46. <https://doi.org/10.2307/1308177>
- Kahlaoui B, Hachicha M, Misle E, Fidalgo F, Teixeira J (2018) Physiological and biochemical responses to the exogenous application of proline of tomato plants irrigated with saline water. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 17(1): 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.12.002>
- Kannan PR, Deepa S, Kanth SV, Rengasamy R (2013) Growth, osmolyte concentration and antioxidant enzymes in the leaves of *Sesuvium portulacastrum* L. under salinity stress. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 171: 1925-1932. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0475-9>
- Kaur D, Grewal SK, Kaur J, Singh S, Singh I (2016) Water deficit stress tolerance in chickpea is mediated by the contribution of integrative defense systems in different tissues of the plant. *Functional Plant Biology* 43(10): 903-918. <https://doi.org/10.1071/FP16062>
- Kishor PBK, Sangam S, Amrutha RN, Laxmi PS, Naidu KR, Rao KRSS, Rao S, Reddy KJ, Theriappan P, Sreenivasulu N (2005) Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* 88: 424-438. <http://www.jstor.org/stable/24110209>
- Kocira S, Szparaga A, Krawezuk A, Bartoš P, Zagula G, Plawgo M, Cerný P (2021) Plant material as a novel tool in designing and formulating modern biostimulants — Analysis of botanical extract from *Linum usitatissimum* L. *Materials* 14(21): 6661. <https://doi.org/10.3390/ma14216661>
- Krasensky J, Jonak C (2012) Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany* 63(4): 1593-1608. <https://doi.org/10.1093/jxb/err460>
- Ksouri R, Megdiche W, Falleh H, Trabelsi N, Boulaaba M, Smaoui A, Abdelly C (2008)

- Influence of biological, environmental, and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Comptes Rendus Biologies* 331(11): 865-873. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.07.024>
- Kumar RR, Karajol K, Naik GR (2011) Effect of polyethylene glycol induced water stress on physiological and biochemical responses in pigeonpea (*Cajanus Cajan* L. Millsp.). *Recent Research of Science and Technology* 3(1):148-152. <https://updatepublishing.com/journal/index.php/rrst/article/view/565>
- Kumari A, Das P, Parida AK, Agarwal PK (2015) Proteomics, metabolomics, and ionomics perspectives of salinity tolerance in halophytes. *Frontiers in Plant Science* 29(6): 537. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00537>
- Lee DK, Jung H, Jang G, Jeong JS, Kim YS, Ha SH, Kim JK (2016) Overexpression of the OsERF71 transcription factor alters rice root structure and drought resistance. *Plant Physiology* 172(1): 575-588. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00379>
- Lei W, Huang S, Tang S, Shui X, Chen C (2016) Determination of abscisic acid and its relationship to drought stress based on cowpea varieties with different capability of drought resistance. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 12(1): 79-85. <https://doi.org/10.3844/ajbb.2016.79.85>
- LeNoble ME, Spollen WG, Sharp RE (2004) Maintenance of shoot growth by endogenous ABA: genetic assessment of the involvement of ethylene suppression. *Journal of Experimental Botany* 55(395): 237-245. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh031>
- Lokhande VH, Gor B, Desai N, Nikam T, Suprasanna P (2012) *Sesuvium portulacastrum*, a plant for drought, salt stress, sand fixation, food and phytoremediation: A review. *Agronomy for Sustainable Development* 33(2): 329-348. <https://doi.org/10.1007/s13593-012-0113-x>
- Lokhande VH, Nikam TD, Parade VY, Suprasanna P (2009) Morphological and molecular diversity analysis among the Indian clones of *Sesuvium portulacastrum* L. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56: 705-717. <https://doi.org/10.1007/S10722-008-9396-9>
- Lokhande VH, Nikam TD, Penna S (2010a) Biochemical, physiological and growth changes in response to salinity in callus cultures of *Sesuvium portulacastrum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 102: 17-25. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9699-3>
- Lokhande VH, Nikam TD, Penna S (2010b) Differential osmotic adjustment to iso-osmotic salt and PEG stress *in vitro* in the halophyte *Sesuvium portulacastrum* L. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 13(4): 251-256. <https://doi.org/10.1007/s12892-010-0008-9>
