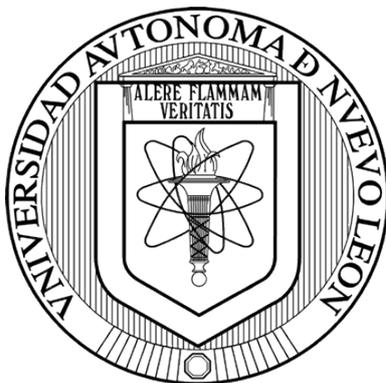


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFECTO DE LA APLICACIÓN DE YODO SOBRE EL METABOLISMO REDOX
Y EXPRESIÓN GÉNICA EN TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)

Por

JULIA ROSA MEDRANO MACÍAS

Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ACENTUACIÓN EN MANEJO Y ADMINISTRACIÓN
DE RECURSOS VEGETALES

NOVIEMBRE, 2017

**EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE YODO SOBRE EL METABOLISMO
REDOX Y EXPRESIÓN GÉNICA EN TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)**

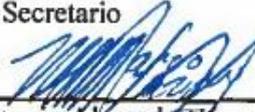
Comité de Tesis



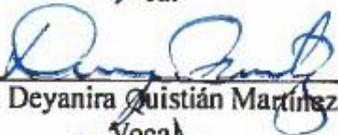
Dra. Alejandra Rocha Estrada
Presidente



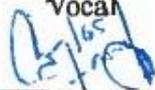
Dr. Rahim Foroughbakchik Pournavab
Secretario



Dr. Marco Antonio Alvarado Vazquez
Vocal



Dra. Deyanira Quistián Martínez
Vocal



Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
Vocal

**EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE YODO SOBRE EL METABOLISMO
REDOX Y EXPRESIÓN GÉNICA EN TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)**

Dirección de Tesis

Dra. Alejandra Rocha Estrada
Director

Dr. Adalberto Benavides Mendoza
Director externo

AGRADECIMIENTOS

Gracias al bien infinito, por permitirme culminar este proyecto que tantas satisfacciones le ha traído a mi vida, por todo lo aprendido, por todo lo sufrido, por todo lo logrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca no. 304747 y así darme la oportunidad de adentrarme en el maravilloso mundo de la investigación, herramienta crucial para el desarrollo de tecnológico y científico de nuestro país.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por haberme brindado la oportunidad de ver al mundo desde otra perspectiva, desde otro ángulo, el lado biológico, el cual complementa de manera crucial mi formación científica.

A la Universidad Agraria Antonio Narro, por haberme permitido tomar desde el primer momento de mi vida profesional, tantas enseñanzas, conocimiento, sensaciones y satisfacción.

A mis asesores y maestros que desde su particularidad muestran una nueva rendija al enorme y vasto mundo de la ciencia.

A mí estimado asesor, jefe y padre en la ciencia Dr. Adalberto Benavides Mendoza, con el cual, hasta en una charla informal se convierte en un aprendizaje invaluable.

Gracias a mi motor e inspiración en la vida: Mi hija Fátima y mi esposo Cuauhtémoc. Por ellos todo toma sentido.

A mis papas, hermanos, tías y abuela. Cada uno de ellos aporta una pieza invaluable que complementa mi ser.

Agradezco a mis amigos, a los que hasta la fecha forman parte de mi vida y a los que nos hemos separado durante el camino, todos en algún modo, me han enriquecido y ayudado a forjar lo que ahora soy.

DEDICATORIA

A la fuerza infinita del bien, que me permite recoger la inspiración y motivación cada día.

A mí querido esposo Cuauhtémoc Rivera García, por su apoyo y paciencia ilimitada.

A mi hija Fátima, que a escasos 3 años de estar en mi vida ha sido mi más grande motivación e inspiración.

A mis padres David y María Elena, por mostrarme desde su trinchera la importancia de culminar los objetivos trazados.

A mis hermanos David, Elena y Yesica por echarme porras en todo momento.

A mi queridísima abuela Julia, un símbolo viviente de perseverancia y fe.

A mis amadas tías Chely, Cecy, Francis, Yola y Norma.

A mi gran inspiración en la ciencia y amigo invaluable Dr. Gerardo de Jesús Sosa Santillán.

A mí apreciado asesor, porque desde el primer instante que charlamos ha sido una fuente de conocimiento constante, ¡muchas gracias por todo doc! Dr. Adalberto Benavides Mendoza.

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	3
OBJETIVOS	4
HIPÓTESIS	5
ANTECEDENTES	6
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Etapa1- Determinación del crecimiento, antioxidantes y expresión genética en plántulas de tomate	19
Material biológico	19
Condiciones de crecimiento	19
Fertilización	20
Tratamientos	20
Muestreo	21
<i>Evaluación de variables de crecimiento</i>	21
Biomasa	21
Altura	21
Número de hojas	21
<i>Evaluación de antioxidantes</i>	22
Extracción	22
Cuantificación de proteínas	22
Actividad Catalasa	22
Actividad Superóxido dismutasa	23
Actividad Glutación peroxidasa	23
Actividad Ascorbato peroxidasa	24
Determinación de Glutación	24
Determinación Fenoles totales	25
Determinación de Ascórbico	25
<i>Análisis de expresión génica</i>	26
Extracción del ARN	26
Cuantificación del ARN	26
Calidad del ARN	26
Síntesis del cDNA	27
Reacción en cadena de la polimeraza	27
Electroforesis horizontal	28
Análisis semi-cuantitativo	29
Análisis estadístico	29
Etapa 2- Determinación del crecimiento, antioxidantes y contenido mineral en plantas adultas de tomate	30

Material biológico	30
Condiciones de crecimiento	30
Trasplante	30
Tratamientos	31
Muestreo	31
<i>Evaluación de variables de crecimiento</i>	32
<i>Evaluación de antioxidantes</i>	32
Potencial oxido reductor	32
Potencial antioxidante	32
<i>Análisis de minerales</i>	32
Análisis estadístico	33
RESULTADOS	34
Etapa1- Determinación del crecimiento, antioxidantes y expresión genética en plántulas de tomate	34
<i>Variables de crecimiento</i>	34
Biomasa	34
Altura	35
Número de hojas	35
<i>Evaluación de antioxidantes</i>	36
<i>Expresión de expresión génica</i>	38
Calidad del ARN	38
Análisis semicuantitativo del gen Cat	38
Análisis semicuantitativo del gen Sod	39
Etapa 2- Determinación del crecimiento, antioxidantes y contenido mineral en plantas adultas de tomate	41
<i>Variables de crecimiento</i>	41
<i>Antioxidantes y minerales</i>	44
Hojas	44
Frutos	48
DISCUSIONES	52
CONCLUSIONES	64
PERSPECTIVA	65
LITERATURA CITADA	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Ciclo biogeoquímico del yodo	7
2	Esquema del metabolismo antioxidante del yodo en algas	23
3	Esquematación del principio de la cuantificación de la actividad enzimática SOD	24
4	Mecanismo de detección del glutatión mediante DTNB para la cuantificación de la actividad enzimática glutatión peroxidasa.	34
5	Comparación de la biomasa de las plántulas tratadas con yodo	35
6	Comparación de la altura de las plántulas tratadas con yodo	36
7	Comparación del número de hojas de las plántulas tratadas con yodo y las testigos.	38
8	Electroforesis para la verificación de la calidad del ARN en las hojas d las plántulas de tomate liofilizadas	39
9	Electroforesis para la semi-cuantificación del gen CAT	40
10	Electroforesis para la semi-cuantificación del gen SOD	43
11	Gráficas biplots de los componentes principales para las variables de crecimiento de las plantas de Tomate.	47
12	Gráficas biplots de los componentes principales para las variables de antioxidantes y minerales en hojas.	51
13	Gráficas biplots de los componentes principales para las variables de antioxidantes y minerales en frutos	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Contenido de yodo en algunas rocas comunes.	8
2	Componentes de la solución nutritiva de Steiner	20
3	Concentración de aplicación de la solución de yodo	21
4	Especificaciones de la mezcla de reacción para la cuantificación de catalasa	22
5	Mezcla de reacción para la cuantificación de fenoles totales	25
6	Condiciones cromatográficas para la cuantificación del ácido ascórbico	25
7	Mezcla de reacción para la realización de PCR	27
8	Descripción de los primers de los genes	28
9	Descripción de la aplicación de tratamientos de yodo mediante factores y niveles empleados en las plantas	31
10	Comparación de los resultados obtenidos en los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos de las plántulas tratadas con yodo y los testigo	37
11	Comparación entre las tendencias al incremento y decremento en las variables de crecimiento.	41
12	Valores de los componentes principales para las variables de crecimiento de las plantas de tomate	42
13	Comparación entre las tendencias al incremento y decremento en las variables de antioxidantes y minerales en hojas	45
14	Valores de los componentes principales para las variables de antioxidantes y minerales en hojas.	46
15	Comparación entre las tendencias al incremento y decremento en las variables de antioxidantes y minerales en frutos.	49
16	Valores de los componentes principales para las variables de antioxidantes y minerales en frutos.	50

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.

SÍMBOLO O ABREVIATURA	SIGNIFICADO
KI	Yoduro de potasio
KIO ₃	Yodato de potasio
SOD	Superóxido dismutasa
CAT	Catalasa
APX	Ascorbato peroxidasa
GPX	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación
ASC	Ascorbato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
μM	Micro molar
DDY	Desórdenes por deficiencias de yodo
CH ₃ I	Yoduro de metilo
CH ₂ I ₂	Di yoduro de metilo
I ₂	Yodo elemental
I ₂ O ₂	Dióxido de yodo
I ₂ O ₃	Trióxido de yodo
I ₂ O ₄	Tetraóxido de yodo
I ₂ O ₅	Pentaóxido de yodo
O ₃	Ozono
CH ₂ ICOO ⁻	Acetato de yodo
Eh	Potencial oxidoreductivo
pH	Potencial de hidrógeno
HMT	Haluro metil transferasa
HTMT	Halouro tiometil transferasa
SAM	Adenosil metionina
HIO	Ácido hipoyodoso
IO ₂	Yodito
IO ₃	Yodato
IO ₄	Peryodato
Redox	Oxido reductivo
H ₂ O ₂	Peróxido
V-IPO	Yodoperoxidasa dependiente de vanadio
OH-	Ion hidroxilo
OH·	Radical hidroxilo
O ₂ ⁻	Radical superóxido
¹ O ₂	Radical Hidroxilo
ROS	Especies reactivas del oxígeno
W m ⁻²	Watt por metro cuadrado
CE	Conductividad eléctrica
WST	Salt de tetrazolio
XO	Xantina oxidasa
X	Xantina
UV-VIS	Ultravioleta-visible
DTNB	Acido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzónico
Na ₂ HPO ₄	Fosfato acido de sodio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
ARN	Ácido ribonucleico

ADN	Ácido desoxiribonucleico
DEPC	Dietil pirocarbonato
MOPS	3(n-morfolino) ácido propanesulfónico
NCBI	National Center for Biotechnology information
EDTA	Ácido etilendiaminotetra acético
USDA	U.S. departamento of Agriculture
ORP	Potencial oxido reductor
PA	Potencial antioxidante
DPPH	2,2 di fenil-1-picrilhidrazil
ANSA	Ácido aminonaftolsulfónico
ACP	Análisis de componentes principales
CP	Componente principal
G3F	Gliceraldehido 3- fosfato
DHA	Dehidroascorbato
ASC T	Ascorbato total

RESUMEN

El yodo es un elemento catalogado como no esencial para las plantas terrestres, pero para los humanos es esencial en el metabolismo de la tiroides y desarrollo de habilidades cognitivas; por lo que un gran número de investigaciones se han llevado a cabo con el propósito de incrementar la concentración del yodo en plantas de amplio consumo, obteniéndose buenos resultados como los demostrados en papa, col, tomate, lechuga, espinaca entre otras. Logrando un gran potencial para mitigar el déficit en la ingesta de este elemento. Adicionalmente y de modo poco explorado se ha observado que la absorción de yodo, induce efectos benéficos relacionados con un incremento en el crecimiento, capacidad antioxidante y tolerancia a estrés oxidativo en las plantas terrestres. Por lo que esta faceta del uso del yodo pudiera incentivar el interés del uso agronómico en los cultivos, brindando ventajas adicionales a las de la biofortificación. El objetivo de la presente investigación es aportar conocimiento acerca del efecto del yodo sobre el crecimiento, los antioxidantes, los minerales y la expresión génica en diferentes estadios de las plantas de tomate. Para lograr tal objetivo se experimentó con plantas de tomate cultivadas en dos ciclos; el primero con plántulas muestreadas a los cincuenta y seis días posteriores a la siembra, a las cuales se les aplicó yodo en forma de KI y KIO₃ a concentraciones 1x10⁻⁶ M diariamente y 1x10⁻⁴ M en forma quincenal, bajo un diseño experimental completamente al azar. A estas plántulas se les midió el crecimiento bajo las variables de biomasa total, número de hojas y altura. Así mismo se analizaron en el tejido foliar antioxidantes enzimáticos como SOD, CAT, APX y GPX y no enzimáticos GSH, ASC y fenoles totales. Finalmente fue cuantificado el gen SOD1 mediante PCR punto final. El segundo ciclo se llevó a cabo con plantas muestreadas a los cien días posteriores al trasplante, bajo un diseño experimental factorial, evaluándose cuatro factores; concentración (0,1 y 100 µM), especie química (KI y KIO₃), forma de aplicación (foliar y sustrato) y tiempo de aplicación (diario y quincenal). A estas plantas se les analizó el crecimiento en términos de biomasa total, altura, número de hojas y rendimiento del fruto. Se cuantificaron antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos y minerales esenciales en las hojas y frutos.

En el primer ciclo, los resultados obtenidos con las plántulas de tomate mostraron que el yodo aplicado en forma de IO₃⁻ o I⁻ a una concentración de 1 µM (0.126 mg L⁻¹) directo al sustrato diariamente incrementó la biomasa total de 0.93 g, correspondientes al testigo a 2.25 y 2.26 g. respectivamente, sin tener afectaciones

sobre los antioxidantes o la expresión del gen SOD, sin embargo, dos tratamientos de aplicación quincenal (I F y I S) y dos tratamientos de aplicación diaria (IO_3^- F y I F) mostraron una reducción en la actividad enzimática de SOD de 45.45% al 6.39, 17.77, 20.86 y 19.4% respectivamente. Así mismo se observó un incremento en los antioxidantes ascorbato de 18.17 a 41.69 mg L^{-1} y glutatión de 5.65 mg L^{-1} a 10.47 mg L^{-1} tras la aplicación diaria de yoduro foliar, sugiriendo una neutralización directa del yodo sobre los radicales superóxido. Finalmente, los tratamientos con I^- de aplicación foliar y IO_3^- al sustrato aplicados cada 15 días mostraron un incremento un incremento de seis veces y media en la densidad relativa en la expresión del gen SOD sin obtener la misma respuesta sobre la actividad de dicha enzima. Se recomendó la aplicación de IO_3^- 1 μM por aspersión foliar cada 15 días para obtener plántulas con una mejora en el metabolismo redox sin afectación sobre el crecimiento.

En el segundo ciclo, los resultados obtenidos en las plantas adultas evidenciaron que el crecimiento y la producción de fruto fueron favorecidos con la aplicación de yodo a una concentración de 100 μM (12.6 mg L^{-1}) en forma de IO_3^- por aspersión foliar cada 15 días. Los antioxidantes se encontraron incrementados en las hojas con la aplicación de yodo 100 μM en forma de I^- directamente al sustrato de forma diaria, mientras que el mismo efecto ocurrió en los frutos con la aplicación 100 μM de I^- en forma foliar cada 15 días. En los minerales se evidenció un incremento en la concentración con la aplicación de yodo 100 μM en forma de IO_3^- directamente al sustrato en forma diaria, mientras en los frutos la forma de aplicación que mostró tal efecto benéfico fue el de 100 μM en forma de IO_3^- por aspersión foliar diariamente.

PALABRAS CLAVE: yodo, antioxidantes, biofortificación, tomate, minerales.

ABSTRACT

Iodine is considered a non-essential element for terrestrial plants, but in humans the iodine is essential for the metabolism of the thyroid and for the development of cognitive abilities. A lot of researches have been carried out with the purpose of increasing the concentration of iodine in plants of large consumption, obtaining good results such as shown in potato, cabbage, tomato, lettuce, spinach, among others, give great potential to mitigate the deficit in the intake of this element. Additionally, it has been observed that the absorption of iodine induces beneficial effects related to increase in growth, antioxidant capacity and tolerance to oxidative stress in terrestrial plants. Therefore, this face of iodine use may encourage the interest of agronomic use in crops, providing additional advantages to biofortification. The objective of the present research is a knowledge about the effect of iodine on growth, antioxidants, minerals and gen expression in different states of tomato plants. To achieve this objective was experimented with tomato plants grown in two cycles; the first with seedlings sampled fifty-six days after sowing, with iodine in the form KI and KIO₃ at concentrations 1×10^{-6} daily and 1×10^{-4} in biweekly under a completely randomized experimental design. Seedlings growth was measured by total biomass, number of leaves and height. In addition, enzymatic antioxidants such as SOD, CAT, APX and GPX and non-enzymatic GSH, ASC and total phenols were analyzed in the foliar tissue. Finally, the SOD1 gen was quantified by PCR. In the second cycle, a sample of plants were sampled one hundred days after the transplant, under an experimental factorial design, with four factors being evaluated; Concentration (0.1 and 100 μ M), chemical species (KI and KIO₃), application form (foliar and substrate) and application time (daily and biweekly). These plants analyzed the growth in terms of total biomass, height, number of leaves and yield of the fruit. Enzymatic and non-enzymatic antioxidants and essential minerals in leaves and fruits were quantified.

In the first cycle, the results showed that the iodine applied in the form of IO₃⁻ or I⁻ a concentration of 1 μ M (0,126 mg L⁻¹) direct to substrate daily increased the total biomass from 0.93 g. corresponding to the control to 2.25 and 2.26 g. respectively, without affecting the antioxidants and the expression of SOD gen, however, two biweekly treatments (IF and IS) and two daily treatments (IO₃ F and IF) showed a reduction in the enzymatic activity of SOD from 45.45% to 6.39, 17.77, 20.86 and

19.4% respectively. An increase in the antioxidants ascorbate from 18.17 to 41.69 mg L⁻¹ and glutathione from 5.65 mg L⁻¹ to 10.47 mg L⁻¹ was also observed after application daily of the foliar iodide, suggesting a direct neutralization of the iodine to superoxide radicals. Finally, foliar I⁻ and IO₃⁻ directly to substrate applied biweekly showed an increase six-fold the relative density in the expression of SOD gene without obtain the same response on the activity of the enzyme. It is recommended to apply IO₃⁻ 1 μM by foliar spray daily to obtain seedlings with an improvement in redox metabolism without any effect on growth.

In the second cycle, with adult plants, was found that the growth and the fruit production were favored with the application of iodine at a concentration of 100 μM (12.6 mg L⁻¹) in the form of IO₃ by leaf spray biweekly. The antioxidants were found to be increased in the leaves with the application of iodine 100 μM with I⁻ form directly to the substrate daily, whereas the same effect occurred in the fruits with the application 100 μM of I⁻ in foliar form biweekly. An increase in the mineral concentration was evidenced with the application of iodine at 100 μM in the form of IO₃⁻ directly to the substrate daily, whereas in the fruits the form of application that showed the beneficial effect was at 100 μM in the form of IO₃⁻ by daily leaf spray.

INTRODUCCIÓN

El yodo es un elemento perteneciente a la familia de los halógenos, tiene una alta capacidad oxido-reductora, posee varios estados de valencia (-1 a +5) y es capaz de comportarse como donador de electrones (I^-) o como receptor de estos (I_2). El principal reservorio de este elemento en el planeta es el océano, de aquí es distribuido hacia la atmósfera y posteriormente al suelo por procesos bióticos y abióticos.

Dada su alta capacidad oxido-reductora, se tiene la hipótesis que el yodo fue uno de los primeros antioxidantes inorgánicos utilizados al inicio de la creciente y letal concentración de oxígeno en la atmósfera, producto de la fotosíntesis efectuada por las ancestrales algas marinas. Los primitivos organismos anaerobios se vieron obligados a encontrar alternativas para hacer frente a este ataque oxidativo, y siendo el yodo un elemento abundante en el entorno, este fue utilizado para la neutralización directa de las especies reactivas del oxígeno.

Se ha demostrado tanto en organismos procariotes como eucariotes que el yodo es capaz de neutralizar de forma directa especies reactivas del oxígeno como el radical OH^\cdot , 1O_2 , O_2^- , funcionando así como antioxidante inorgánico (Venturi 2011)

Sin embargo, evolutivamente los organismos fueron especializándose en el almacenamiento y en el transporte del yodo, hasta convertirlo en un elemento esencial del metabolismo, proceso bien dilucidado en plantas acuáticas como las algas café del género *Laminaria* así como en los mamíferos.

En estos últimos, en donde se incluye la especie humana, la mayor parte del yodo es adquirido a través de la dieta, y debido principalmente a la distribución irregular de este elemento en la corteza terrestre, sobre todo en zonas alejadas del océano, el abastecimiento del elemento no es adecuado y constituye un problema global, que alcanza cerca de un tercio de la población mundial (Fuge 2013).

Mencionado lo anterior, la gran mayoría de los estudios e investigaciones han tomado el enfoque que relaciona el impacto del yodo sobre la salud humana y como tratar de resolver la problemática del consumo inadecuado.

Se ha establecido que un adulto promedio debe ingerir aproximadamente 150 μg de yodo por día, cualquier cantidad por debajo de este umbral causará los llamados

desordenes por deficiencia de yodo (World Health Organization 2007). Estas deficiencias pueden ser leves y pasar desapercibidas o ser tan intensas como para comprometer la síntesis adecuada de las hormonas tiroidea y provocar bocio exoftálmico, desarrollo mental inadecuado o incluso se ha relacionado con la aparición de algunos tipos de cáncer (Aceves y Anguiano 2009).

Así que, con la finalidad de mitigar el déficit en el abastecimiento de yodo en el consumo humano, se han empleado diversas técnicas de aplicación exógena en alimentos, como la yodatización de la sal de mesa, la fortificación de alimentos procesados como pan y leche (Leung et al. 2012) y recientemente se ha recurrido a la biofortificación de plantas de amplio consumo, la cual, es actualmente una importante línea de investigación en donde se han obtenido buenos resultados. Ejemplo de esto son los logros alcanzados en los vegetales como lechuga, col y tomate cultivados en hidroponía (Voogt et al. 2010; Zhu et al. 2003; Caffagni et al. 2011). También se han realizado estudios de acumulación de yodo en especies vegetales cultivadas en suelo (Weng et al. 2003; Dai et al. 2004; Hong et al. 2008; Smolen et al. 2011) sin embargo en estos experimentos las respuestas han mostrado ser sumamente variadas debido a la gran complejidad del sistema edáfico.

Un aspecto importante, que no se le ha prestado suficiente atención es el impacto que tiene la aplicación exógena del yodo sobre el metabolismo mismo de las plantas, específicamente sobre el sistema oxido-reductor. Porque a pesar de que no se conoce una función metabólica del yodo en plantas terrestres, estas son capaces de absorberlo, acumularlo o volatilizarlo relacionando estos procesos con modificaciones sobre el potencial redox y el contenido de antioxidantes obteniendo como resultado un efecto benéfico sobre la planta (Blasco et al. 2008). Es decir se ha notado que la presencia del yodo en las plantas terrestres otorga un incremento a la tolerancia al estrés, una mejora en el crecimiento y contenido de antioxidantes, esto probablemente esté relacionado con funciones puntuales que el yodo realiza en estos organismos y aún no están bien entendidas.

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El yodo es un elemento que no está clasificado como esencial en las plantas, sin embargo, se le atribuyen efectos benéficos asociados al incremento en tolerancia al estrés ambiental. Sobre esta faceta del uso del yodo no se dispone de información suficiente que combine la parte de expresión génica, la actividad bioquímica y la respuesta fisiológica para buscar su aplicación en la práctica agrícola.

El presente proyecto describe los efectos benéficos de la aplicación del yodo sobre el crecimiento, antioxidantes, contenido mineral y expresión del gen SOD1 en plantas de tomate.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la aplicación de yodo sobre el crecimiento, concentración de antioxidantes, contenido de minerales y expresión del gen SOD1 en las plantas de tomate.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de la aplicación de yodo sobre el crecimiento de las plántulas y plantas de tomate.
2. Determinar la respuesta de la aplicación de yodo sobre antioxidantes en las hojas de las plántulas, así como en las hojas y frutos de las plantas de tomate.
3. Cuantificar el efecto de los tratamientos con yodo sobre la concentración de minerales en las hojas y frutos de las plantas de tomate.
4. Determinar la expresión génica relacionada con antioxidantes enzimáticos en las hojas de las plántulas de tomate.

HIPÓTESIS

El crecimiento, los antioxidantes, el contenido mineral y la expresión génica de las plantas de tomate son modificados con la aplicación del yodo.

ANTECEDENTES

El Yodo y la salud humana

El yodo no es un elemento catalogado esencial en las plantas terrestres, pero si en mamíferos. En los humanos este elemento se encuentra ligado a la formación de hormonas tiroideas, las cuales son vitales para el crecimiento y desarrollo de órganos como los reproductivos, el cerebro, nervios, huesos, piel, uñas y dientes (Fisher y Delange 1998). Adicionalmente se ha relacionado el consumo adecuado de este elemento con la inhibición de formación de ciertos tumores (Aceves y Anguiano 2009) lo que pudiera indicar una serie de funciones de gran importancia, pero aún desconocidas. De acuerdo con la Recommended Dietary Allowances (World Health Organization 2007; Andersson et al. 2012) el consumo diario promedio de un adulto debe ser de 150 μg , mientras que en mujeres embarazadas y en la lactancia la media debe ser de 250 μg . Sin embargo, se estima que alrededor de dos mil millones de personas viven con una ingesta insuficiente de este elemento (Mottiar 2013) provocando los denominados desordenes por deficiencia de yodo (DDY). De acuerdo con Hetzel (2002) los DDY se refieren a todos los desórdenes asociados con la baja ingesta de yodo y que pueden ser prevenidos asegurando el consumo adecuado del elemento. El DDY más conocido por su clara sintomatología es el bocio, sin embargo, en las últimas décadas se ha reconocido la presencia de desórdenes menos obvios desde el punto de vista de la sintomatología, como un deficiente desarrollo mental y físico en niños, así como baja productividad de los adultos (Lazarus 2015).

Dinámica del yodo

El principal reservorio de yodo en el planeta es el océano, de aquí es llevado hacia la atmósfera y posteriormente al suelo, por lo que los sitios más alejados del mar en promedio reciben menos yodo (Fuge et al. 1996). El abastecimiento insuficiente de yodo en la dieta humana se debe principalmente a la distribución irregular del elemento en los suelos; dependiendo de la distancia del océano, por ejemplo se ha estimado que las planicies y las montañas son los suelos más empobrecidos en el contenido de este elemento. Y el otro aspecto crucial es la composición mineral de las rocas primarias que formaron los suelos (Aston y Brazier 1979).

De las aguas marinas superficiales ocurre una intensa emisión de yodo hacia la atmósfera mediante la producción de compuestos yodocarbonados (CH_3I y CH_2I_2) y yodo molecular (I_2) (Le blanc et al. 2006; Moore y Groszko 1999). En las zonas costeras esta actividad es desarrollada principalmente por las algas marinas del genero *Laminaria* (Le Blanc et al. 2006). En la atmósfera los compuestos yodados reaccionan fotoquímicamente con el ozono (O_3) y forman radicales como I_2O_2 , I_2O_3 y I_2O_4 los cuales llegan a formar I_2O_5 , compuesto que forma nanopartículas que inducen núcleos de condensación para la formación de nubes y subsecuentemente, mediante la precipitación ocurrirá la deposición del yodo en el suelo en forma principalmente de I^- y IO_3^- . De aquí será distribuido de diferentes maneras: puede ser volatilizado por acción microbiana, arrastrado de vuelta al océano a través de ríos o fijado en el suelo y en la biomasa (Moreda-Piñero et al. 2011; Saunders et al. 2012), constituyendo esto último el abastecimiento de yodo a los organismos terrestres como las plantas, animales y humanos (Whitehead 1984). Ver Figura 1.

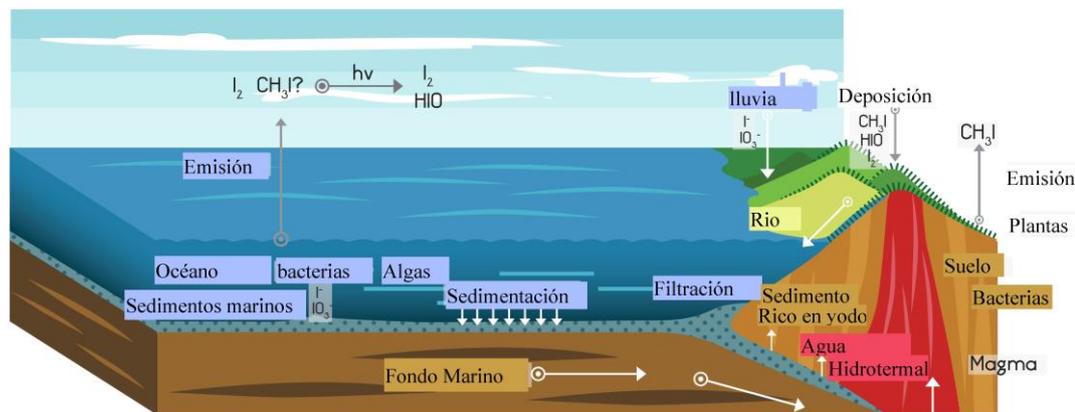


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del yodo.

En cuanto a los factores edáficos, el contenido endógeno de yodo es producto del desgaste natural de la roca madre y de las propiedades fisicoquímicas del suelo. La combinación específica de estos factores permite la retención o pérdida de este elemento por lixiviación y/o volatilización (Whitehead 1984; Moreda-Piñero et al. 2011).

La mayoría de los componentes del suelo son minerales derivados del desgaste de la roca madre. Sin embargo, el material inorgánico no solo proviene del desgaste directo, también pudo haber sido generado en una localidad y ser depositado en otra

(Johnson 2003). Se ha reportado que el contenido aproximado de yodo en la corteza terrestre es de 0.25 mg kg^{-1} (Fuge y Johnson 1986). El gran radio iónico del yodo evita una rápida incorporación a los minerales de la roca madre, es probable que debido a esto se encuentren concentraciones uniformemente bajas en la mayoría de los minerales de las rocas formadoras. Se ha reportado que dentro de los diferentes tipos de rocas (ver Tabla 1), las ígneas contienen menos cantidad de yodo (0.2 mg kg^{-1}) que la roca sedimentaria ($1\text{-}2.3 \text{ mg kg}^{-1}$) y la roca metamórfica no se ha incluido por falta consistente de datos (Fuge 1996; Fuge 2013).

Tabla 1. Contenido de yodo en algunas rocas comunes.

TIPO DE ROCA	CONTENIDO DE YODO (mg/ kg)
<i>Rocas Ígneas</i>	
Granito	0.25
Otras intrusivas	0.22
Basalto	0.22
Otras volcánicas	0.24
Vidrios volcánicos	0.52
<i>Rocas Sedimentarias</i>	
Esquistos	2.3
Arena	0.8
Caliza	2.7
Orgánicas-ricas en esquistos	16.7

Otros autores han mencionado que la cantidad de yodo obtenido del desgaste natural de la roca madre es muy poco, sin embargo, se ha demostrado que existe una importante relación entre el tipo de roca madre y la cantidad presente de este elemento (Aston y Barzier 1979; Schnetger y Muramatsu 1996).

En base a lo anteriormente descrito: la esencialidad del yodo en humanos aunado a una distribución irregular sobre los suelos, es lo que ha llevado a la comunidad científica a realizar numerosos intentos para mitigar el déficit en el consumo de este elemento, siendo la yodatización universal de la sal de mesa desde una de las técnicas más usadas (De Caffarelli et al. 1997; Zimmermann 2009; Charlton et al. 2013). Sin embargo, a través de los años se ha demostrado que esta técnica por sí sola es insuficiente para asegurar el requerimiento total de yodo (De Benosit et al. 2008). Adicionalmente, en la mayoría de los países industrializados el consumo de sal de mesa va en disminución (Hetzl 1989) y se ha demostrado que el yodo en la

sal de mesa se volatiliza (Laillou et al. 2015). Por otra parte, el consumo de yodo en formas orgánicas se considera más adecuado (Weng et al. 2014), ya que también se han evidenciado casos de bocio endémico asociado al exceso en el consumo de yodo inorgánico (Zhao et al. 2000). Por lo que la aplicación de yodo en diversas especies vegetales de amplio consumo humano ha sido un tema ampliamente estudiado y se han obtenido resultados alentadores, sin embargo, estos han sido también sumamente variados dependiendo principalmente de la especie vegetal tratada, la concentración y forma química del yodo, y el sistema en el cual se lleva a cabo el cultivo (Medrano-Macías et al. 2016a).

El yodo en plantas terrestres

La concentración de yodo promedio reportada en tejidos vegetales es de 0.1 a 1 mg kg⁻¹, pudiendo alcanzar hasta 3 mg kg⁻¹ o más. No se ha demostrado una función metabólica del yodo en plantas (Benton-Jones 1998) pero se le reconoce un valor como micronutriente benéfico (Borst Pauwels 1961). Actualmente existe poca información acerca de la forma en que el yodo es metabolizado, acumulado o volatilizado por las plantas terrestres, sin embargo, se ha dilucidado que al aplicar yodo de forma exógena en las plantas ocurre un incremento directamente proporcional en los diferentes tejidos. Ejemplo de esto son los trabajos realizados por Zhu et al. en 2003, donde realizaron aplicaciones de yodo (como yoduro, yodato u otras formas químicas) mediante la solución nutritiva de un cultivo hidropónico de espinaca, encontrándose que la cantidad de yodo en los tejidos vegetales se elevó al aumentar la concentración en la solución pero detectando un efecto negativo sobre la biomasa a concentraciones mayores a 1×10^{-6} molar (1.3 mg L⁻¹) de yoduro, mientras que el yodato no mostró tal efecto negativo. En otro estudio llevado a cabo en espinaca bajo cultivo hidropónico se aplicaron diferentes formas químicas de yodo como ácido yodo-acético, yoduro y yodato y se comprobó que con concentraciones mayores a 0 y hasta 1 mg L⁻¹ la tasa de absorción del yodo aumentó linealmente en respuesta a la concentración, manteniendo una proporción de concentración de 1:1 en raíces y hojas y se mostró el siguiente orden de acumulación con las diferentes formas de yodo $\text{CH}_2\text{ICOO}^- > \text{I}^- > \text{IO}_3^-$. Adicionalmente se comprobó que inclusive con estas bajas concentraciones se obtuvo un incremento de la biomasa en estas plantas (Weng et al. 2008). Por su parte Blasco et al. (2008) demostraron que aplicando yodo en concentraciones ≤ 5.1 mg L⁻¹ de yoduro (I⁻) en lechuga

hidropónica se obtuvo una adecuada acumulación de yodo foliar, la cual fue de 900 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tejido seco, cantidad que es suficiente para cumplir la demanda diaria de consumo de yodo en humanos ($150 \mu\text{g día}^{-1}$) cuando se consumen entre 17 y 200 g de tejido fresco de lechuga por semana, ya que esta concentración no excede la máxima cantidad recomendada la cual es de 2 mg por día. Sin embargo, a concentraciones superiores a 5.1 mg L^{-1} de yoduro se presentaba una reducción significativa en la biomasa, caso que no sucedió aplicando las mismas concentraciones de yodato.

Voogt et al. (2010) realizaron otro experimento de biofortificación con yodo en forma de yoduro y yodato en plantas de lechuga, aplicaron concentraciones muy bajas de estas formas químicas, las cuales oscilaban entre 0.013 y 0.129 mg L^{-1} , encontrando que en ninguna de las concentraciones mostraron efecto tóxico en las plantas de lechuga y con la concentración de 0.129 mg L^{-1} de yoduro obtuvieron una acumulación de 0.653 y $0.764 \mu\text{g I g}^{-1}$ de tejido fresco, cinco veces menos de la concentración obtenida al aplicar yodato.

Se ha concluido que los mejores resultados en cuanto a bioacumulación se han obtenido al aplicar los compuestos de yodo en la solución nutritiva, sin embargo, un reto mayor es lograr la biofortificación con yodo en cultivos extensivos llevados a cabo en el suelo, en donde el sistema edáfico es complejo y la cantidad de factores involucrados es mayor.

Ejemplos de estos esfuerzos son los experimentos realizados por Dai et al. (2004) en donde realizaron aplicaciones con yodo directamente en el suelo en forma de IO_3^- a concentraciones de 1 y 5 mg I por kg de suelo en especies de hoja (espinaca), de tallo (apio), de raíz (zanahoria) y de tubérculo (papa) encontrando un incremento en el contenido de yodo directamente proporcional con la concentración aplicada, sin embargo, se notó una reducción de la biomasa en con la concentración más alta en todas las especies tratadas, y con la concentración de 1 mg kg^{-1} ocurrió una acumulación de yodo en las hojas de las espinacas alcanzando 3 mg kg^{-1} . Por otro lado, Hong et al. (2008), biofortificaron con yodo inorgánico en forma de I^- y yodo orgánico por medio de algas a cuatro especies diferentes (col, zanahoria, lechuga, y tomate), con el fin de observar la transferencia del yodo del suelo hacia el tejido vegetal y se encontró que los niveles del yodo en los tejidos de los vegetales se acrecentaron con la adición del yodo, mientras que la acumulación de este elemento

se presentó de la siguiente forma: raíz > tallo>hoja > fruto y los niveles de yodo encontrado por especie fue del siguiente modo col >lechuga> zanahoria > tomate. También se observó una mayor acumulación de yodo con los tratamientos de I⁻ que, con las formas orgánicas, sin embargo, con esta especie química también se produjo toxicidad.

Caffagini et al. (2011) realizaron aplicaciones de yoduro y yodato al suelo mediante irrigación a concentraciones de 500 y 1000 mg L⁻¹ y 500, 1000, 2000 y 5000 mg L⁻¹, respectivamente, en plantas de cebada, maíz, tomate y papa. Encontrándose resultados favorables únicamente en los frutos de tomate y tubérculos de papa, alcanzando concentraciones de 272 a 6245 µg I por cada 100 g de peso fresco y de 527 a 5375 µg I por cada 100 g de peso fresco, respectivamente. Las concentración de yodo alcanzada en los frutos de tomate de las plantas tratadas con yoduro a 500 mg L⁻¹ fue siete veces más elevada que la concentración alcanzada con la aplicación de yodato en 500 mg L⁻¹ (3900-527 µg g 100 g⁻¹). De igual modo sucedió en el caso de los tubérculos de papa, en donde la concentración alcanzada con la aplicación de yoduro a 500 mg L⁻¹ fue siete veces mayor que la concentración alcanzada con la aplicación de yodato a 500 mg L⁻¹ (1875 versus 272 µg I por 100 g de peso fresco). Lo cual corroboró la mayor facilidad de absorción del yoduro frente al yodato.

Las discrepancias en los resultados obtenidos en la biofortificación con yodo en el suelo, adicional a los factores ya mencionados (especie vegetal, concentración de yodo, etc.) se suman la gran complejidad de la dinámica de los procesos de fijación y volatilización. La materia orgánica y algunos compuestos inorgánicos incrementan la fijación del yodo, reducen la volatilización pero también reducen la biodisponibilidad (Whitehead 1974), el potencial oxidoreductor (Eh) y el pH son otros factores fisicoquímicos que modifican ampliamente la biodisponibilidad de este elemento.

El yodo contenido en el agua de riego puede ser una fuente importante para las plantas. Sin embargo, es poco probable que el agua contenga niveles significativos de yodo en regiones en donde el suelo presente concentraciones bajas del elemento. La aplicación de yodo como yodato de potasio en el agua de riego (0.010-0.080 mg L⁻¹ por cuatro semanas) fue efectiva durante cuatro años para elevar la concentración de yodo en suelos y plantas en regiones de China con severa deficiencia de yodo (Jiang et al. 1998). A su vez Weng et al. (2003) encontraron que al aplicar algas *kelp* y tierra de diatomeas al suelo se logró elevar la disponibilidad de yodo para las

hortalizas bajo cultivo. Los mismos autores encontraron que la absorción de yodo por hortalizas estaba en función directa de la concentración del elemento en el suelo, hasta alcanzar un límite que se presentó diferente para cada especie vegetal.