- Lonard RI, Judd FW (1997) The biological flora of coastal dunes and wetlands. *Sesuvium portulacastrum* (L.) L. *Journal of Coastal Research* 13(1): 96-104. <https://journals.flvc.org/jcr/article/view/80108>
- Luetge U, Popp M, Medina E, Cram WJ, Diaz M, Griffiths H, Lee HSJ, Schaefer C, Smith JAC, Stimmel KH (1989) Ecophysiology of xerophytic and halophytic vegetation of a coastal alluvial plain in northern Venezuela. V. The *Batis maritime*-*Sesuvium portulacastrum* vegetation unit. *New Phytologist* 111(2): 283-291. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1989.tb00692.x>
- Ma Y, Dias MC, Freitas H (2020) Drought and salinity stress responses and microbe-induced

- tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science* 11(591911): 1-18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.591911>
- Magwaza LS, Opara UL (2015) Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products— A review. *Scientia Horticulturae* 184: 179-192. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.01.001>
- Makela P, Jokinen K, Kontturi M, Peltonen-Sainio P, Pehu E, Somersalo S (1998a) Foliar application of glycine betaine- a novel product from sugar beet as an approach to increase tomato yield. *Indus Crops Products* 7: 139-148. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(97\)00042-3](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(97)00042-3)
- Makela P, Munns R, Colmer TD, Condon AG, Peltonen-Sainio P (1998b) Effect of foliar applications of glycine betaine on stomatal conductance, abscisic acid and solute concentration in leaves of salt- or drought-stressed tomato. *Australian Journal of Plant Physiology* 25: 655-663. <https://doi.org/10.1071/PP98024>
- Martinez ML, Valverde T, Moreno-Casasola P (1992) Germination response to temperature, salinity light and depth of sowing of ten tropical dune species. *Oecologia* 92: 343-353. <https://doi.org/10.1007/BF00317460>
- Mattioli R, Constantino P, Trovato M (2009) Proline accumulation in plants (Not only stress). *Plant Signaling & Behavior* 4(11): 1016-1018. <https://doi.org/10.4161/psb.4.11.9797>
- Meher-Shivakrishna P, Ashok-Reddy K, Manohar-Rao D (2018). Effect of PEG-6000 imposed drought stress on RNA content, relative water content (RWC), and chlorophyll content in peanut leaves and roots. *Saudi Journal of Biological Sciences* 25(2): 285-289. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.04.008>
- Messedi D, Labidi N, Grignon C, Abdelly C (2004) Limits imposed by salt to the growth of the halophyte *Sesuvium portulacastrum*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 167: 720-725. <https://doi.org/10.1002/jpln.200420410>
- Michel BE, Kaufmann MR (1973) The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 51(5): 914-916. <https://doi.org/10.1104/pp.51.5.914>
- Misra N, Gupta AK (2005) Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram. *Plant Science* 169: 331-339. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.02.013>
- Mitsuya S, Kuwahara J, Ozaki K, Saeki E, Fujiwara T, Takabe T (2011) Isolation and characterization of a novel peroxisomal choline monooxygenase in barley. *Planta* 234(6): 1215-1226. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1478-9>
- Moreno LP (2009) Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana* 27(2): 179-191. <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v27n2/v27n2a06.pdf>
- Moseki B, Buru JC (2010) Ionic and water relations of *Sesuvium portulacastrum* (L). *Scientific Research and Essay* 5(1): 35-40. <http://www.academicjournals.org/SRE>
- Muñoz-Mayor A, Pineda B, García-Abellán JO, Garcia-Sogo B, Moyano E, Atares A, Vicente-Agulló F, Serrano R, Moreno V, Bolarin MC (2008) The HAL1 function on Na⁺ homeostasis is maintained over time in salt-treated transgenic tomato plants, but the high reduction of Na⁺ in leaf is not associated with salt tolerance. *Physiologia Plantarum* 133(2):

- 288-297. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01060.x>
- Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allakhverdiev SI (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767(6): 414-421. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.11.019>
- Nakamura T, Ishitani M, Harinasut P, Nomura M, Takabe T, Takabe T (1996) Distribution of glycinebetaine in old and young leaf blades of salt-stressed barley plants. *Plant and Cell Physiology* 37(6): 873-877. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029026>