Lawson et al. en 2015 compararon la cantidad de yodo acumulado mediante la fertilización directa al suelo y por aspersion foliar en plantas de lechuga y col, encontrando una mayor acumulación ($50 \mu\text{g I } 100 \text{ g}^{-1}$ de tejido fresco) mediante la aplicación foliar a 0.5 kg I ha^{-1} en las plantas de lechuga, pero no en la de col, esto debido probablemente a la forma del transporte de este elemento. De modo similar Smolen et al. (2011) encontraron resultados positivos en la acumulación y biofortificación de plantas de lechuga con la aplicación de KIO_3 en forma foliar a una concentración de 2 kg I ha^{-1} . Sin embargo, se ha observado que esta tendencia de acumulación de yodo aplicado por aspersion foliar no ocurre en los granos, en donde el factor de transferencia del yodo es bastante bajo (Hurtevent et al. 2013)

Se ha demostrado que el yodo puede ser absorbido través de la membrana de las células de la raíz tanto en forma reducida (I^-) como oxidada (IO_3^-), sin embargo, existen grandes variaciones bioquímicas entre ambos procesos de absorción.

El yoduro (I^-) es absorbido a través de canales aniónicos y transportadores haluro/ H^+ por acción de la bomba de protones (White y Broadley 2009). Por otro lado, se ha reportado que absorción del yodato (IO_3^-) a través de las raíces no es efectuada de manera directa: este primero tiene que ser reducido a la forma de yoduro, probablemente catalizado por yodato reductasas e incluso este pueda ser utilizado como sustrato de las nitrato reductasa (Kato et al. 2013), lo que propicia un absorción más lenta y dosificada en comparación con la especie química reducida (I^-). Sin embargo, debe tomarse en cuenta otros factores, como el medio en el cual se encuentre la planta, por ejemplo, en el suelo existen numerosos factores que modifican la especiación química como el pH, la humedad, la microbiota, materia orgánica, potencial oxidoreductor, etc. (Medrano-Macías et al. 2016a). El yodato bajo condiciones aerobias es termodinámicamente más estable que el yoduro, por lo que está predominara (Shetaya et al. 2012). Adicional a este hecho, el yoduro es fácilmente volatilizado de este sistema por acción microbiana y finalmente es atrapado por el humus de la materia orgánica por lo que se vuelve poco disponible para las plantas (Kaplan et al. 2014). Sin embargo, cuando las plantas se encuentran

cultivadas sin suelo, la especie química reducida es la de principal captación y transportación debido a los mecanismos previamente descritos.

Por lo que el yoduro bajo estas últimas condiciones rápidamente alcanza el punto de toxicidad probablemente debido a una interferencia con la fotosíntesis por sus características oxidoreductoras (Weng et al. 2008)

De acuerdo con Itoh et al. (2009) para hacer frente a la fitotoxicidad mencionada, recientemente se ha descrito que las plantas terrestres son capaces de volatilizar el yodo en forma yoduro de metilo (CH_3I) mediante la catálisis de enzimas como haluro metiltransferasas (HMT) y haluro-tiolmetiltransferasas (HTMT) dependiente de adenosilmetionina (SAM). Por lo que el balance entre la acumulación y la volatilización de este elemento está en función de diversos factores como la especie vegetal misma y la capacidad que esta posee para soportar diferentes concentraciones de yodo.

La absorción del yodo a través de las hojas es un mecanismo que no está completamente esclarecido, sin embargo, se ha observado que este es capaz de pasar a través de la cutícula por la "ruta hidrofílica" (Franke 1986; Michałojc y Szewczuk 2003), así como por los estomas (Fernández y Brown 2013). Esta última ruta ha sido bastante discutida, se ha señalado que las soluciones aplicadas via foliar simplemente son infiltradas por el estoma a través de un flujo dinámico de masas (Sands y Bachelard 1973), sin embargo, este proceso también ha sido catalogado como "físicoquímicamente imposible" (Schonherr y Bukovac 1972), por lo que una teoría aceptada es que la absorción ocurre debido a la alta permeabilidad de la cutícula alrededor de las células guarda (Franke et al. 1967; Eichert y Goldbach 2008). Adicionalmente se han encontrado mayores índices de absorción cuando se le añade un surfactante a la solución de yodo.

Una vez en el interior de la planta el yodo es distribuido predominantemente mediante el xilema (Weng et al. 2009; Dai et al. 2004; Mackowiak y Grossl 1999), sin embargo recientemente se ha demostrado que este también puede ser movilizado por el floema, demostrado al estudiar la acumulación de yodo en los frutos de tomate (Landini et al. 2011). Por lo que la acumulación de yodo es llevada a cabo principalmente en la raíz y una porción menor es transportada al tallo y hojas,

encontrándose que en estas últimas el yodo puntualmente se localizó en los cloroplastos (Weng et al. 2008)

Adicional al valor nutracéutico que el yodo otorga a las plantas de consumo humano, se ha demostrado que este elemento confiere efectos benéficos, relacionado con el metabolismo oxidativo reductor. Este elemento tiene particularidades fisicoquímicas que le permiten actuar, bajo ciertas condiciones como donador de electrones es decir un antioxidante o como aceptor de estos: prooxidante. Se cree que constituye uno de los primeros antioxidantes utilizados por los organismos fotosintéticos, al inicio de la producción de oxígeno en la atmósfera primitiva (Venturi y Venturi 2007). Sin embargo, la acción del yodo como elemento benéfico está aún en sus inicios. El uso del yodo como inductor de tolerancia al estrés oxidativo y potencializador en la síntesis de antioxidantes, más su valor como biofortificante aporta incentivos suficientes para la exploración de este amplio campo.

Química del yodo

El yodo es un elemento químico de número atómico 53 situado en el grupo de los halógenos (grupo 17) de la tabla periódica de los elementos. Su símbolo es I y el peso atómico del isótopo más abundante es de 126.9 g mol^{-1} . Químicamente, el yodo es el halógeno menos reactivo y menos electronegativo. Como los restantes halógenos del grupo VII en la tabla periódica, el yodo forma moléculas diatómicas (I_2) también nombrado yodo molecular, esta forma tiene gran facilidad por oxidarse o reducirse, lo que promueve la formación de una amplia diversidad de moléculas iónicas con diferentes estados de valencia por ejemplo el yoduro (I^-) con una valencia de -1, el ácido hipoyodoso (HIO) con una valencia de +1, el yodito (IO_2) con una valencia de +3, el yodato (IO_3) +5 y el peryodato (IO_4) +7. Esta propiedad permite que el yodo muestre la característica capacidad oxidoreductora y a su vez forme moléculas orgánicas al unirse con C, H y O, que pueden ser tan pequeñas como el yoduro de metilo (CH_3I) o tan complejas como la hormona tiroidea.

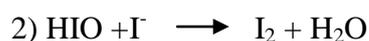
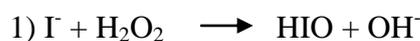
El yodo y su relación con el metabolismo redox

Efecto sobre la tolerancia al estrés

En base a las características químicas del yodo descritas previamente se tiene que este es un elemento sensible a cambios redox así como biofílico (Lu et al. 2010) por lo que se ha establecido que este pudo tener un rol específico como antioxidante inorgánico en los mismos organismos fotosintéticos (algas) que iniciaron con la producción de oxígeno hace unos tres mil millones de años. Estos organismos habitaban en un medio rico en yodo y a su vez tienen gran capacidad de acumularlo. Sin embargo, termodinámicamente, la reacción llevada a cabo entre el yodo y una de los radicales libres más abundantes (H_2O_2) es muy lenta (Luther y Cullen 1995), por lo que los sistemas biológicos evolucionaron acoplando este elemento a moléculas orgánicas mediante células especializadas en la captación y acumulación del yodo desde las primitivas cavidades gástricas de las poríferas y cordados primitivos hasta las actuales hormonas tiroideas en mamíferos. (Venturi y Venturi 1999).

En las algas marinas la función del yodo como antioxidante está bien dilucidada; el I^- extracelular es usado como donador de e^- (cofactor) mediante la acción de la enzima yodoperoxidasa dependiente de vanadio, con el fin de reducir el peróxido a ácido hipoyodoso (HIO) y finalmente en yodo molecular (I_2) tal como se muestra en la siguiente reacción:

V-IPO



El HIO puede penetrar a través de la membrana o reaccionar de forma espontánea con el I^- y dar lugar al I_2 (Colin et al. 2003). Este último, en condiciones de estrés oxidativo en bajo nivel, cruza la membrana posterior a someterse a reacciones de reducción y es almacenado en la vacuola para estar disponible en caso de un nuevo ataque oxidativo. Por otro lado, en caso de estrés oxidativo intenso el I_2 no es

almacenado, sino volatilizado a la atmósfera, posteriormente en su participación como cofactor de la enzima V-IPO. Y el HIO reaccionará con compuestos orgánicos (CH_3I) y a su vez será volatilizado (Le Blanc et al. 2006; Kupper et al. 2008), ver Figura 2.

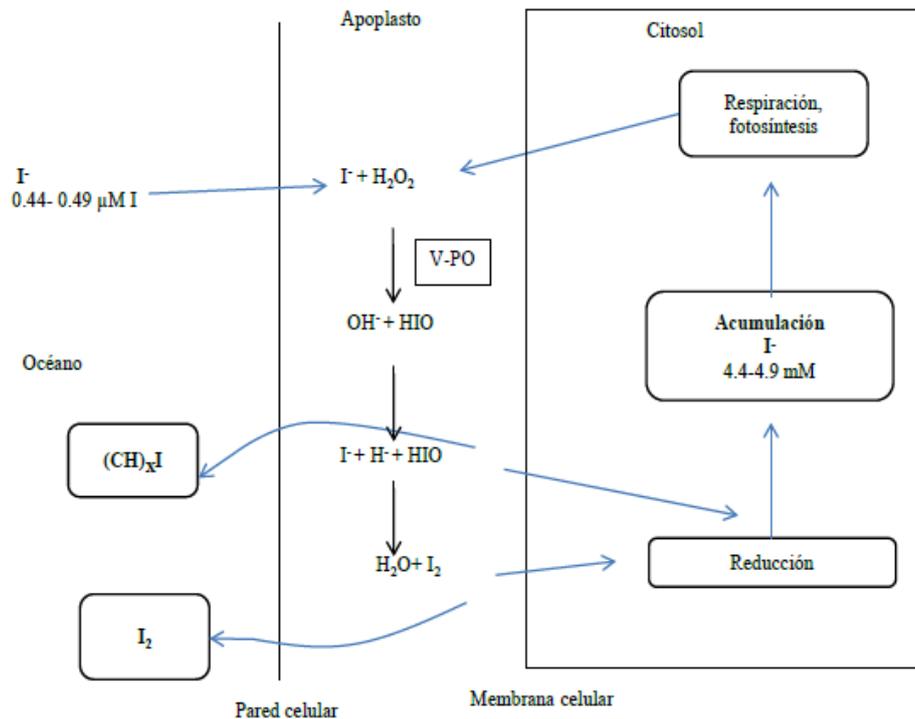


Figura 2. Esquema del metabolismo antioxidante del yodo. Adaptada de Le Blanc et al. 2006.

Además del proceso catalítico en el cual el yodo participa en la neutralización del peróxido, se ha encontrado que este es capaz de reaccionar de manera directa inactivando radicales superóxido (O_2^-), radicales hidroxilo (OH^\cdot) y oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), a una tasa de reacción incluso más alta (de 12 a 500 veces) que el ascorbato y glutatión (Kupper et al. 2008).

Sin embargo, el mecanismo por el cual las plantas terrestres son beneficiadas tras la aplicación de las diversas especies químicas de yodo aún no está establecido, incluso a la fecha no se caracterizado alguna enzima análoga a la yodoperoxidasa dependiente de vanadio presente en las algas café.

Pero lo que si se ha encontrado en algunos estudios es el incremento de antioxidantes (Medrano- Macías et al. 2016b) que otorga la capacidad de hacer frente a ciertos tipos de estrés abiótico como salinidad y metales pesados (Leyva et al. 2011; Gupta et al. 2015).

Dey(néePathak) y Mukherjee en 1984 trataron semillas de soya y girasol con yodo y carbonato de calcio reduciendo el daño fisiológico ocasionado por alta temperatura y humedad, de modo similar las semillas de colza tratadas con yodo mejoraron la supervivencia de los individuos en pruebas de deterioro (Powell et al. 2005).

El deterioro de las semillas esta principalmente asociado con el oxidativo estrés (Sun y Leopold 1995) por lo que se deduce en base a los estudios anteriores que tal deterioro fue inhibido por la probable acción antioxidante del yodo.

Se ha concluido, que el estado del arte carece de información acerca de la inducción a la tolerancia al estrés oxidativo otorgado por el yodo a las plantas y cuál es la mejor forma en hacer uso de este.

Incremento del contenido de antioxidantes

El efecto de la aplicación de yodo sobre los antioxidantes ha demostrado ser muy variado, al igual que para el caso de biofortificación, este es dependiente de la especie vegetal, del tipo de cultivo, de la especie química del yodo, concentración, dosis, etc. Sin embargo, se ha observado una mejor respuesta en el incremento de estos con la aplicación de yodato que con la de yoduro, sobre todo hablando en términos de incrementar el contenido antioxidante sin afectar el crecimiento de la planta.

Blasco y colaboradores han estudiado ampliamente el impacto del yodo en el metabolismo antioxidante en plantas de lechuga bajo cultivo hidropónico, en su primer ensayo encontraron un incremento en la concentración de compuestos fenólicos, ácido ascórbico y potencial antioxidante, sin embargo, se observó que el mayor incremento se presentó con las concentraciones más altas de KI ($> 45 \mu\text{M}$) pero teniendo una drástica reducción de la biomasa, en cambio el IO_3 no evidenció este daño (Blasco et al. 2008). Posteriormente realizaron aplicaciones de KI y KIO_3 encontrando que la aplicación de KI a $80 \mu\text{M}$ indujo una reducción en la actividad de SOD y un incremento en CAT y L-galactano deshidrogenasa así como los antioxidantes no enzimáticos glutatión y ascorbato, sin embargo, este resultado no

fue favorable puesto que se notó un daño sobre el crecimiento de las plantas. Por otro lado, la aplicación de KIO_3 produjo un incremento en la actividad enzimática de CAT, SOD y APX, principales enzimas en la detoxificación causada por especies reactivas del oxígeno (ROS), también se encontró un incremento en el ácido ascórbico, comprobando el efecto benéfico de esta especie química sin evidenciar toxicidad mediante la reducción de biomasa o peroxidación lipídica (Blasco et al. 2011). En un estudio más reciente se demostró un incremento en el potencial antioxidante y acumulación en compuestos fenólicos tras la aplicación de KIO_3 a concentraciones de 20 y 40 μM (Leyva et al. 2011).

Smolen et al. en 2015 reportaron que con la aplicación de KIO_3 a concentración de 7.88 μM se incrementó el contenido de ácido ascórbico y compuestos fenólicos totales; de modo similar García-Osuna et al. (2014) reportaron un incremento en el ácido ascórbico en plantas de *Opuntia ficus indica* sembradas en suelo bajo condiciones de microtúnel con la aplicación de KIO_3 a una concentración de 100 μM .

En un estudio llevado a cabo en plantas de soya cultivadas en contenedores con suelo y composta se observó que al aplicar KIO_3 a concentraciones de 20, 40 y 80 μM se incrementaron las actividades enzimáticas de APX y SOD (Gupta et al. 2015)

Los hallazgos observados respecto a la aplicación de yodo como elemento benéfico requieren estudios integrales en los cuales se involucren de manera conjunta otros aspectos como la interacción con otros elementos, así como la expresión de genes. En el presente trabajo se evaluó la aplicación de yodo, en plántulas y plantas adultas de tomate, bajo un diseño experimental factorial, determinando el efecto sobre el crecimiento, antioxidantes, contenido mineral y expresión de genes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Etapa 1: Determinación del crecimiento, antioxidantes y expresión de genes en plántulas de tomate.

Material biológico.

Como material biológico fueron utilizadas semillas de tomate tipo saladette variedad Rio Grande, las cuales producen plantas de crecimiento determinado, de precocidad relativa, resistente a *Fusarium* raza 1 y 2 así como a peca bacteriana. Las semillas fueron tratadas previamente con fungicidas y fueron adquiridas de la casa comercial Hydro Environment.

Condiciones de crecimiento.

El experimento se llevó a cabo en el año 2013, en un invernadero de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México, ubicado a 25° 21' 12.8'' latitud norte y 101° 01' 51.9'' longitud oeste. La siembra se realizó en vasos de poliestireno de 355 mL de capacidad, con el uso de sustrato *peat moss* y perlita en una proporción 5:1 respectivamente. Al colocar el sustrato en los vasos este fue humedecido a tal grado que permita moldear figuras con el puño. En la siembra se colocó una semilla de tomate por cada vaso a 0.5 cm de profundidad, una vez sembrado se aplicó riego hasta percolación por los orificios en el fondo del vaso, posteriormente se cubrieron con poliestireno negro en un sitio cerrado durante 9 días hasta la germinación. Una vez que apareció la primera plántula, los vasos fueron fijados en un lugar del invernadero hasta el muestreo de estas. Se mantuvo la humedad del sustrato en un 80%, la temperatura promedio del invernadero fue de 20.7 °C, la radiación máxima de 741 Wm⁻² y la humedad relativa de 62.8 %. El riego

se llevó a cabo diariamente de forma manual. El manejo y cuidado del cultivo se hizo de acuerdo con lo establecido por Villasanti y Pantoja (2013).

Fertilización.

En la producción de plántulas de tomate se utilizó la solución nutritiva propuesta por Steiner (Steiner 1964) diluida al 25%, la C.E. y el pH de la solución nutritiva fueron 1.0 dS m⁻¹ y 6.5 respectivamente. La aplicación se inició tres semanas posteriores a la siembra y se continuó con aplicación diaria hasta el muestreo (ver Tabla 2).

Tabla 2. Componentes de la solución nutritiva de Steiner (Steiner 1964)

Macronutrientes	gr L⁻¹
KH ₂ PO ₄	0.135
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1.07
KNO ₃	0.3
K ₂ SO ₄	0.4
Micronutrientes	mg L⁻¹
HBO ₃	55
MnSO ₄	0.7
ZnSO ₄	0.3
CuSO ₄	0.07
H ₂ MoO ₄	0.7
Fe quelado	3

Tratamientos.

Las aplicaciones de los tratamientos con yodo se iniciaron cuatro semanas posteriores a la siembra, siguiendo un diseño experimental completamente aleatorio, con soluciones de yoduro y yodato de potasio, a concentraciones de 1 µM diariamente o 100 µM quincenalmente, aplicadas al sustrato o por aspersión foliar,

tal como se muestra en la Tabla 3. Así mismo se colocaron plántulas testigo a los cuales sólo se les aplicó solución nutritiva al sustrato.

Se hicieron diez repeticiones por tratamiento, siendo una unidad experimental una plántula, dando un total de nueve tratamientos.

Tabla 3. Concentraciones de la aplicación de las soluciones de yodo.

Forma de Yodo	Forma de aplicación	Concentración de Yodo (μM)	Concentración de Yodo (mgL^{-1})	Tiempo de Aplicación	Abreviación
Yodato	Foliar	1	0.126	diaria	IO ₃ (F) D
Yodato	Sustrato	1	0.126	diaria	IO ₃ (S)D
Yoduro	Foliar	1	0.126	diaria	I(F) D
Yoduro	Sustrato	1	0.126	diaria	I(S) D
Yodato	Foliar	100	12.6	Quincenal	IO ₃ (F) 15D
Yodato	Sustrato	100	12.6	Quincenal	IO ₃ (S)15 D
Yoduro	Foliar	100	12.6	Quincenal	I(F) 15D
Yoduro	Sustrato	100	12.6	Quincenal	I(S) 15D

Muestras

Bajo un muestreo completamente al azar, se tomaron tres plántulas a los 56 días posteriores a la siembra, por cada forma de aplicación del yoduro y del yodato para análisis bioquímicos y expresión génica, así como también se muestrearon cinco plántulas por cada forma de aplicación de yodo para el análisis de biomasa y otras variables agronómicas. Las muestras para variables bioquímicas y génicas consistieron en hojas jóvenes, completamente expandidas y para las variables agronómicas se tomó la planta completa (raíz, tallo y hojas).

Evaluación de las variables de crecimiento.

Biomasa.

Las plántulas se dividieron en tallo, raíz y hojas, y se pesaron utilizando una balanza digital marca OHAUS®. Posteriormente, se colocaron en un horno de secado a 60 °C hasta obtener peso constante. El peso inicial y final se expresó en gramos.

Altura.

La altura fue medida con cinta métrica flexible desde la base del tallo hasta el ápice. Los resultados fueron expresados en centímetros

Número de hojas.

El número de folíolos fue cuantificado por cada hoja compuesta.

Evaluación de antioxidantes.

Extracción

El tejido vegetal se congeló a -20 °C y fue llevado a liofilización por 24 hrs. Se maceró con mortero de mano y se pesaron 200 mg de este tejido pulverizado, posteriormente fue pasado a tubo para centrifuga más 20 mg de polivinil pirrolidona, se le añadió 1.5 mL de 0.1 M de buffer de fosfatos pH 7.2 y fue sonicado por 10 min., posteriormente se sometió a microcentrifugación a 12000 rpm por 10 min a 4°C, el sobrenadante se recolectó y filtró con una membrana de nylon (Ramos et al. 2010). Finalmente se diluyó en una proporción 1:15 con buffer de fosfatos.

Cuantificación de proteínas totales.

Se utilizó la técnica colorimétrica de Bradford (1976) para la cuantificación de proteínas. Iniciando con la construcción de una curva de calibración usando como estándar albumina sérica bovina; mediante la cual se interpolaron los resultados de las muestras del tejido de tomate.

Actividad catalasa

La actividad de la catalasa fue cuantificada mediante espectrofotometría. Se llevó a cabo midiendo dos tiempos de reacción, tiempo 0 y tiempo 1 minuto, la mezcla de reacción se preparó como se muestra en la Tabla 4. La reacción se efectuó en tubos eppendorff, a una temperatura de 20 °C sometándose a agitación constante. Se monitoreó la cantidad de peróxido de hidrógeno consumido, mediante una curva de calibración previamente trazada del peróxido a 270 nm.

Tabla 4. Especificaciones de la mezcla de reacción para la cuantificación de la actividad enzimática de catalasa.

	Blanco	T0 (0 min reacción)	T1 (1 min reacción)
Extracto Protéico	0.1	0.1	0.1
Peróxido 100 mM	0	1	1
Buffer fosfatos	1	0	0
H₂SO₄ 5%	0.4	0.4	0.4

Actividad Superóxido Dismutasa

Se realizó mediante el kit para determinación de Sod de Sigma 19160. La cual tiene como principio la oxidación del colorante WST (Water soluble tetrazoliumsalt) a WST- formazán por los iones superóxido formados mediante el conjunto xantina oxidasa (XO)/xantina (X). La inhibición de la oxidación del WST es atribuido a la neutralización de los radicales superóxido por la SOD. Tal como se ejemplifica en la Figura 3.

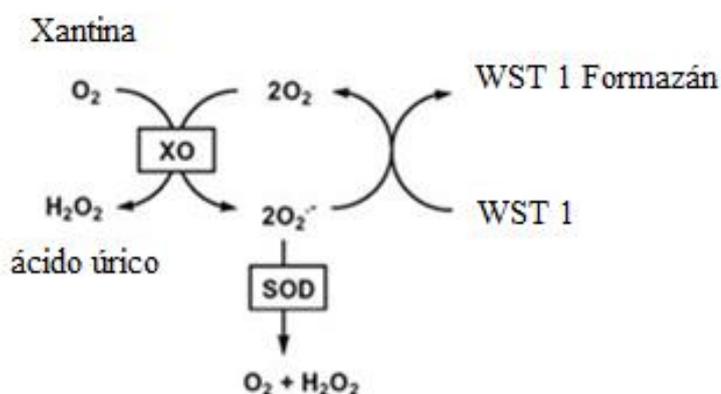


Figura 3. Esquematación del principio de la cuantificación de la actividad enzimática de la SOD

Actividad Glutati6n Peroxidasa

Se utiliz6 el m6todo modificado por Xue et al. (2001) usando H₂O₂ como sustrato (ver Figura 4). Se colocaron 0.2 mL del sobrenadante en un tubo de ensayo m6s 0.4 mL de glutati6n reducido 0.1 M y 0.2 mL de Na₂HPO₄ 0.067 M. Esta mezcla fue

pre-calentada a en baño de agua a 25 °C por 5 minutos, posteriormente se le agregaron 0.2 mL de H₂O₂ a 1.3 mM para iniciar la reacción catalítica. Se dejó reaccionar por 10 min y fue detenida mediante la adición de 1 mL de ácido tricloro acético al 1%. Esta mezcla de reacción fue puesta en baño de hielo por 30 min. Enseguida esta mezcla fue centrifugada a 3000 RPM por 10 min., finalmente 0.48 mL del sobrenadante se colocaron en la celdilla y se le agregaron 2.2 mL de 0.32 M de Na₂HPO₄ y 0.32 mL del colorante 5,5 ditio-bis-2 acido nitro benzoico (DTNB) 1 mM. Se leyó en espectrofotómetro UV-VIS a 412 nm.

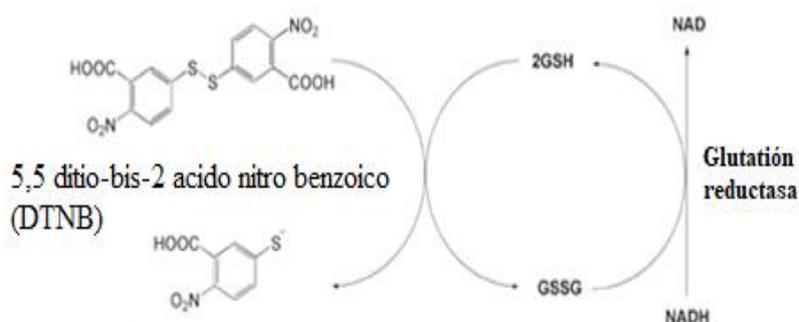


Figura 4. Mecanismo de la detección del glutatión mediante DTNB para la cuantificación de actividad enzimática de glutatión peroxidasa (Rahman et al. 2006)

Ascorbato Peroxidasa.

La técnica para la cuantificación de la actividad de la ascorbato peroxidasa se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido por Nakano y Asada (1987). En un volumen final de 2 mL se añadieron 0.1 mL del sobrenadante que contiene la enzima, 0.5 mL de 10 mg L⁻¹ de ascorbato y 1 mL a 100 mM de H₂O₂, a una temperatura de 22 °C después de 1 min, la reacción se detuvo con 0.4 mL de H₂SO₄ al 5%. Se cuantificó la tasa de oxidación del ascorbato mediante la disminución de la absorbancia a 266 nm.

Determinación del Glutatión

Se realizó espectrofotométricamente mediante la reacción con 5,5 ditio-bis-2 ácido nitrobenzoico (DTNB). Se colocó en un tubo de ensayo 0.48 mL del extracto y se le

agregaron 2.2 mL de fosfato dibásico de sodio Na_2HPO_4 0.32 M más 0.32 mL del colorante DTNB 1 mM. Se mezcló perfectamente y se leyó en espectrofotómetro UV-VIS a 412 nm (Xue et al. 2001) la absorbancia obtenida fue interpolada en la curva de calibración previamente estandarizada con glutatión reducido.

Determinación de Compuestos Fenólicos Totales

Se pesaron 200 mg del tejido liofilizado, el contenido de compuestos fenólicos totales se extrajo agregando 1 mL de la solución agua: acetona en una proporción 1:1 (Yu y Dahlgren 2000). Se sometió a vortex por 30 seg., posteriormente se sonificó por 5 minutos, finalmente se sometió a ultracentrifugación a 4 °C a 12500 rpm por 10 min. Se retiró el sobrenadante y la cuantificación se efectuó colorimétricamente mediante el reactivo Folin-Ciocalteu. La mezcla de la reacción se realizó de acuerdo a la Tabla 5. Una vez hecha la mezcla de reacción fue sometida a vortex y finalmente fue colocada a 45 °C durante 30 min para que la reacción fuera efectuada (Sultana et al. 2009; Nsor-Atindana et al. 2012). La curva de calibración se trazó con ácido gálico a concentraciones de 1, 5, 7.5, 10 y 12.5 mg L⁻¹ siguiendo el mismo protocolo para las muestras. Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico g⁻¹ de tejido seco.

Tabla 5. Mezcla de reacción para la cuantificación de fenoles totales.

	Blanco	Muestra
Extracto Fenólico (mL)	0	0.050
Solución agua:acetona	0.050	0
Folin (mL)	0.200	0.200
Na₂CO₃ (mL)	0.5	0.5
Agua destilada (mL)	5	5

Determinación Ácido Ascórbico

El ácido ascórbico se determinó mediante cromatografía de líquidos del extracto agua: acetona antes mencionado, usando las condiciones cromatográficas que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones cromatográficas para la cuantificación del ASC.

Fase Móvil	NaH ₂ PO ₄ 50 mM pH 2.8
Longitud de onda	230 nm
Flujo	1.0 mL min ⁻¹
Fase estacionaria	Aquasil C-18
temperatura	60 °C
Tiempo de corrida	15 min

Análisis de expresión génica.

Extracción de ARN

El tejido congelado fue macerado con nitrógeno líquido, posteriormente se pesaron 100 mg tejido en un tubo de 2 mL, e inmediatamente se agregó 1 mL del reactivo TRI. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se agregaron 200 µL de cloroformo y se agitó vigorosamente hasta que se tuvo un aspecto lechoso, la mezcla se incubó por 15 min a temperatura ambiente. La mezcla fue centrifugada a 12,000 g por 15 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo de 2 mL. Se agregaron 500 µL de isopropanol frío y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4 °C. Se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla de ARN con 1 mL de etanol al 70% frío, agitando haciendo inversiones del tubo. Se centrifugó a 7,500 g por 5 min a 4°C. Se removió el sobrenadante y se dejó secar la pastilla aprox. 15 min a temperatura ambiente. La pastilla de ARN se re suspendió con 50 µL de agua DEPC.

Cuantificación de ARN

Para la cuantificación del ARN se utilizó un espectrofotómetro UV VIS. Primero se llevó a cabo la medición del blanco (agua milli Q) y posteriormente las muestras. Para la medición de estas se agregaron 2 µL del extracto de cada muestra y 198 µL de agua milli Q y finalmente se leyeron las absorbancias a 260 y a 280 para obtener el valor R.

Calidad del ARN

La calidad del ARN se analizó mediante electroforesis desnaturalizante. Utilizando los datos obtenidos de la cuantificación de ARN para cada muestra. Se preparó un gel de agarosa al 1.3%, se sumergió en la cámara de electroforesis para ARN y se agregó solución MOPS 1X. Enseguida se cargaron cada una de las muestras en los pozos. La cámara se conectó a la fuente de poder, y se dejó correr a 70 volts por 1 hora 20 minutos. Se sacó el gel de la cámara con cuidado y se colocó en el transiluminador para ver las bandas. Se tomaron las fotos y se guardó en la computadora del transiluminador.

Síntesis de ADN complementario o cDNA.

Se requirieron 2 µg de ARN de las muestras para la reacción, se aforaron a 5 µL con agua DEPC, se agregó un control negativo con 4 µg de agua DEPC y 1 µg de random primer. Los tubos se calentaron a 70 °C por 5 minutos en una termo placa, inmediatamente se pasaron a 4°C por 5 minutos. Se centrifugaron por 10 segundos en micro centrífuga. Se hizo la mezcla en un tubo de 2 mL agregando 5.5 µL de agua libre de nucleasas, 4 µl de buffer de reacción 5X, 3 µl de MgCl₂, 1 µl de DNTP mix, 0.5 µl de inhibidor de ribonucleasa y 1 µl de transcriptasa reversa dando un total de 15 µL. Estos 15 µL de la mezcla se agregaron al tubo de la primera reacción, posteriormente se colocaron en el termociclador en las siguientes condiciones: 25°C por 5 min, 42°C por 60 min, 70°C por 15 min y 4°C hold, una vez terminado el tiempo de reacción, los tubos se guardaron a -20 °C.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez que se sintetizó el cADN se llevó a cabo la PCR con cada par de primers para un gen específico, en total se probaron dos pares de primers correspondientes a los dos genes a analizar, además de incluir un gen endógeno. Se realizó el coctel colocando en un tubo de 0.6 mL como se muestra en la Tabla 7:

Tabla 7. Mezcla de reacción para la realización de PCR.

<i>Reactivos</i>	<i>Volumen (IX)</i>

Agua destilada desionizada estéril	18 µl
Buffer para PCR 10x	2.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 µl
dNTPS (25 mM)	0.2 µl
Iniciador 5'-3' (15 pM)	0.83 µl
Iniciador 3'-5' (15 pM)	2.0 µl
Enzima Taq-Polimerasa (5 U/ml)	0.2 µl
TOTAL	24 µl

Se mezclaron los reactivos con la micropipeta, el tubo se depositó en un recipiente con hielo, posteriormente se depositaron 24 µL del coctel en un tubo de 0.2 µL, luego se adicionó 1 µL del cDNA de la muestra y se mezclaron con la micropipeta. Los tubos se introdujeron al termociclador, donde las condiciones de PCR fueron las siguientes: 10 minutos a 95°C, 30 ciclos (30 segundos a 95°C, 30 segundos de la TM del iniciador, 1 minuto a 72°C) y 10 minutos a 72°C. Una vez terminado el tiempo de corrida las muestras se guardaron a -20°C en el congelador.

Las secuencias de los iniciadores utilizados para identificar la expresión de los genes se realizaron con las secuencias del ARNm de los genes antes mencionados específicamente para *Solanum lycopersicum*, para el diseño de los iniciadores se utilizó el Software Primer designing tool (NCBI), donde se obtuvo la secuencia de los iniciadores, el tamaño del amplificado y la temperatura de anillamiento (TM).

Se paró una solución madre de cada iniciador de 100 pmol/µL y de esta se preparó una solución de trabajo de 15 pmol/µL.

La temperatura óptima de anillamiento TM de los iniciadores, se determinó por medio del contenido de ácidos nucleicos, el cual determinó el fabricante de los iniciadores (Macrogen, Corea).

Una vez obtenido el producto de la PCR, se realizó una electroforesis horizontal para verificar la presencia del amplificado de cada gen (banda), y comprobar con un marcador molecular las pares de bases de cada banda. En la Tabla 8 se presentan las secuencias de los iniciadores:

Tabla 8. Descripción de los primers de los genes analizados.

GEN	DESCRIPCIÓN	INICIADORES	TM (°C)	AMPLICÓN (pb)
-----	-------------	-------------	---------	---------------

CAT	Catalasa 1	5'-TACGGTTGGTGCAAGAGGTC 3'- CAGCACAGGTAAGGTGAGCA	60	167
SOD	Superoxidodismutasa	5'-TGATGATGGGCCAACTACGG 3'-ACCCGCATGACGGATTTTCAT	60	175
G3F	Gliceraldehído 3 fosfato	5'-GGAGTCGACCGGTGTTTTCA 3'- GGGAGCAAGGCAATTTGTGG	60	190

Electroforesis horizontal de agarosa al 3%.

En un vaso de precipitado se disolvió 4.5 g de agarosa en 150 mL de buffer TAE 1x (Trizma base, ácido bórico, EDTA 0.5 M) y se colocó en una parrilla de calentamiento (300°C) hasta que la mezcla se tornó transparente. Se dejó enfriar la agarosa hasta una temperatura de 45°C. La solución se vertió en un portagel al cual se le agregó un peine, se evitó dejar burbujas en el gel. Se dejó solidificar el gel de 15 a 20 minutos y se removió el peine. Sobre una tira de parafilm se colocó una gota (1 µl) de buffer de carga (50% de glicerol, 1 mM EDTA, 0.2% azul de bromofenol y 60 µg/mL de red gel), se colocaron 5 µl del ADN de una muestra (4 µl de marcador molecular 100 pb marca Axygen) y se mezcló succionando y expulsando de 5 a 10 veces. La mezcla se colocó en un pozo del gel, se colocó en la cámara de electroforesis y se agregó un volumen de buffer TAE 1x hasta cubrir completamente el gel. Las muestras se fraccionaron a 90 volts por 45 minutos. En el transiluminador de luz UV, se visualizó la banda correspondiente a cada gen.

Análisis semi-cuantitativo de la expresión de genes

Se realizó mediante el análisis por densitometría de imagen utilizando el software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Con este análisis se obtuvieron los datos numéricos de la expresión de los genes objeto.

Análisis estadístico

Con los datos obtenidos de las variables de crecimiento, antioxidantes y expresión de genes se hizo un análisis de varianza ($p \leq 0.05$) y una posterior prueba de comparación medias Tukey ($p \leq 0.05$) usando el *software* estadístico InfoStat (2008).

Etapa 2: Determinación del crecimiento, antioxidantes y contenido mineral en plantas adultas de tomate.

Material biológico.

Como material biológico fueron utilizadas semillas de tomate tipo saladette híbridas Toro, las cuales producen plantas de crecimiento determinado, de precocidad relativa, resistente a *Fusarium* raza 1 y 2. Las semillas fueron tratadas previamente con fungicidas y fueron adquiridas de la casa comercial Harris-Moran.

Condiciones de crecimiento.

El experimento se llevó a cabo en el año 2015, en las mismas instalaciones descritas en la etapa 1. La producción de plántulas de tomate se realizó en charolas de poliestireno, con el uso de sustrato *peat moss* y perlita en una proporción 1:5 respectivamente. En la siembra se colocó una semilla a 0.5 cm de profundidad, una vez sembrada se aplicó riego hasta percolación por los orificios de la charola, posteriormente se cubrieron con poliestireno negro en un sitio cerrado durante 9 días hasta la germinación. Una vez que apareció la primera plántula, las charolas fueron fijadas en un lugar del invernadero hasta el trasplante. Se mantuvo la humedad del sustrato en un 80%, esto se consigue al humedecer los contenedores hasta el punto que escurra por la parte inferior. La forma del riego se realizó directo al sustrato. Se utilizó un fotómetro digital (data logger) para medir la intensidad de la luz. Estos

manejos agronómicos se llevaron a cabo de acuerdo a lo establecido por Villasanti y Pantoja (2013).

Trasplante

El trasplante de las plántulas fue a los cincuenta días posteriores a la siembra. Dichas plántulas contaban con cuatro hojas verdaderas, habían explorado todo el sustrato de cada una de las cavidades de la charola y el tallo contaba con ligera lignificación, es decir, habían sido regadas una sola vez en los últimos cinco días. Las plántulas al trasplantarse se colocaron en el centro de una maceta de 10 L con una distribución de cinco plantas por m², cada plántula tenía cepellón completo para evitar el rompimiento de las raíces.

Tratamientos

Los tratamientos de yodo se iniciaron quince días posteriores al trasplante, fueron aplicados siguiendo un arreglo factorial. Los factores fueron: concentración y los niveles 0, 1 (0.126 mg L⁻¹) y 100 (12.6 mg L⁻¹) µM, especie química, con dos niveles yoduro (KI) y yodato de potasio (KIO₃), forma de aplicación con los niveles al sustrato y aspersión foliar y finalmente tiempo de aplicación; quincenal y diaria. Se realizaron diez repeticiones por tratamiento, siendo una unidad experimental una planta y dando un total de veinticuatro tratamientos, ver Tabla 9.

Tabla 9. Descripción de la aplicación de los tratamientos de yodo mediante factores y niveles empleados en las plantas de tomate.

Factor	Niveles
Concentración (µM)	0 1 100
Especie química	KI KIO ₃
Forma de aplicación	Sustrato (S) Foliar (F)
Tiempo de aplicación	Diario (D) Quincenal (15 D)

Los tratamientos puestos al sustrato fueron aplicados manualmente directo a la base del tallo, 50 mL de cada solución y la aplicación foliar se aplicó mediante aspersor en el has y envés de cada foliolo evitando el escurrimiento.

Muestreo

Cien días posteriores al trasplante se muestrearon completamente al azar cinco plantas para la medición de antioxidantes, las hojas más jóvenes completamente expandidas, así como un fruto en madurez de consumo (en color #6 en escala USDA), se colocaron en congelación a -20°C para posteriormente ser liofilizadas.

Y para la medición de minerales y biomasa se tomaron completamente al azar otras cinco plantas, sin embargo, para este muestreo se colectaron las plantas completas, se seccionaron por órganos (hojas, tallos, raíces) y se colocaron en un horno para su deshidratación y posterior análisis.

Evaluación de variables de crecimiento.

Las variables de crecimiento fueron medidas del mismo modo descrito para la etapa 1.

Evaluación de antioxidantes.

Los antioxidants enzimáticos SOD, CAT, APX, GPX así como los no enzimáticos ascorbato (ASC, DHA y ascorbato total) fueron extraídos y cuantificados tal como se describe en la etapa 1. Los análisis adicionales se describen a continuación:

Potencial óxido-reductor (ORP)

Fue medido con el uso de un potenciómetro marca Hanna HI 2211 en el extracto de las biomoléculas inmediatamente después a haberse obtenido, las unidades fueron expresadas en milivoltios.