- Nakamura T, Nomura M, Mori H, Jagendorf AT, Ueda A, Takabe T (2001) An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. *Plant and Cell Physiology* 42: 1088-1092. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce136>
- Nakamura T, Yokota S, Muramoto Y, Tsutsui K, Oguri Y, Fukui K, Takabe T (1997) Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *The Plant Journal* 11(5): 1115-1120. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11051115.x>
- Nankishore A, Farrell AD (2016) The response of contrasting tomato genotypes to combined heat and drought stress. *Journal of Plant Physiology* 202: 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.07.006>
- Nilsen ET, Orcutt DM (1996) Physiology of plants under stress. Abiotic factors. *The Quarterly Review of Biology* 72(4): 476. <https://doi.org/10.1086/419999>
- Ohnishi N, Murata N (2006) Glycinebetaine counteracts the inhibitory effects of salt stress on the degradation and synthesis of D1 protein during photoinhibition in *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Plant Physiology* 141(2): 758-765. <https://doi.org/10.1104/pp.106.076976>
- Ortiz M, Silva H, Silva P, Acevedo E (2003) Estudio de parámetros hídricos foliares en trigo (*Triticum aestivum* L.) y su uso en selección de genotipos resistentes a sequía. *Revista Chilena de Historia Natural* 76: 219-233. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2003000200008>
- Papageorgiou GC, Murata N (1995) The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosynthesis Research* 25: 243-252. <https://doi.org/10.1007/BF00048597>
- Passioura JB (1996) Drought and drought tolerance. *Plant Growth Regulation* 20: 79-83. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1299-6_1
- Paul MJ, Cockburn W (1989) Pinitol, a compatible solute in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Journal of Experimental Botany* 40(129): 1093-1098. <https://doi.org/10.1093/jxb/40.10.1093>
- Pavela R (2016) History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects – A review. *Plant Protection Science* 52(4): 229-241. <https://doi.org/10.17221/31/2016-PPS>
- Peleg Z, Apse MP, Blumwald E (2011) Engineering salinity and water-stress tolerance in crop plants: getting closer to the field. *Advances in Botanical Research* 57: 405-443. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387692-8.00012-6>
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK, (2007) Stress-induced morphogenic

- responses: growing out of trouble?. *Trends in Plant Science* 12(3): 98-105. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.01.004>
- Ragab ME, Helal NAS, Sawan OM, Fawzy ZF, El-Bassiony AM, El-Sawy SM (2018) Increasing the productivity of tomato plants grown in sandy soil under deficit irrigation water conditions. *Research & Reviews: Journal of Agriculture and Allied Sciences* 7(2): 77-88. <https://www.rroij.com/open-access/increasing-the-productivity-of-tomato-plants-grown-in-sandy-soil-under-deficit-irrigation-water-conditions.pdf>
- Rahman M, Mostofa MG, Keya SS, Siddiqui N, Udin-Ansary M, Kumar-Das A, Rahman A, Tran LSP (2021) Adaptative mechanisms of halophytes and their potential in improving salinity tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 22(10733):1-28. <https://doi.org/10.3390/ijms221910733>
- Rai MK, Kalia RK, Singh R, Gondola MP, Dhawan AK (2011) Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection– An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany* 71(1): 89-98. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.10.021>
- Ramani B, Reeck T, Debez A, Stelzard R, Huchzermeyera B, Schmidt A, Papenbrock J (2006) *Aster tripolium* L. and *Sesuvium portulacastrum* L: two halophytes, two strategies to survive in saline habitats. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 395-408. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.06.007>
- Rehem BC, Bertolde FZ, de Almeida AF (2012) Regulation of Gene Expression in Response to Abiotic Stress in Plants. Chap. 2. In Bubulya P (ed.). Cell Metabolism - Cell Homeostasis and Stress Response. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/26636>
- Rezaei MA, Jokar I, Ghorbanli M, Kaviani B, Kharabian-Masouleh A (2012) Morphophysiological improving effects of exogenous glycine betaine on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. PS under drought stress conditions. *Plant Omics Journal* 5(2):79-86. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1084.8168&rep=rep1&type=pdf>.
- Rijsberman FR (2006) Water scarcity: Fact or fiction?. *Agricultural Water Management* 80(1-2): 5-22. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2005.07.001>
- Roelfsema MR, Hanstein S, Felle HH, Hedrich R (2002) CO₂ provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *Plant Journal* 32(1): 65-75. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01403.x>
- Rosenzweig C, Jones JW, Hatfield JL, Ruane AC, Boote KJ, Thorburn P, Antle JM, Nelson GC, Porter C, Janssen S, Asseng S, Basso B, Ewert F, Wallach D, Baigorría G, Winter JM (2013) The agricultural model intercomparison and improvement project (AgMIP): protocols and pilot studies. *Agricultural and Forest Meteorology* 170(15): 166-182. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2012.09.011>
- Sairam RK, Tyagi A, Chinnusamy V (2006) Salinity tolerance: cellular mechanisms and gene regulation. Chap. 6. In: Huang B (ed). Plant-Environment Interactions (Third ed.). CRC Press, Boca Raton, FL. <https://doi.org/10.1201/9781420019346>
- Sakya AT, Sulistyaningsih E, Indradewa D, Purwanto BH (2018) Physiological characters and tomato yield under drought stress. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 200: 012043. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/200/1/012043>

- Sbartai H, Djebbar MR, Sbartai I, Berrabbah H (2012) Bioaccumulation of cadmium and zinc in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Comptes Rendus Biologies* 335(9): 585-593. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2012.08.001>
- Sengupta S, Patra B, Ray S, Majumder AL (2008) Inositol methyl transferase from a halophytic wild rice, *Porteresia coarctata* Roxb. (Tateoka): regulation of pinitol synthesis under abiotic stress. *Plant Cell & Environment* 31(10): 1442-1459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01850.x>
- Shahzad M, Yar-Abbasi K, Shahzad A, Zaidi F (2019) Effect of glycine betaine on morphological and physiological attributes of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) cultivars under saline conditions. *Journal of Horticulture and Plant Research* 8: 22-29. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/jhpr.8.22>
- Shao HB, Chu LY, Jaleel CA, Zhao ChX (2008) Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies* 331(3): 215-225. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.01.002>
- Sharma HS, Fleming C, Selby C, Rao JR, Martin T (2013) Plant biostimulants: A review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *Journal of Applied Phycology* 26(1): 465-490. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0101-9>
- Slama I, Messedi D, Ghnaya T, Savouré A, Abdelly C (2006) Effects of water-deficit on growth and proline metabolism in *Sesuvium portulacastrum*. *Environmental and Experimental Botany* 56: 231-238. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.02.007>
- Slama I, Abdelly C, Bouchereau A, Flowers T, Savouré A (2015) Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Annals of Botany* 115(3): 433-447. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu239>
- Streeter JG (1985) Identification and distribution of ononitol in nodules of *Pisum sativum* and *Glycine max*. *Phytochemistry* 24(1): 174-176. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80831-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80831-6)
- Streeter JG, Lohnes DG, Fioritto RJ (2001) Patterns of pinitol accumulation in soybean plants and relationships to drought tolerance. *Plant Cell and Environment* 24(4): 429-438. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00690.x>
- Szabados L, Savouré A (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15(2): 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>
- Takabe T, Rai V, Hibino T (2006) Metabolic engineering of glycinebetaine. Chap. 9. In: Rai AR, Takabe T (eds). *Abiotic stress tolerance in plants*. Springer, Dordrecht. https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F1-4020-4389-9_9
- Takahashi F, Kuromori T, Urano K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2020) Drought stress responses and resistance in plants: From cellular responses to long-distance intercellular communication. *Frontiers in Plant Science* 11(556972):1-14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.556972>
- Tamayo-Ruiz LE, Rivera-Ortiz P, Neri-Ramírez E (2020) Producción de tomate con bajo volumen de agua para riego. *CIENCIA UANL* 23(99): enero-febrero.