Potencial antioxidante (PA)

Se efectuó mediante la técnica del DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), la forma oxidada de este radical absorbe a un máximo de 540 nm y la inhibición en la oxidación es atribuido directamente a la presencia de antioxidantes. La absorbancia fue leída en un lector de placas marca ELx800 mediante el uso de placas de 96

pocillos. Se trazó una curva de trolox y los resultados fueron expresados en unidades de mM de equivalentes trolox.

Análisis de Minerales.

Digestión ácida

Se pesó 1 g. del tejido de las muestras deshidratadas de cada órgano y fueron colocadas en un vaso de precipitado, se le adicionaron 30 mL de una mezcla 3:1 de ácido perclórico y nítrico, por un periodo de 2 horas, posteriormente fueron colocadas en una plancha de calentamiento hasta la clarificación de la mezcla. Finalmente fue aforado con agua destilada a 100 mL y filtrado con papel Whatman #11 (AOAC 1990).

Determinación de Minerales

De la extracción ácida fueron analizados mediante un espectrofotómetro de absorción atómica (AA) marca Varian *spectra-240 fs* con flama los siguientes elementos K, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn y Cu. El Nitrógeno (N) fue analizado mediante la técnica de micro Kjeldahl (Muller 1961) y el fósforo (P) mediante la técnica espectrofotométrica del ácido aminonaftolsulfónico (ANSA) de acuerdo con AOAC (1990) Todos los resultados fueron reportados en unidades de mg kg⁻¹.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico multivariado, transformando las variables originales a sus componentes principales (ACP) usando el paquete estadístico R versión 3.1.1. Este análisis estadístico fue aplicado para cada uno de los factores analizados en los tres conjuntos de variables: crecimiento, antioxidantes y minerales en hojas y frutos.

En esta etapa la finalidad fue realizar un análisis estadístico multivariado para observar la tendencia en conjunto de variables, en la etapa 1 se realizó un análisis univariado, a manera de observar el comportamiento de cada una de estas.

RESULTADOS

Etapa 1: Determinación de crecimiento, antioxidantes y expresión de genes en plántulas de tomate

Variables de crecimiento.

Biomasa.

El análisis de varianza y una posterior prueba de medias de Tukey, indicaron que los resultados obtenidos en la acumulación de biomasa de las plántulas de tomate tratadas con yodo de forma diaria, tanto yodato (IO_3) como yoduro (I) aplicados al sustrato fueron de 2.25 y 2.26 g. de peso seco total respectivamente, siendo este superior estadísticamente ($p < 0.05$) a las plántulas testigo, las cuales presentaron 0.93 g. de peso. Se puede observar en la Figura 5, que las plántulas sometidas a

tratamientos de yodo aplicado diariamente (a excepción de la aplicación diaria de I foliar) muestran una tendencia de mayor acumulación de biomasa, que las tratadas en forma quincenal a los 56 días posteriores a la siembra.

Figura 5. Comparación de la biomasa total de las plántulas tratadas con yodo y las testigos. Medias con la misma letra dentro de la columna no difieren estadísticamente ($P \geq 0.05$)

Altura

De acuerdo al análisis de varianza y la posterior prueba de medias Tukey, se encontró que ninguno de los tratamientos con yodo promueve una diferencia estadísticamente significativa ($p \geq 0.05$) en la altura de las plántulas, comparándolas con las plántulas testigo, tal como se puede observar en la Figura 6, esto comparado a los 56 días posteriores a la siembra.

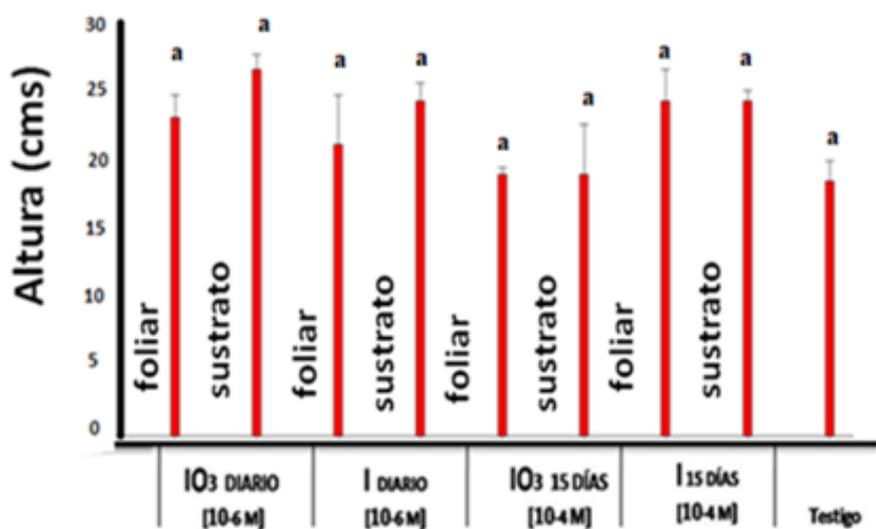


Figura 6. Comparación de la altura de las plántulas tratadas con yodo y las testigos. Medias con la misma letra dentro de la columna no difieren estadísticamente. ($P \geq 0.05$)

Número de hojas.

Respecto al número de hojas producidas después de 45 días de aplicar yodo, el análisis de varianza y la prueba de comparaciones de medias de Tukey, indicaron que no hay diferencias estadísticamente significativas, entre las plantas tratadas con yodo y las plantas no tratadas, tal como se puede observar en la Figura 7.

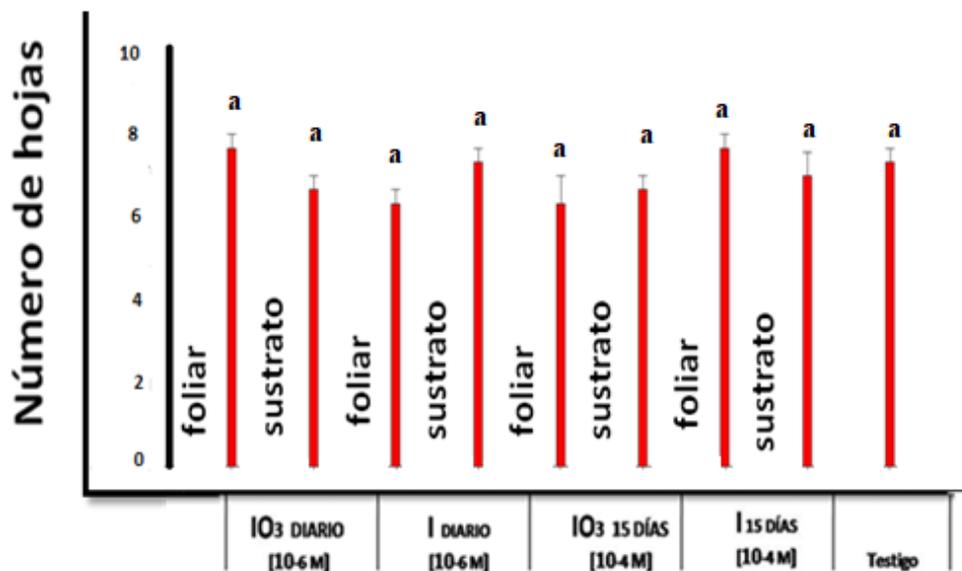


Figura 7. Comparación del número de hojas de las plántulas tratadas con yodo y las testigos. Medias con la misma letra dentro de la columna no difieren estadísticamente. ($P \geq 0.05$)

Evaluación de antioxidantes.

El análisis de varianza y las pruebas de medias de Tukey mostraron que cuatro tratamientos de yodo redujeron el % de actividad enzimática de la SOD en las hojas de las plántulas, dichos tratamientos fueron dos de aplicación quincenal (I^- sustrato y foliar) y dos de aplicación diaria (IO_3^- y I^- foliar). En el caso de las enzimas encargadas de neutralizar a los radicales peróxido (CAT, APX y GPX) no se encontraron diferencias estadísticamente significativos ($P>0.05$) comparando los tratamientos con los testigo.

Respecto a los antioxidantes no enzimáticos, se observó que la concentración del glutatión se incrementó con la aplicación de I^- y IO_3^- aplicados al sustrato cada quince días, así como la aplicación diaria de I^- vía aspersión foliar. Adicionalmente la concentración de ácido ascórbico (ASC) se incrementó con la aplicación diaria de I^- por aspersión foliar en comparación con las plantas testigo. El contenido de compuestos fenólicos totales no evidenció una diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.05$) en comparación con las plantas testigo (ver Tabla 10).

Los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos de las plántulas tratadas con yodo.							
SOD (% inh.)	CAT (UI)	APX (UI)	GPX (UI)	GSH (mg L ⁻¹)	ASC (mg L ⁻¹)	Ft (mg L ⁻¹)	
25.67 abc	9.71 10 ⁻⁷ a	5.2 10 ⁻⁶ a	5.1 10 ⁻⁵ a	7.36 cd	35.39 ab	8.38 a	
40.91 ab	4.7 10 ⁻⁷ a	9.0 10 ⁻⁷ a	7.6 10 ⁻⁵ a	9.11 bc	22.79 ab	9.62 a	
6.39 c	6.61 10 ⁻⁷ a	2.4 10 ⁻⁶ a	2.8 10 ⁻⁴ a	8.11 bcd	34.41 ab	7.42 a	
17.77 bc	9.2 10 ⁻⁷ a	6.1 10 ⁻⁶ a	6.2 10 ⁻⁴ a	12.98 a	23.54 ab	6.13 a	
20.86 bc	1.51 10 ⁻⁷ a	7.8 10 ⁻⁶ a	1.7 10 ⁻⁴ a	6.87 cd	30.59 ab	6.85 a	
24.53 abc	1.7 10 ⁻⁷ a	5.7 10 ⁻⁶ a	2.6 10 ⁻⁴ a	8.43 bcd	15.64 b	7.23 a	
19.4 bc	1 10 ⁻⁶ a	1.1 10 ⁻⁶ a	2.4 10 ⁻⁴ a	10.47 ab	41.69 a	8.61 a	
41.81 ab	2.5 10 ⁻⁶ a	4.8 10 ⁻⁶ a	2.8 10 ⁻⁴ a	5.85 d	28.16 ab	6.17 a	
45.45 a	1.51 10 ⁻⁶ a	5.3 10 ⁻⁶ a	8.2 10 ⁻⁵ a	5.65 d	18.71 b	6.2 a	
<0.01**	0.09 ns	0.28 ns	0.8 ns	<0.01**	<0.01**	0.28 ns	

SOD = superóxido dismutasa; CAT = catalasa; APX = ascorbato peroxidasa; GPX = glutatión peroxidasa; GSH = glutatión; ASC = ascorbato; Ft = fenoles totales.

Los niveles de significancia se presentan por el valor de P ($P \geq 0.05$) no significativo (NS), con el valor p ($P \leq 0.05$) *significativo, **altamente significativo ($P < 0.01$). Medias con la misma letra dentro de columna no difieren estadísticamente ($P \geq 0.05$). IO_3^- (yodato), I^- (yoduro). Los valores pequeños de UI se anotaron con notación científica base 10.

Análisis de la expresión génica.

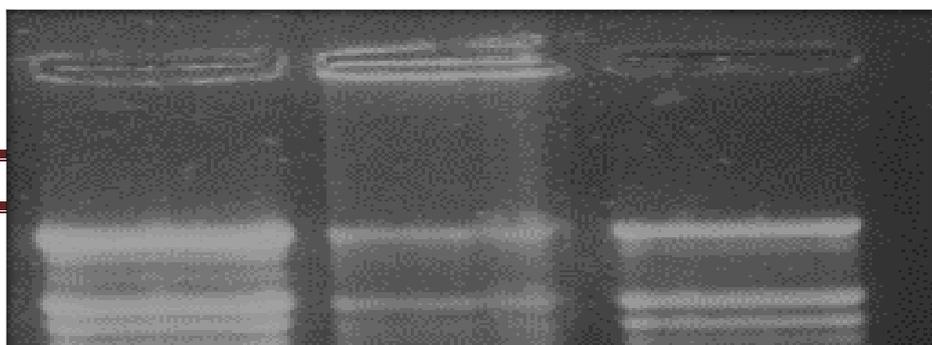
Análisis de la calidad del ARN

Después de un proceso de estandarización se procedió a extraer el ARN de tejido fresco de hoja a partir de las cuales se obtuvieron bandas definidas y a una concentración adecuada al ser analizadas en electroforesis en gel de agarosa (ver Figura 9). Posteriormente se procedió a hacer una lectura del ARN mediante espectrofotómetro UV-VIS para obtener la relación entre ácidos nucleicos (260 nm) y proteínas (280 nm) con la finalidad de verificar la calidad y cantidad del ARN obtenido.

1

2

3



Análisis semi-cuantitativo de la expresión del gen CAT (Catalasa).

El análisis de la expresión del gen CAT en de las plántulas no pudo efectuarse, es decir no se observó la expresión del gen evidenciado por la ausencia de las bandas (Figura 9, carriles 4, 5, 6 y 7), sin embargo, los genes endógenos actina y G3F si fueron amplificados tal como se observa en la Figura 9, carriles 2 y 3.

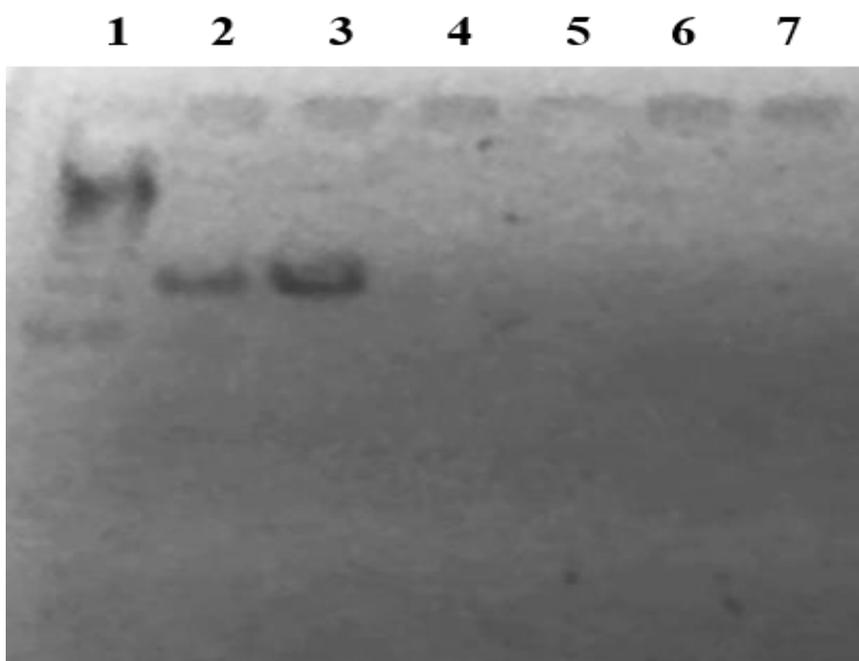


Figura 9. Electroforesis para la semi cuantificación de la expresión del gen CAT. 1. Marcador de peso molecular (marca Bioline), 2. Amplicón actina, 3. Amplicón gliceraldeido 3-fosfato, 4-7. Repeticiones muestras para la amplificación de gen Cat1 de hojas de plántulas tratadas con IO_3^- F 15 D.

Análisis semi-cuantitativo de la expresión del gen SOD (Superóxido dismutasa).

El análisis semi-cuantitativo de la expresión del gen SOD1 en las hojas de las plántulas de tomate mostraron un incremento de seis veces y media en la densidad relativa por la aplicación quincenal, ya sea de I^- y IO_3^- , directamente al sustrato respecto al testigo; el resto de los tratamientos no evidenciaron una modificación estadísticamente significativa ($p > 0.05$) (ver Figura 10).

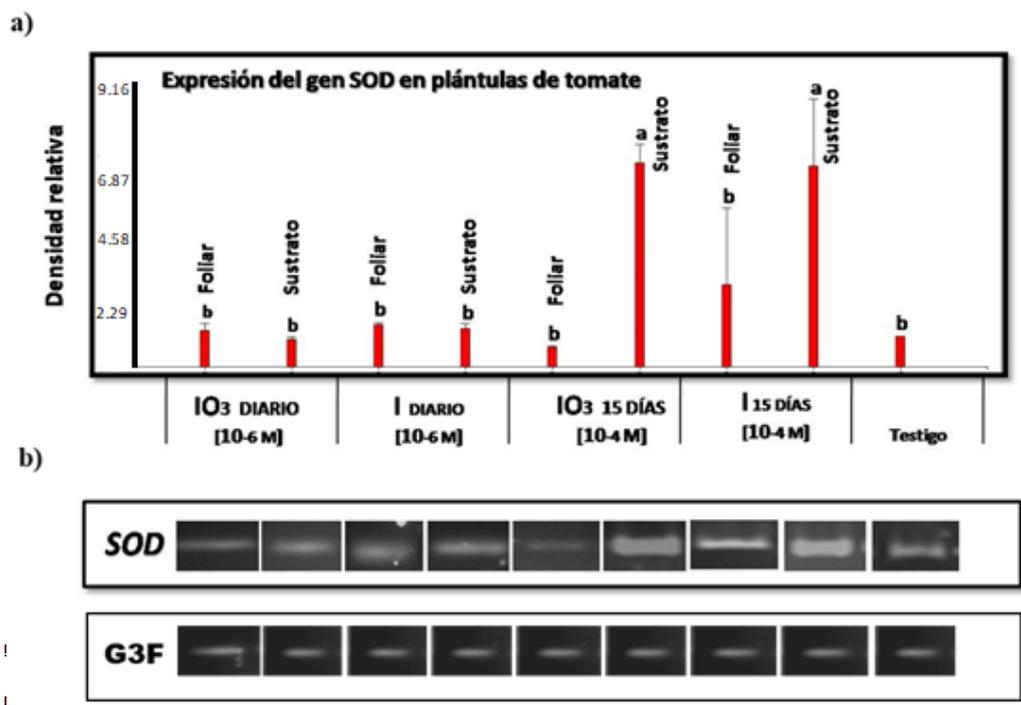


Figura 10. Electroforesis para la semi-cuantificación de la expresión del gen SOD1. **a)** Gráfica de la expresión del gen SOD1 en unidades de densidad relativa de los diferentes tratamientos con yodo. **NO** **b)** Análisis electroforético de la expresión del gen SOD1 en plántulas de tomate usando como control interno G3F.

Etapa 2: Determinación de crecimiento, antioxidantes y contenido mineral en plantas adultas de tomate.

Variables de crecimiento.

Respecto a las variables de crecimiento se encontró que la aplicación de la concentración 100 μM de yodo ejerció una correlación positiva con el número de hojas y el rendimiento, caso contrario a lo encontrado para la concentración 1 μM en la cual solo se registró una relación positiva con la altura.

En cuanto al factor especie química se observó un incremento en todas las variables de crecimiento tras la aplicación de IO_3 y una reducción tras la aplicación de I. Para el caso del factor forma de aplicación se encontró un incremento para la mayoría de variables de crecimiento con la única excepción del diámetro del tallo con la aplicación foliar, y hecho inverso con la aplicación directa al sustrato, finalmente en

el factor tiempo de aplicación, la tendencia al incremento en todo el conjunto de variables es dado por la aplicación quincenal y resultado opuesto con la aplicación diaria, como se puede ver en la Tabla 11.

Tabla 11. Comparación entre las tendencias al incremento (+) o decremento (-) en el crecimiento para cada factor analizado mediante componentes principales en las plantas de tomate.

Factor	Concentración (µM)			Especie química		Forma aplicación		Tiempo aplicación	
	0	1	100	I	IO ₃	S	F	D	15 D
Variable									
Biomasa	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Altura	-	+	-	-	+	-	+	-	+
Número de Hojas	-	-	+	-	+	-	+	-	+
Diámetro	+	-	+	-	+	+	-	-	+
Rendimiento	-	-	+	-	+	-	+	-	+

Los factores analizados en el ensayo se encuentran descritos en la Tabla 12 anotando los coeficientes con que cada variable contribuye al componente principal. Dichos coeficientes pueden interpretarse como indicadores de la importancia relativa (considerando magnitud y signo) en cada una de las variables originales de los componentes principales.

Para el factor concentración, se obtuvo que con los dos primeros componentes principales (CP1 y CP 2) se explica el 100% de la varianza. En el componente principal 1 se explica el 66.8% y el componente principal 2 el 33.2%. Asimismo, las mayores contribuciones del CP 1 están ejercidas por el número de hojas y el rendimiento y para el CP 2 las variables de biomasa, diámetro del tallo y altura, ver Figura 11 (a).

Respecto a los factores especie química, forma y tiempo de aplicación del yodo el componente principal 1 explica el 100% de la varianza, sin embargo, a pesar de esto el CP 2 es tomado en cuenta por ser necesario para la construcción de los biplots, ver Figura 11(b, c y d).

Tabla 12. Valores de los componentes principales (CP) para las variables de crecimiento de las plantas de tomate en cada uno de los factores: concentración (C), especie química (E), forma de aplicación (F) y tiempo de aplicación (T).

VARIABLE	CP1				CP2			
	C	E	F	T	C	E	F	T
Biomasa	0.36	0.45	-0.45	-0.45	0.59	0.09	0.02	-0.35
Altura	0.42	0.45	-0.45	-0.45	-0.49	0.15	0.24	-0.17
Número de hojas	0.53	0.45	-0.45	-0.45	-0.17	0.29	0.35	-0.14
Diámetro	0.37	0.45	0.45	-0.45	0.57	0.33	0.86	0.88
Rendimiento	0.52	0.45	-0.45	-0.45	-0.24	-0.87	0.24	-0.21

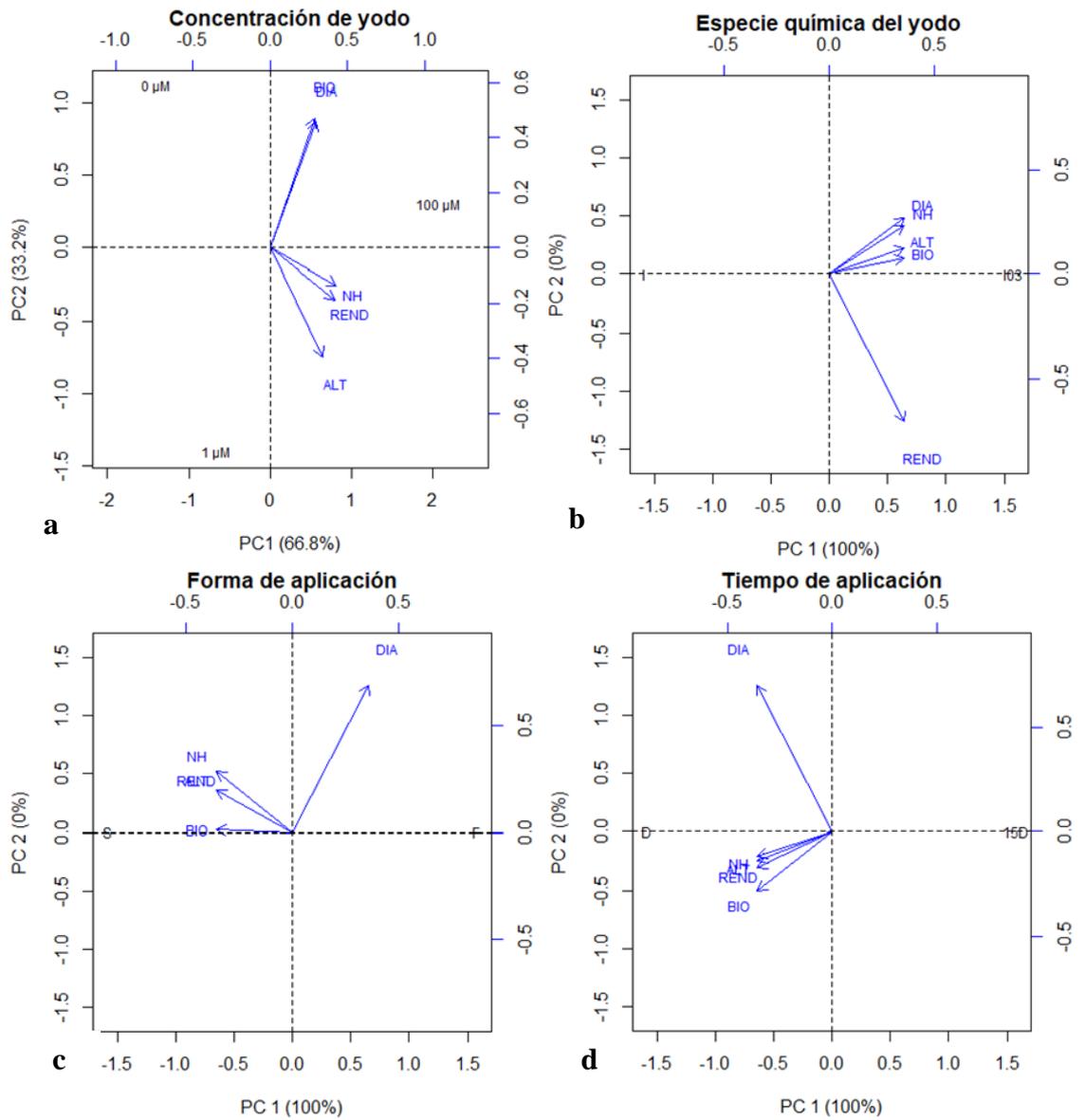


Figura 11. Gráficas biplots de componentes principales para las variables de crecimiento de las plantas de tomate. Factor de concentración (a), especie química (b), forma(c) y tiempo(d) de aplicación del yodo en las plantas de tomate.

Evaluación de antioxidantes.

Hojas

En los resultados obtenidos de las hojas de las plantas de tomate se encontró que el mayor efecto sobre el incremento en antioxidantes y minerales fue obtenido tras la aplicación de 100 μM de yodo. Esto se puede observar para el caso de la CAT, SOD, APX, GPX y GSH así como para los elementos N, Ca, K, Mg, Fe, Mn, Cu y el Zn. Adicionalmente se encontró una disminución para el PA, ASC, DHA, ASC total y el P. Para el caso de la aplicación de 1 μM se evidenció un incremento para ORP, P y Fe y un decremento para ASC y Cu, de igual manera comparándose con el testigo.

Para el factor especie química, tras la aplicación de I^- se obtuvo un incremento en la CAT, SOD, APX, GPX, PA, ASC, P y Zn, a su vez un deceso en el ORP, GSH, DHA, ASC t, N, Ca, K, Mg, Fe, Mn y Cu. Y bajo la aplicación de IO_3^- la tendencia encontrada fue exactamente la inversa.

En el factor forma de aplicación, se encontró la misma tendencia inversa entre la aplicación al sustrato y por aspersión foliar, mientras en la primera se evidenció un incremento para la mayoría de las variables evaluadas exceptuando el ORP y el P. Y la aplicación foliar solo mostró incremento en el ORP y el P.

Finalmente, para el factor tiempo de aplicación, la aplicación diaria evidenció un incremento en CAT, APX, GPX, GSH, DHA, ASCt, P, K, Mg, Fe, Cu y Zn, por otro lado, se encontró una reducción en SOD, PA, ORP, ASC, N, Ca y Mn. Y como ya se describió previamente el resultado opuesto fue mostrado para la aplicación quincenal. Estas tendencias pueden verse en la Tabla 13.

Tabla 13. Comparación entre las tendencias al incremento (+) o decremento (-) en antioxidantes y minerales en las hojas de las plantas de tomate para cada factor analizado mediante componentes principales.

Factor Variable	Concentración (μM)			Especie química		Forma aplicación		Tiempo aplicación	
	0	1	100	I	IO ₃	S	F	D	15 D
CAT	-	-	+	+	-	+	-	+	-
SOD	-	-	+	+	-	+	-	-	+
APX	-	-	+	+	-	+	-	+	-
GPX	-	-	+	+	-	+	-	+	+
PA	+	+	-	+	-	+	-	-	+
ORP	-	+	-	-	+	-	+	-	-
GSH	-	-	+	-	+	+	-	+	-
ASC	+	-	-	+	-	+	-	-	+
DHA	+	+	-	-	+	+	-	+	-
ASC T	+	+	-	-	+	+	-	+	-
N	-	-	+	-	+	+	-	-	+
P	-	+	-	+	-	-	+	+	-
Ca	-	-	+	-	+	+	-	-	+
K	+	+	+	-	+	+	-	+	-
Mg	-	-	+	-	+	+	-	+	-
Fe	-	+	+	-	+	+	-	+	-
Mn	-	-	+	-	+	+	-	-	+
Cu	+	-	+	-	+	+	-	+	-
Zn	-	-	+	+	-	+	-	+	-

En el factor concentración, se obtuvo que con los dos primeros CP explican el 100% de la varianza. En el CP 1 se explica el 70.8% y el CP 2 el 29.2%. Las contribuciones del CP 1 están ejercidas con magnitudes muy similares, salvo para las variables de Cu y Zn, las cuales muestran una contribución menor. Para el CP 2 las variables que más influyeron fueron el ORP, el ASC, P, Mg, Cu y Zn.

Para los factores especie química, forma y tiempo de aplicación el 100% de la varianza fue explicada mediante el componente principal 1, y teniendo todas las variables la misma contribución, ver Tabla 14 y Figura 12.

Tabla 14. Valores de los componentes principales (CP) para las variables de antioxidantes y minerales en hojas de las plantas de tomate, en cada uno de los factores: concentración (C), especie química (E), forma de aplicación (F) y tiempo de aplicación (T).

Variable	CP1				CP2			
	C	E	F	T	C	F	T	C
CAT	0.27	-0.23	0.23	0.23	0.07	-0.08	0.22	- 0.06
SOD	0.27	-0.23	0.23	- 0.23	-0.05	-0.06	0.15	- 0.01
APX	0.27	-0.23	0.23	0.23	0.09	-0.06	0.02	0.07
GPX	0.27	-0.23	0.23	0.23	0.07	-0.09	- 0.15	0.01
PA	-0.27	-0.23	0.23	- 0.23	0.10	-0.06	0.07	- 0.01
ORP	0.13	0.23	- 0.23	- 0.23	-0.36	0.07	0.04	0.02
GSH	0.27	0.23	0.23	0.23	-0.05	-0.26	- 0.65	- 0.73
ASC	-0.18	-0.23	0.23	- 0.23	0.31	-0.07	- 0.04	- 0.01
DHA	-0.24	0.23	0.23	0.23	0.18	0.07	- 0.06	0.05
ASC T	-0.24	0.23	0.23	0.23	0.20	0.07	- 0.06	0.04
N	0.24	0.23	0.23	- 0.23	0.20	0.07	- 0.04	- 0.12
P	-0.14	-0.23	- 0.23	0.23	-0.35	0.21	- 0.27	0.01
Ca	0.27	0.23	0.23	- 0.23	-0.03	0.18	0.18	0.28
K	-0.27	0.23	0.23	0.23	0.06	0.05	- 0.40	- 0.14
Mg	0.21	0.23	0.23	0.23	0.25	0.07	0.31	0.54
Fe	0.27	0.23	0.23	0.23	0.05	0.07	0.04	0.09
Mn	0.19	0.23	0.23	- 0.23	0.29	-0.86	- 0.04	- 0.05
Cu	-0.05	0.23	0.23	0.23	0.40	0.11	0.27	0.13
Zn	0.02	-0.23	0.23	0.23	0.41	-0.07	- 0.04	0.05

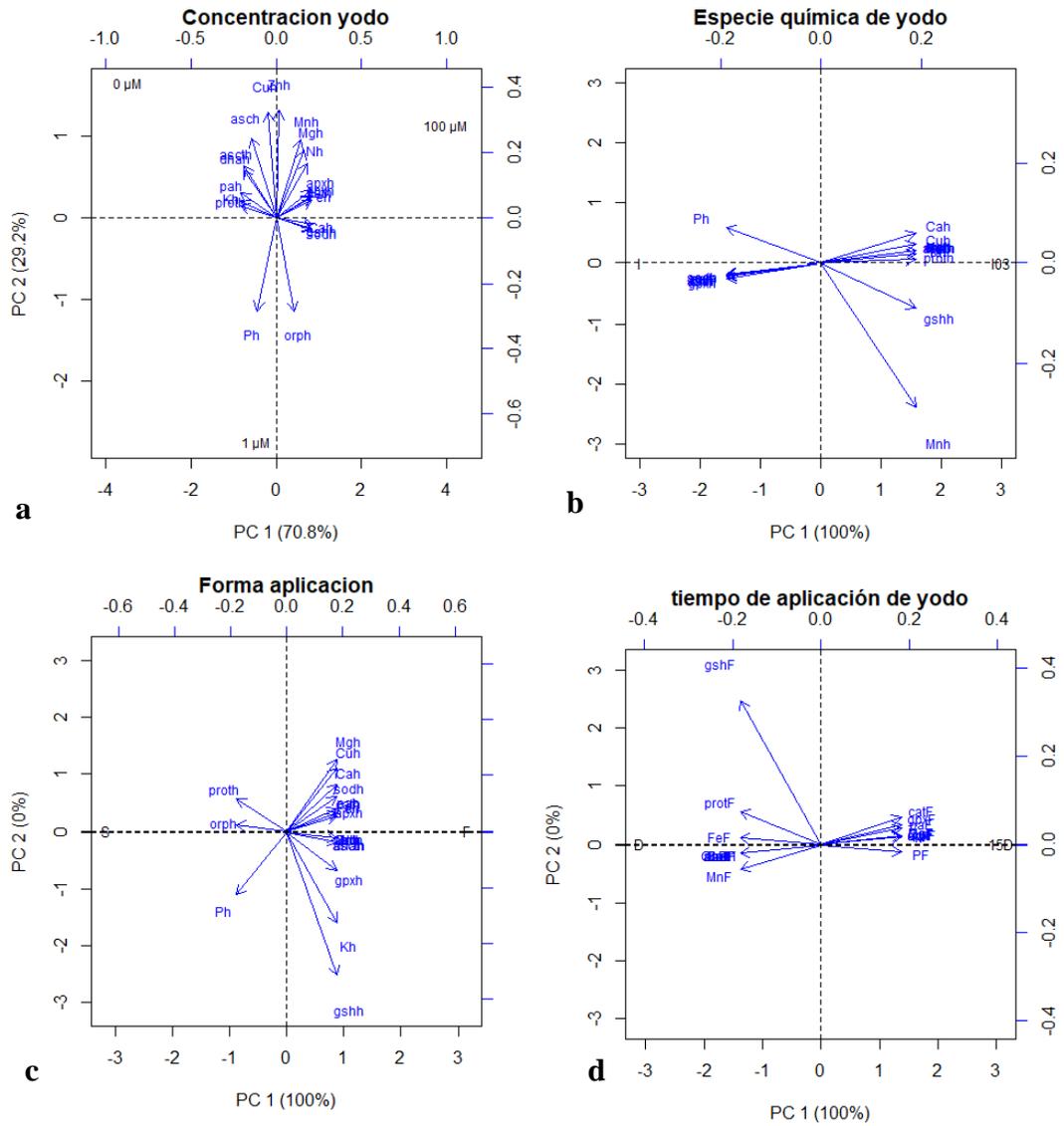


Figura 12. Gráficas biplots de componentes principales para las variables de antioxidantes y minerales en las hojas de las plantas de tomate. Factor de concentración (a), especie química (b), forma(c) y tiempo (d) de aplicación del yodo

Frutos

En los resultados encontrados en los frutos de las plantas de tomate se obtuvo que el mayor efecto al incremento en antioxidantes y minerales fue tras la aplicación de 100 μM de yodo. Esto para el caso de CAT, APX, GPX, PA, DHA, ASCT, así como para los elementos P, Mg y Mn y una disminución GSH, Ca, K, y Zn. Con la aplicación de 1 μM se encontró un incremento para SOD, ASC, N, Fe y Cu. En el factor especie química, la aplicación de Γ mostró un incremento en la actividad CAT, APX, GPX, GSH, ASC, DHA, ASC total, ORP y K así como un decremento para SOD, PA, ASC, N, P, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu y Zn. Y en la aplicación del IO_3 la respuesta fue la opuesta.

En el factor forma de aplicación se encontró un incremento en la CAT, APX, GPX, PA, Ca, Mg y Zn y una reducción en SOD, ORP, GSH, ASC, DHA, ASC t, N, P, K, Fe, Mn y Cu bajo la forma sustrato y una respuesta inversa con la forma foliar.

Finalmente para el factor tiempo de aplicación, la diaria evidenció un incremento en CAT, APX, GPX, PA, ORP, N, P, K, Mg y Cu por otro lado se encontró una reducción en SOD, GSH, ASC, DHA, ASCT, Ca, Fe, Mn y Zn como ya se describió previamente el resultado opuesto fue mostrado para la aplicación quincenal. Dichas tendencias pueden observarse en la Tabla 15.

Tabla 15. Comparación entre las tendencias al incremento (+) o decremento (-) en los antioxidantes y minerales en los frutos de las plantas de tomate para cada factor analizado mediante componentes principales.

Factor	Concentración			Especie		Forma		Tiempo	
	0	1	100	I	IO₃	S	F	D	15 D
CAT	-	-	+	+	-	+	-	+	-
SOD	-	+	-	-	+	-	+	-	+
APX	-	-	+	+	-	+	-	+	-
GPX	+	-	+	+	-	+	-	+	-
PA	-	-	+	-	+	+	-	+	-
ORP	-	+	-	+	-	-	+	+	-
GSH	+	+	-	+	-	-	+	-	+
ASC	-	+	-	-	+	-	+	-	+
DHA	-	-	+	+	-	-	+	-	+
ASC T	-	-	+	+	-	-	+	-	+
N	-	+	-	-	+	-	+	+	-
P	-	-	+	-	+	-	+	+	-
Ca	+	+	-	-	+	+	-	-	+
K	+	+	-	+	-	-	+	+	-
Mg	-	-	+	-	+	+	-	+	-
Fe	-	+	-	-	+	-	+	-	+
Mn	-	-	+	-	+	-	+	-	+
Cu	-	+	-	-	+	-	+	+	-
Zn	+	+	-	-	+	+	-	-	+

Para el factor concentración, se obtuvo que con los dos primeros componentes principales se explica el 100% de la varianza. En el componente principal 1 se explica el 64.5% y el componente principal 2 el 35.5%. Las mayores contribuciones del CP 1 están ejercidas por la CAT, APX, GSH, DHA, ASCt, el P, Mn y el Zn, mientras que para el CP 2 las variables que más influyeron fueron SOD, Cu y el Fe.

De modo similar a los resultados encontrados en las hojas, para los factores especie química, forma y tiempo de aplicación, la varianza fue explicada al 100% por el componente principal 1 y todas las variables mostraron la misma contribución (ver Tabla 16 y Figura 13)

Tabla 16. Valores de los componentes principales (CP) para las variables de antioxidantes y minerales en los frutos de las plantas de tomate en cada uno de los factores: concentración (C), especie química (E), forma de aplicación (F) y tiempo de aplicación (T).