<http://cienciauanl.uanl.mx/?p=9653>

- Tarczynski MC, Jensen RG, Bohnert HJ (1993) Stress protection of transgenic plants by production of the osmolyte mannitol. *Science* 259(5094): 508-510. <https://doi.org/10.1126/science.259.5094.508>
- Thompson AJ, Andrews J, Mulholland, BJ, McKee JMT, Hilton HW, Horridge JS, Farquhar GD, Smeeton RC, Smillie IRA, Black, CR, Taylor IB (2007) Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion. *Plant Physiology* 143:1905-1917. <https://doi.org/10.1104/pp.106.093559>
- Uddin MM, Chen Z, Huang L (2020) Cadmium accumulation, subcellular distribution and chemical fractionation in hydroponically grown *Sesuvium portulacastrum* [Aizoaceae]. *PLoS ONE* 15(12): e0244085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244085>
- Valluru R, Van den Ende W (2011) Myo-inositol and beyond – Emerging networks under stress. *Plant Science* 181: 387-400. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.07.009>
- Van Oosten MJ, Pepe O, De Pascale S, Silletti S, Maggio A (2017) The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 4(5): 1-12. <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>
- Verbruggen N, Hermans C (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35: 753-759. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0061-6>
- Vernon DM, Bohnert HJ (1992) A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *The EMBO Journal* 11(6): 2077-2085. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05266.x>
- Viscarra-Rossel RA, Bouma J (2016) Soil sensing: A new paradigm for agriculture. *Agricultural Systems* 148: 71-74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agsy.2016.07.001>
- Wang Z, Yang Y, Yadav V, Zhao W, He Y, Zhang X, Wei Ch (2022) Drought-induced proline is mainly synthesized in leaves and transported to roots in watermelon under water deficit. *Horticultural Plant Journal* 8(5): 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2022.06.009>
- Weber H, Chételat A, Reymond P, Farmer EE (2004) Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. *Plant Journal* 37: 877-888. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2003.02013.x>
- Wilkinson S, Davies WJ (2010) Drought, ozone, ABA and ethylene: New insights from cell to plant to community. *Plant, Cell & Environment* 33(4): 510-525. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02052.x>
- Ximénez-Embún MG, González-Guzmán M, Arbona V, Gómez-Cadenas A, Ortego F, Castañera P (2018) Plant-mediated effects of water deficit on the performance of *Tetranychus evansi* on tomato drought-adapted accessions. *Frontiers in Plant Science* 9: 1490. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01490>
- Yamada N, Promden W, Yamane K, Tamagake H, Hibino T, Tanaka Y, Takabe T (2009) Preferential accumulation of betaine uncoupled to choline monooxygenase in young leaves of sugar beet-importance of long-distance translocation of betaine under normal and salt-stressed conditions. *Journal of Plant Physiology* 166(18): 2058-2070. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.06.016>

- Yang J, Tan JN, Gu Y (2012) Lactic acid as an invaluable bio-based solvent for organic reactions. *Green Chemistry* 12(12): 3304-3317. <https://doi.org/10.1039/C2GC36083G>
- Yang X, Liang Z, Wen X, Lu C (2008) Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine leads to increased tolerance of photosynthesis to salt stress in transgenic tobacco plants. *Plant Molecular Biology* 66(1-2): 73-86. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9253-9>
- Yang X, Lu C (2005) Photosynthesis is improved by exogenous glycine betaine in salt-stressed maize plants. *Physiologia Plantarum* 124: 343-352. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00518.x>
- Yemm EW, Willis AJ (1954) The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemistry Journal* 57: 508-514. <https://doi.org/10.1042/bj0570508>
- Yildizli A, Çevik S, Ünyayar S (2017) Effects of exogenous myo-inositol on leaf water status and oxidative stress of *Capsicum annuum* under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 40(122): 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2690-z>
- Yuan F, Guos J, Shabala S, Wang B (2019) Reproductive physiology of halophytes: Current standing. *Frontiers in Plant Science* 9(1954): 1-13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01954>
- Zeng F, Shabala S, Dragišić-Maksimović J, Maksimović V, Bonales-Alatorre E, Shabala L, Yu M, Zhang G, Živanović BD (2018) Revealing mechanisms of salinity tissue tolerance in succulent halophytes: A case study for *Carpobrotus rossi*. *Plant Cell Environment* 41(11): 2654-2667. <https://doi.org/10.1111/pce.13391>
- Zhang X, Zhang Z, Chen J, Chen Q, Wang X, Huang R (2005) Expressing TERF1 in tobacco enhances drought tolerance and abscisic acid sensitivity during seedling development. *Planta* 222(3): 494-501. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1564-y>