<i>Variable</i>	CP1				CP2			
	C	E	F	T	C	E	F	T
CAT	0.27	-	0.23	0.23	0.06	0.28	0.42	0.27
		0.23						
SOD	0.12	0.23	-0.23	-0.23	-0.36	-	0.05	-
						0.01		0.04
APX	0.27	-	0.23	0.23	0.06	0.01	0.01	0.02
		0.23						
GPX	0.18	-	0.23	0.23	0.31	0.05	-0.03	0.09
		0.23						
PA	0.26	0.23	0.23	0.23	0.13	-	-0.04	0.09
						0.01		
ORP	-0.17	-	-0.23	0.23	-0.31	0.01	0.02	0.02
		0.23						
GSH	-0.27	-	-0.23	-0.23	-0.07	0.53	0.75	0.92
		0.23						
ASC	0.02	0.23	-0.23	-0.23	-0.40	0.07	0.03	-

								0.04
DHA	0.27	-	-0.23	-0.23	0.10	0.01	0.03	-
		0.23						0.04
ASC T	0.27	-	-0.23	-0.23	0.07	0.01	0.03	-
		0.23						0.04
N	0.20	0.23	-0.23	0.23	-0.27	-	-0.22	0.02
						0.13		
P	0.27	0.23	-0.23	0.23	0.06	-	0.05	-
						0.02		0.07
Ca	-0.25	0.23	0.23	-0.23	0.17	0.13	0.04	-
								0.04
K	-0.24	-	-0.23	0.23	0.18	-	-0.41	0.02
		0.23				0.76		
Mg	0.23	0.23	0.23	0.23	-0.22	-	-0.02	0.04
						0.01		
Fe	-0.11	0.23	-0.23	-0.23	-0.36	0.02	0.08	0.04
Mn	0.27	0.23	-0.23	-0.23	-0.07	-	-0.06	-
						0.01		0.13
Cu	0.12	0.23	-0.23	0.23	-0.36	0.01	0.06	0.04
Zn	-0.27	0.23	0.23	-0.23	-0.01	0.96	0.06	-
								0.04

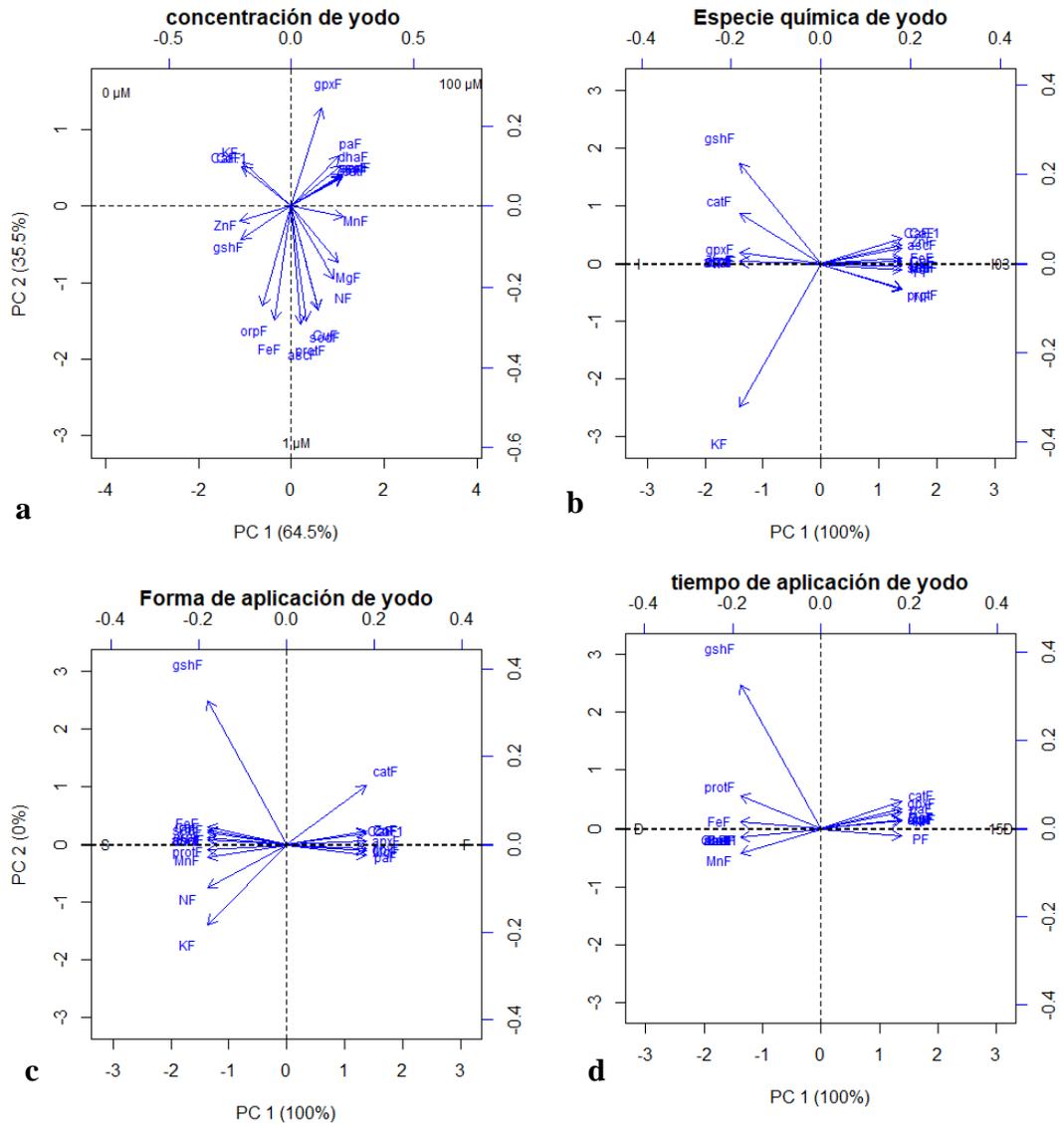


Figura 13. Gráficas biplots de componentes principales para las variables de antioxidantes y minerales en los frutos de las plantas de tomate. Factor de concentración (a), especie química (b), forma(c) y tiempo (d) de aplicación del yodo

DISCUSIONES

Etapa 1: Determinación del crecimiento, antioxidantes y expresión de genes en plántulas de tomate.

Variables de crecimiento.

En el presente estudio ninguno de los parámetros de crecimiento (biomasa, altura y número de hojas) se encontró reducido tras la aplicación de los tratamientos con yodo, por el contrario con las aplicaciones al sustrato diarias (1 μM) de I^- y IO_3^- se observó un incremento en la biomasa, lo cual es similar a lo obtenido por otros investigadores, ejemplos de esto se ha encontrado en cultivos en hidroponía con especies de hoja como espinaca y col china, en donde el crecimiento se incrementa (Weng et al. 2008b; Zhu et al. 2003) a concentraciones de I^- y de IO_3^- tan bajas como 0.5 y 1 μM . Sin embargo, también se ha notado que en este mismo tipo de cultivo estas especies alcanzan una disminución de la biomasa a concentraciones que excedan los 10 μM de I^- y con el IO_3^- se ha encontrado una resistencia de hasta 240 μM (Blasco et al. 2008).

Por otra parte, Landini et al. (2011) realizaron un experimento en el cual aplicaron altas concentraciones de yodo que van desde 5 mM a 20 mM (5000 a 20000 μM) de I^- (KI) en plantas de tomate bajo cultivo en hidroponía y observaron que a pesar de sufrir signos de toxicidad como clorosis y quemaduras en el borde de las hojas, las plantas sobrevivieron y produjeron frutos. Por lo que concluyeron que las plantas de tomate son resistentes a altas concentraciones de yodo ya que fueron capaces de completar su ciclo reproductivo. De modo similar Kiferle et al. (2013) realizaron un experimento con plantas de tomate aplicando yodo semanalmente al suelo en concentraciones de 1, 2 y 5 mM de I^- y 0.5, 1 y 2 mM de IO_3^- , encontrando que la biomasa de las plantas no se vio disminuida respecto a los testigos salvo con las aplicaciones de 5 mM de I^- .

Las plántulas tratadas en este trabajo, recibieron al final del tratamiento un total de 30 μM de yodo en las aplicaciones diarias y un total de 300 μM en las plantas con tratamientos quincenales, las cuales se consideran concentraciones altas, comparadas con las concentraciones utilizadas para la experimentación en cultivos sin suelo. Lo

que corrobora lo previamente descrito: las plántulas de tomate son capaces de resistir grandes cantidades de este elemento, probablemente debido a un equilibrio entre la acumulación y/o volatilización, lo que convierte a esta especie en una buena opción para intentar la biofortificación, así como mejorar la tolerancia al estrés.

Evaluación de antioxidantes.

Se evaluaron las actividades enzimáticas de las enzimas SOD, CAT, APX y GPX, la actividad enzimática de SOD fue la única que respondió a los tratamientos aplicados. El análisis de actividad SOD demostró una tendencia a la disminución en algunos de los tratamientos aplicados, y otros no presentaron cambios significativos respecto al control

Los tratamientos que mostraron disminución en la actividad enzimática de SOD fueron: Γ foliar y Γ al sustrato aplicados cada quince días (300 μM final), así como en IO_3^- y Γ foliar aplicado diariamente (30 μM final). Estos resultados son similares a los previamente reportados por Blasco et al. (2011) para el caso de la aplicación de Γ a 20, 40 y 80 μM los cuales evidenciaron una reducción en la actividad SOD en plantas de lechuga, pero contrario a lo observado para la aplicación de IO_3^- , en donde se encontró que a concentraciones mayores de 40 μM incrementó la actividad SOD. Leyva et al. (2011), obtuvieron un incremento en la actividad de SOD tras la aplicación de IO_3^- a la concentración de 80 μM . Por otro lado, Gupta et al. (2015) encontraron que la actividad de SOD aumentó en los tratamientos con IO_3^- con 40 μM pero no con 20 u 80 μM .

El anión superóxido es usualmente el primer radical libre formado de manera natural en la fotosíntesis y respiración, por lo tanto, la SOD representa una línea primaria de control del estrés oxidativo (Gill y Tuteja 2010). A pesar de ello en este experimento se encontró la actividad de esta enzima disminuida cuando se aplicó Γ así como IO_3^- a concentración baja (30 μM final). Aunque existen pocos reportes al respecto en plantas terrestres, en plantas marinas se ha encontrado que el yoduro es capaz de reaccionar de manera rápida y directa con radicales libres provenientes de los sistemas bioquímicos energéticos, tales como el superóxido, el oxígeno singlete, incluso sobre el hidroxilo, a tasas de 12 a 500 veces más altas que el ascorbato o el glutatión (Luther et al. 1995; Kupper et al. 2008). Es posible que eso mismo pueda

ocurrir en el caso de las plantas de tomate, tras la aplicación de la forma reducida del yodo (I^-), dando lugar a una neutralización directa de dichos radicales libres formados y originando por ello una disminución en la actividad de SOD.

Como se mencionó anteriormente, para la actividad catalasa (CAT), glutatión (GPX) y ascorbato peroxidasa (APX), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las plantas tratadas, contrario a lo reportado por Blasco et al. (2011) y Gupta et al. (2015). Blasco et al. (2011), observaron un incremento en la actividad CAT a concentraciones mayores de $80 \mu M$ tanto de I^- como IO_3^- , encontrando igualmente con estas concentraciones graves daños de toxicidad y reducción de biomasa. Así mismo observaron un incremento en la actividad APX tras la aplicación de yodo en forma de IO_3^- a todas las concentraciones aplicadas (20 , 40 y $80 \mu M$) sin observar reducción de biomasa; sin embargo, en los tratamientos con I^- no se encontraron diferencias en dicha actividad. Gupta et al. (2015) también reportaron aumento en la actividad de CAT en los tratamientos de IO_3^- a una concentración de $40 \mu M$ pero en combinación con $CdCl_2$ a $100 \mu M$, lo cual posiblemente sea debido al estrés inducido por el metal pesado. Por otra parte, evidenciaron un incremento en la actividad de APX tras la aplicación de IO_3^- a concentraciones de 20 y $40 \mu M$ en plantas tratadas con $100 \mu M$ de $CdCl_2$.

Se sabe que la función de la catalasa es reducir el peróxido a agua y oxígeno para impedir la formación del radical OH^\cdot (Asada 1999); en tanto que la APX está involucrada en la destoxificación del H_2O_2 usando como donador de electrones al ascorbato (ASC) (Nakano y Asada 1987). En este trabajo los tratamientos con yodo aparentemente no modificaron el estatus basal de estas enzimas, posiblemente por el efecto al verse disminuida la actividad de SOD, la formación de H_2O_2 también se redujera, manteniendo la actividad CAT y APX en un nivel basal, por lo que no presentaron variaciones al respecto. De modo similar a lo descrito anteriormente para APX y catalasa la actividad enzimática de glutatión peroxidasa no mostró diferencias entre tratamientos con yodo y testigo. Dado que la glutatión peroxidasa también es una enzima degradadora de H_2O_2 (Bela et al. 2015), probablemente la ausencia de diferencias entre tratamientos también pueda explicarse como consecuencia de la menor actividad de SOD.

En los resultados obtenidos de glutatión, se encontró un incremento en la concentración de este antioxidante no enzimático en la aplicación quincenal de IO_3^- al sustrato y I^- al sustrato. El efecto fue notable en el tratamiento de aplicación diaria de I^- foliar, el cuál coincide con la disminución de la actividad de la SOD.

Si bien no se encontró información acerca de la relación entre el yodo y el glutatión en tomate; en plantas de lechuga cultivadas en hidroponía, Leyva et al. (2011) obtuvieron un incremento en la concentración de glutatión tras la aplicación de IO_3^- a una concentración de 20 μM . La respuesta, sin embargo, fue diferente en el estudio de Blasco et al. (2011) quienes obtuvieron también en la lechuga una disminución en la concentración del glutatión a concentraciones de 80 μM . Lo que pone en evidencia que la influencia del yodo varía de acuerdo a la especie vegetal, formas químicas y concentraciones aplicadas, entre otros factores.

En el caso de la concentración del ascorbato, se encontró un incremento tras la aplicación del tratamiento de I^- foliar aplicado diariamente, mismo tratamiento en el cual se evidenció disminución de la actividad de SOD e incremento en la concentración de GSH. De modo similar Weng et al. (2008) determinaron un incremento en la concentración del ascorbato en espinacas cultivadas en hidroponía, al añadir yodo en forma de I^- , mas no con la de IO_3^- , pero a concentraciones mucho más bajas que las aquí aplicadas: 0.33 y 0.66 μM de I^- . Por otra parte Blasco et al. (2011) encontraron la mayor concentración de ascorbato en plantas de lechuga con los tratamientos de I^- a la concentración de 80 μM , misma concentración en la cual las plantas presentaron una severa disminución en la biomasa. Por otra parte, Leyva et al. (2011) encontraron un incremento en el ascorbato, en plantas de lechuga al aplicar IO_3^- en concentraciones menores a 40 μM . La discrepancia en los resultados quizá pudiera explicarse por el uso de diferentes especies vegetales y formas químicas de yodo.

Para el caso de los fenoles totales no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos y el testigo. No se encontraron trabajos previamente realizados en los cuales se cuantificara estos compuestos tras la aplicación de yodo. Sin embargo, parte de la explicación del porque el yodo no modificó el estatus basal de estos compuestos pudiera relacionarse con el hecho de que la acumulación de fenoles es inducida en respuesta a la mayor cantidad de H_2O_2 resultante del estrés oxidativo (Sakihama et al. 2002). De nuevo, la menor actividad

de SOD, posiblemente derivada de un efecto antioxidante del yodo, lo que pudo ser la causa de la ausencia de diferencias entre tratamientos.

Análisis de expresión genética.

A nivel transcripcional se encontró un incremento en la expresión del gen SOD 1 (Zn-Cu SOD) después de una aplicación quincenal de I^- y IO_3^- al sustrato; sin embargo, este incremento en la expresión no correspondió a un incremento de la actividad enzimática de la misma, como previamente se ha expuesto. Lo anterior, probablemente sea debido a que en las plantas de tomate se han identificado al menos 9 genes que codifican para SOD: 4 para ZnCu SOD, 4 para Fe SOD y 1 Mn SOD en 12 cromosomas (Feng et al. 2016), sin embargo, en el presente trabajo solo fue analizada la expresión de SOD ZnCu (SOD1). Adicional a esto, se sabe que el mRNA de SOD 1 es dramáticamente regulado debido a un gran número de factores ambientales químicos, físicos y biológicos (Zelko et al. 2002) por lo que posiblemente se pudo haber sufrido de alguna regulación postranscripcional que impidió que la sobre expresión se presentará en forma de la proteína activa.

Por otra parte la enzima CAT es crucial en la detoxificación del radical H_2O_2 , es sintetizada copiosamente en organelos de producción energética como cloroplastos (se estima que de un 10-20% del flujo electrónico a través del fotosistema I ocurre una reducción incompleta del O_2 a H_2O_2) y en las mitocondrias, en donde se estima que cerca del 2% del O_2 utilizado es reducido a H_2O_2 (Asada 2006; Chance et al. 1973). Datos que prácticamente sitúa a esta enzima como constitutiva, por lo que la expresión de este gen debe encontrarse de manera constitutiva, sin embargo, en el presente trabajo no se logró realizar la amplificación del gen CAT 1. La falta de amplificación probablemente fue debida a una falla de tipo técnica, por lo que más experimentos con la síntesis de otros primers deberá efectuarse en el futuro.

Etapa 2: Determinación del crecimiento, antioxidantes y contenido mineral en plantas adultas de tomate.

Análisis del efecto de la concentración de yodo aplicado

Se compararon los resultados obtenidos con la aplicación de la concentración 1 y 100 μM con las plantas testigo. De modo general se observó un mayor crecimiento en las plantas, así como el rendimiento de los frutos con la aplicación de la concentración más alta utilizada (100 μM). Tal impacto probablemente fue debido al incremento en la absorción de los macro y micro elementos en el tejido foliar (exceptuando el P) y en los frutos (exceptuando P, Mg y Mn). Se ha reportado previamente que el yodo causa cambios en el estatus oxidoreductor del sistema que lo absorbe (Venturi 2011), tal hecho pudo desencadenar un cambio en la biodisponibilidad (Terzano et al. 2014) de los elementos esenciales mencionados, promoviendo una mayor absorción. Los resultados obtenidos y los previamente observados demuestran que las plantas de tomate tienen una gran capacidad de tolerar concentraciones altas de yodo, probablemente debido a un balance entre la acumulación, la sinergia en la absorción de los elementos esenciales (Zhang et al. 2014) y volatilización del yodo (Landini et al. 2011)

A diferencia de este cultivo, en otras especies se ha encontrado una gran variabilidad de resultados en el crecimiento tras la aplicación del yodo, es decir, no se ha demostrado un comportamiento general, y el efecto observado depende de la concentración, forma de aplicación, etc. Sin embargo, se ha notado que a concentraciones de > 1 a $< 45 \mu\text{M}$ las plantas pueden desarrollarse de manera normal y presentar efectos benéficos como un incremento de tolerancia al estrés y acumulación de este elemento en las partes comestibles con el fin de la biofortificación. Numerosos ensayos (Zhu et al. 2003; Weng et al. 2008; Caffagni et al. 2011; Kiferle et al. 2013; García Osuna et al. 2014; Smoleń et al. 2014) han comprobado que la aplicación de yodo a concentraciones altas ($> 45 \mu\text{M}$) provoca una evidente reducción en la biomasa y en el crecimiento, como producto de una posible toxicidad de este elemento. Dicha condición ha impedido establecer de manera sistémica e integral la aplicación de este elemento sobre los diferentes cultivos con la finalidad de obtener efectos benéficos sobre el crecimiento,

antioxidantes y absorción mineral. Sin embargo, con los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que las plantas de tomate son una excelente opción para incluir este elemento en la fertilización y obtener grandes beneficios.

La concentración de antioxidantes también fue favorecida únicamente por la aplicación más alta de yodo ($100 \mu\text{M}$) en las hojas de las plantas, el impacto de la aplicación de la concentración $1 \mu\text{M}$ sobre la concentración de antioxidantes fue prácticamente nula, encontrándose solamente un incremento en el ORP.

La concentración del ascorbato disminuyó, probablemente debido el consumo de este tras el incremento en la actividad de la APX, sin embargo, para poder evidenciar tal suposición se esperaba encontrar una mayor concentración de la forma oxidada: dehidroascorbato (DHA), pero no fue así. El DHA se encontró en una concentración disminuida y el glutatión se encontró incrementado a pesar del consumo por la GPX, esto probablemente puede estar relacionado con el ciclo de glutatión-ascorbato: el DHA es reducido a ASC por la enzima dehidroascorbato reductasa siendo el GSH el donador de electrones (Noctor y Foyer 1998; Asada 1999). De acuerdo a los resultados observados la balanza está inclinada hacia la reducción del GSH y no del ASC, para establecer de modo claro la implicación del yodo en este ciclo serían necesarios más estudios.

Finalmente, se pudo observar una reducción del potencial antioxidante (PA), sin evidencia de una alteración en el potencial oxidoreductor del sistema, a pesar de haberse encontrado incremento en las enzimas antioxidantes y glutatión. Si bien el principio de la técnica de medición del potencial antioxidante, es la neutralización de los radicales libres mediante todas las moléculas con potencial reductor (Floegel et al. 2011), este está más correlacionado con los antioxidantes no enzimáticos, debido a la mayor abundancia en hoja y fruto (particularmente compuestos fenólicos totales y ácido ascórbico). En el presente trabajo como ya se mencionó, se encontró una reducción en el contenido de ASC lo cual se reflejó en una reducción el PA.

En los frutos de tomate con la aplicación de la concentración de $100 \mu\text{M}$, se encontró un incremento en los antioxidantes enzimáticos CAT, GPX y APX pero una reducción en SOD, en cuanto a los antioxidantes no enzimáticos se observó una reducción en la concentración de GSH así como en el ascorbato reducido (ASC), por otro lado el incremento de la forma oxidada del ascorbato (DHA) lo que dio como

resultado un incremento en el ascorbato total, la razón probable de ello sería un incremento en el PA y una reducción en el ORP.

La concentración 1 μM solamente evidenció un incremento en SOD y ASC. Se sabe que la SOD es una enzima que se encuentra en la línea de defensa primaria, encargada de neutralizar al primer radical libre formado: superóxido, esta enzima dismuta el superóxido a peróxido y agua (Gill y Tuteja 2010) por lo que un incremento en la actividad de la SOD desencadenará un incremento en las enzimas antioxidantes con función de neutralización del peróxido (Mittler 2002) tal y como sucede con la actividad de catalasa, ascorbato peroxidasa y glutatión peroxidasa.

Medrano-Macías et al. (2016b) evidenciaron en un experimento realizado en plántulas de tomate, que el yodo producía en las hojas una reducción en la actividad de SOD, atribuyendo tal hecho a una posible neutralización directa por parte de este elemento sobre el radical superóxido, resultado opuesto a lo sucedido en el presente trabajo, en donde la respuesta de las plantas adultas sugieren que el yodo está actuando como un prooxidante, es decir, este elemento al ser sensible a cambios redox (Moisan et al. 1994) debido a sus múltiples estados de valencia (-1, 0, 1, 5 y 7) probablemente desencadenó un estrés oxidativo moderado, capaz de elevar el contenido de especies reactivas de oxígeno de su estado basal, motivo por el cual se encontró un incremento en la síntesis de antioxidantes para control del exceso de moléculas oxidantes (Suh et al. 2002). Sin embargo, el estrés generado por la concentración 100 μM no alcanza la magnitud de provocar una disminución en el crecimiento de las plantas. Las discrepancias entre la actividad enzimática antioxidante de plántulas y plantas adultas, pudieran radicar en el tiempo de exposición al yodo o al estadio de crecimiento de las plantas, esto pudiera estar evidenciando la capacidad dual del yodo: actuar bajo ciertas condiciones como un donador de electrones (antioxidante) o como receptor de estos (prooxidante) (Küpper et al. 2008; Venturi 2011).

Especie química del yodo

Los resultados obtenidos entre la aplicación de I^- y IO_3^- en las variables de crecimiento fue clara; un incremento en todas las variables de crecimiento en presencia de IO_3^- y una reducción con I^- . Además se encontró un incremento sustancial en la concentración de macro y micro elementos en las hojas y frutos de las plantas de tomate, exceptuando el P para hojas y K en los frutos, Previamente

Smoleń et al. (2011) para considerar el efecto de la especie química en la aplicación de yodo, realizaron la aplicación de KI en suelo y KIO_3 por aspersión foliar, concluyendo que no existe un cambio sustancial en la composición mineral en lechuga. Sin embargo, se encontró un incremento en el K, Mg, Ca, Mn y Cd así como una disminución en P, Cu y Zn independientemente de la dosis, forma y método de aplicación de yodo. Estos mismos autores encontraron posteriormente (Smoleń et al. 2014) que en tanto la aplicación foliar de KIO_3 reduce la concentración de Ca, Mg y Fe, la incorporación del mismo KIO_3 en la solución nutritiva no causa los efectos negativos en el contenido mineral. Los más recientes hallazgos realizados por Smoleń et al. (2015) confirman el antagonismo del yodo con los elementos K, Mg, Ca, S, Na, B, Cu, Fe, Mn, Zn, Cd y Pb en lechuga cultivadas en suelo. Por otro lado Blasco et al. (2012) encontraron una reducción en la absorción de N, K, P tras la aplicación de KI a 80 μM , sin embargo concentraciones de 20 y 40 μM no mostraron este efecto negativo; en cambio, tras la aplicación de KIO_3 a las mismas concentraciones, el balance mineral se mantuvo en óptimas concentraciones, incluso se encontró un incremento en Mg y Fe.

Por lo anterior, aunque no se ha establecido el mecanismo fisiológico y bioquímico de la interacción del yodo con la absorción de los minerales esenciales en las plantas, se ha demostrado que este puede tener efectos tanto de sinergia como antagonismo dependiendo de la concentración, especie química, tiempo y forma de exposición, así como la especie vegetal tratada. Sin embargo, se atribuyen las propiedades oxidoreductoras del yodo a cambios en la absorción mineral, Hageman et al. (1942) mencionan que de la oxidación de I^- a I_2 se desprende un potencial redox de -0.53 V, el cual de algún modo puede cambiar la biodisponibilidad de otros elementos. Por otro lado se ha hipotetizado la síntesis de enzimas reductoras del IO_3^- a I^- en raíz, posiblemente similares a la nitrato reductasa, y que indirectamente tengan un impacto en la absorción de nitrógeno así como en el estatus oxidoreductor del sistema (Smolen et al. 2014).

Respecto al contenido de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en hoja, la respuesta fue contrastante, por un lado, se encontró un incremento en las enzimas con actividad antioxidante (SOD, CAT, APX y GPX), así como un incremento en el PA y ASC tras la aplicación del I^- y por otro lado con la aplicación de IO_3^- se evidenció una reducción en todas las enzimas con actividad antioxidante y PA, pero un

incremento en los antioxidantes no enzimáticos GSH, ASC total y ORP. En los frutos la tendencia fue similar al de las hojas, con la aplicación del I^- se encontró un incremento en CAT, APX y GPX, GSH, DHA y una reducción en actividad enzimática de SOD, PA, y ASC y en contraste con la aplicación de IO_3^- un incremento en la SOD, en el ascorbato reducido, así como el PA.

Estos resultados evidenciaron un mayor efecto en la síntesis de antioxidantes por efecto de la aplicación de yodo en forma de yoduro; el cual pudiera estar relacionado con un proceso de toxicidad por que aunado a esto se evidenció una reducción en el crecimiento de las plantas y reducción en la concentración de elementos esenciales. Este efecto ha sido previamente reportado en otros cultivos (Blasco et al. 2008) y se ha explicado que el efecto del I^- es probablemente debido a una mayor tasa de movilización comparado con el IO_3^- (Kato et al. 2013). En cambio con la aplicación del yodato mostró tener un mejor efecto en frutos que en hojas, siendo una gran ventaja el encontrar incremento en SOD, ASC y el PA. Se ha concluido de previas investigaciones que el yodato ha mostrado mejores efectos sobre la síntesis de antioxidantes que el I^- , sin afectar el crecimiento de las plantas (Blasco et al. 2008; Medrano-Macías et al. 2016b).

Forma de aplicación.

La aplicación por aspersión foliar mostró un incremento en el crecimiento de las plantas de tomate, sin embargo, la concentración de todos los elementos esenciales analizados en las hojas se encontró disminuida para esta forma de aplicación, caso contrario para los frutos, en donde se evidenció un incremento en los minerales exceptuando Ca y Cu. Otros autores han encontrado el mismo fenómeno en experimentos de aplicación de yodo vía foliar (Smoleń et al. 2011), a pesar de encontrar una diferencia estadística en el balance de los elementos no tiene una afectación desde el punto de vista fisiológico y como se ha explicado anteriormente el mecanismo por el cual el yodo favorece o impide la absorción de otros elementos no está bien dilucidada, pero se atribuye a un posible cambio en el estado redox de la planta (Venturi 2011).

Se han demostrado respuestas favorables a la aplicación de yodo por aspersión foliar en el crecimiento y la acumulación de yodo, debido principalmente porque se evitan

las complejas interacciones de este elemento con los componentes del suelo (Eichert y Fernández 2011; Lawson et al. 2015). Adicionalmente se ha evidenciado que el yodo es capaz de ser absorbido por las estructuras aéreas, tanto por los estomas como por la cutícula cérica con alta eficiencia (Suh et al. 2002). Sin embargo, no se encontraron investigaciones acerca del efecto de la aplicación del yodo por aspersión foliar en el contenido de antioxidantes.

Los antioxidantes en las hojas de las plantas fueron estimulados mayoritariamente por la aplicación directa al sustrato, tanto los enzimáticos como para los no enzimáticos y el PA, adicionalmente se evidenció reducción en el ORP. Contrario a lo sucedido con la aplicación foliar, en donde se observó una reducción en todos los antioxidantes y en el PA de hoja, así como un incremento en el ORP. En cambio, en los frutos se encontró un incremento en la actividad enzimática de SOD y decremento en el resto de las enzimas antioxidantes, además in incremento en los antioxidantes enzimáticos ASC y GSH así como ORP. Este fenómeno pudiera estar relacionado con la diferencia en la tasa de absorción del yodo efectuado por las raíces y por las hojas de tomate, es decir una mayor tasa de movilización ocurrida desde la raíz, como se ha mencionado antes, el transporte de este elemento es efectuado principalmente vía xilema y solo en cantidades muy pequeñas es transportado vía floema (Landini et al. 2012) lo que pudo haber ocasionado una intoxicación, visto en términos de reducción de crecimiento e incremento de antioxidantes en las hojas.

Tiempo de aplicación.

La frecuencia de aplicación en el cual se observó un efecto favorable en las variables de crecimiento fue la aplicación quincenal y esto puede estar relacionado con el incremento en la concentración de N así como de Ca y Mn en las hojas y un incremento en Ca, Mg y Mn en los frutos. La respuesta entre los tiempos de aplicación (diaria y quincenal) no fue contundente, es decir con la aplicación diaria se encontró un incremento en las enzimas que degradan peróxido (CAT, APX y GPX), así como aumento en la concentración de GSH y DHA pero una reducción en el PA. En cambio, tras la aplicación quincenal se observó un incremento en la SOD y el ascorbato así como un incremento en el potencial antioxidante y una reducción en

el ORP, Antioxidantes clave en la defensa y conservación en el estatus redox de las células.

A pesar que los tratamientos de aplicación diaria recibieron un total de setenta y siete aplicaciones de yodo, lo que equivale a una concentración total aplicada de 77 μM con el tratamiento 1 μM y 7700 μM con el tratamiento de 100 μM , por otro lado los tratamientos de frecuencia quincenal obtuvieron un total seis aplicaciones, equivaliendo a un total de 6 μM y 600 μM de acuerdo a la tratamiento de concentración alta y baja respectivamente. Esto pudiera estar tratándose de un proceso de adaptación por parte de la planta. Es decir, la absorción del yodo aplicado quincenalmente otorgó el tiempo necesario para la movilización y metabolización del yodo, en cambio en las aplicaciones diarias se pudo estar suscitando una excesiva acumulación de yodo (Franke 1986; Michalojc y Szewczuk 2003) provocando una reducción en el crecimiento de la planta e incremento en la mayoría de los antioxidantes.

CONCLUSIONES

- 1- La biomasa de las plántulas de tomate se incrementa por la aplicación diaria de $1\mu\text{M}$ de I^- y IO_3^- al sustrato.
- 2- El crecimiento y el rendimiento en las plantas adultas de tomate se favorecen por la aplicación quincenal de IO_3^- a una concentración de $100\mu\text{M}$ vía foliar.
- 3- En plántulas la aplicación diaria de I^- vía foliar provoca una disminución en la actividad de SOD, así como un incremento en la concentración de GSH y ASC.
- 4- El contenido de algunos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos clave se incrementan en hoja con la aplicación diaria de I^- a $100\mu\text{M}$ directo al sustrato y en fruto por la aplicación foliar de I^- a $100\mu\text{M}$ cada 15 días.
- 5- La expresión del gen SOD1 se induce en plántulas tratadas quincenalmente con I^- y IO_3^- aplicados al sustrato a una concentración de $100\mu\text{M}$.
- 6- La concentración de minerales se incrementa en las partes aéreas con la aplicación diaria de IO_3^- a $100\mu\text{M}$ directo al sustrato, en tanto que la aplicación foliar diaria de $100\mu\text{M}$ de IO_3^- muestra tal efecto benéfico en fruto.
- 7- En forma general, se recomienda la aplicación de yodo bajo el tratamiento $100\mu\text{M}$ de IO_3^- por aspersión foliar cada 15 días, ya que este tratamiento no muestra efectos negativos sobre el crecimiento, proporciona el incremento de antioxidantes clave, así como macro y micro elementos esenciales benéficos para las plantas de tomate.

PERSPECTIVAS

Al finalizar el presente trabajo de investigación y visualizar la forma de aplicar yodo para obtener un impacto positivo sobre el crecimiento, el metabolismo antioxidante y contenido mineral en las plantas de tomate cultivadas en un sustrato inerte, el próximo gran paso sería someter las plantas a algún tipo de estrés, biótico o abiótico y comprobar el incremento en la tolerancia al estrés.

Otro punto de interés es investigar los mecanismos metabólicos bajo los cuales el yodo es capaz de proporcionar tal efecto benéfico. Incluso se esperaría resolver algunas dudas acerca de funciones aún no esclarecidas de este elemento hasta una posible esencialidad.

Adicionalmente se proyecta investigar la capacidad que tienen las plantas de tomate de acumular el yodo en los diferentes órganos y así poder relacionarlo con el efecto sobre el contenido de los antioxidantes y la expresión génica de estos.

Finalmente sería sumamente interesante escalar el experimento a plantas cultivadas en suelo, así como explorar la respuesta con otras especies vegetales.

LITERATURA CITADA

Aceves C, Anguiano B. 2009. Is iodine an antioxidant and antiproliferative agent for the mammary and prostate glands. Academic Press: New York, pp: 249-257.

Andersson M, Karumbunathan V, Zimmermann MB. 2012. Global iodine status in 2011 and trends over the past decade. *The Journal of nutrition* 142: 44–750.

AOAC. Official Methods of Analysis International. 1990. International, Gaithersburg, MD, USA, 17th Ed.

Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual review of plant biology* 50: 601-639.

Asada K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant physiology* 141: 391-396.

Aston SR, Brazier PH. 1979. Endemic goiter, the factors controlling iodine deficiency in soils. *Science of the Total Environment* 11: 99-104.

Bela K, Horváth E, Gallé Á, Szabados, L Tari, I, Csiszár J. 2015. Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *Journal of plant physiology* 176: 192-201.

Benton Jones J. 1998. *Plant Nutrition Manual*, CRC Press: UK, pp. 7-10.

Blasco B, Ríos JJ, Cervilla LM, Sánchez-Rodríguez E, Ruiz JM, Romero L. 2008. Iodine biofortification and antioxidant capacity of lettuce: potential benefits for cultivation and human health. *Annals of Applied Biology* 152: 289–299.

Blasco B, Ríos JJ, Leyva R, Cervilla LM, Sánchez-Rodríguez E, Rubio Wilhelmi MM. 2011. Does iodine biofortification affect oxidative metabolism in lettuce plants? *Biological trace element research* 142: 831–842.

Borst Pauwels GWFH. 1961. Iodine as a micronutrient for plants. *Plant Soil* 14: 377-392.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of milligrams quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Annalytical Biochemistry* 73: 248-254.

Caffagni A, Arru L, Meriggi P, Milc J, Perata P, Pecchioni N. 2011. Iodine fortification plant screening process and accumulation in tomato fruits and potato tubers. *Communications in soil science and plant analysis* 42: 706-718.

Chance B, Oshino N, Sugano T, Mayevsky A. 1973. Basic principles of tissue oxygen determination from mitochondrial signals. In *Oxygen Transport to Tissue*. Springer: US, pp. 277-292.

Charlton KE, Jooste PL, Steyn K, Levitt NS, Ghosh A. 2013. A lowered salt intake does not compromise iodine status in Cape Town, South Africa, where salt iodization is mandatory *Nutrition*. 29:630-634.

Colin C, Leblanc C, Wagner E, Delage L, Leize-Wagner E, Van Dorsselaer A, Kloareg B, Potin P. 2003. The Brown Algal Kelp *Laminaria digitata* Features Distinct Bromoperoxidase and Iodoperoxidase Activities. *The journal of biological chemistry* 26: 23545–23552.

Dai JL, Zhu YG, Zhang M, Huang YZ. 2004. Selecting iodine enriched vegetables and the residual effect of iodate application to soil. *Biological trace element research* 101:265-276.

De Benoist B, McLean E, Andersson M, Rogers L. 2008. Iodine deficiency in 2007: global progress since 2003. *Food and Nutrition Bulletin* 29: 195-202.

De Caffarelli E. 1997. Iodine. Consequences of a deficiency, of excessive iodine, and value of systematic supplementation. *Journal de gynecologie, obstetrique et biologie de la reproduction* 26: 90–94.

Dey(née Pathak) G, Mukherjee RK. 1984. Iodine treatment of soybean and sunflower seeds for controlling deterioration. *Field Crops Research* 9: 205–213.

Eichert T, Fernández V. 2011. Uptake and release of elements by leaves and other aerial plant parts. *Marschner's Miner Nutr High Plants Third Ed*, pp. 71–84.

Eichert T, Goldbach HE. 2008. Equivalent pore radii of hydrophilic foliar uptake routes in stomatous and astomatous leaf surfaces - further evidence for a stomatal pathway. *Physiologia Plantarum* 132: 491-502.

Feng K, Yu J, Cheng Y, Ruan M, Wang R, Ye Q, Zheng, Q. 2016. The SOD gene family in tomato: identification, phylogenetic relationships, and expression patterns. *Frontiers in plant science* 7.

Fernández V, Khayet M, Montero-Prado P, Heredia-Guerrero JA, Liakopoulos G, Karabourniotis G., & Val J. 2011. New insights into the properties of pubescent surfaces: peach fruit as a model. *Plant physiology*, 156: 2098-2108.

Fernández V, Brown PH. 2013. From plant surface to plant metabolism: the uncertain fate of foliar-applied nutrients. *Frontiers in Plant Science* 4, 289.

Fisher DA, Delange FM. 1998. Thyroid hormone and iodine requirements in man during brain development. *Iodine in Pregnancy* 1:1-33.

Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis* 24:1043–1048.

Franke W. 1986. The basis of foliar absorption of fertilizers with special regard to the mechanisms. In *Foliar Fertilization: Springer Netherlands*, pp. 17-25.

Franke W. 1967. Mechanisms of foliar penetration of solutions. *Annual Review of Plant Physiology* 18: 281-300.

Fuge R, Jhonson CC. 1986. The geochemistry of iodine -a review. *Environmental Geochemistry and Health* 8: 31-54.

Fuge R. 1996. Geochemistry of iodine in relation to iodine deficiency disease. In: Appleton, J. D.; Fuge, R. and Mccall, G. J. H. (Eds.). *Environmental geochemistry and health*. Geological Society Special Publication, London. pp: 201-211.

Fuge R. 2013. Soil and iodine deficiency. *Essentials of medical geology, part II Springer Netherlands*. pp: 417-432

García-Osuna HT, Benavides-Mendoza A, Rivas-Morales C, Morales-Rubio E, Verde-Star J, Miranda-Ruvalcaba R. 2014. Iodine application increased ascorbic acid content and modified the vascular tissue in *Opuntia ficus-indica*. *Pakistan Journal of Botany* 46: 127–134.

Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry* 48: 909-930.

Gupta N, Bajpai M, Majumdar R, Mishra P. 2015. Response of iodine on antioxidant levels of *Glycine max* L. grown under Cd²⁺ stress. *Advances in Biological research* 1:40-48.

Hageman RH, Hodge ES, McHargue JS. 1942. Effect of potassium iodide on the ascorbic acid content and growth of tomato plants. *Plant Physiology* 17: 465–472

Hetzel BS. 1989. *The story of iodine deficiency. An international challenge in nutrition*, Oxford University Press. Delhi.

Hetzel BS. 2002. Eliminating iodine deficiency disorders: the role of the International Council in the global partnership. *Bulletin of the World Health Organization*. 80: 410-412.

Hong CL, Weng HX, Qin YC, Yan AL, Xie LL. 2008. Transfer of iodine from soil to vegetables by applying exogenous iodine. *Agronomy for sustainable development* 28: 575–583.

Hurtevent P, Thiry Y, Levchuk S, Yoschenko V, Henner P, Madoz-Escande C. 2013. Translocation of ^{125}I , ^{75}Se and ^{36}Cl to wheat edible parts following wet foliar contamination under field conditions. *Journal of Environmental Radioactivity* 121: 43–54.

Itoh N, Toda H, Matsuda M, Negishi T, Taniguchi T, Ohsawa N. 2009. Involvement of S-adenosylmethionine-dependent halide/thiol methyltransferase (HTMT) in methyl halide emissions from agricultural plants: isolation and characterization of an HTMT-coding gene from *Raphanus sativus* (daikon radish). *BMC Plant biology* 9:116.

Jiang XM, Cao XY, Jiang JY, Tai M, James DW, Rakeman MA, Dou ZH, Mamette M, Amette K, Zhang ML, Delong GR. 1998. Dynamics of environmental supplementation of iodine: four years' experience of iodination of irrigation water in Hotien, Xinjiang, China. *Archives of Environmental Health: An International Journal* 53:238-239.

Johnson CC. 2003. *The Geochemistry of Iodine and its Application to Environmental Strategies for Reducing the Risks from Iodine Deficiency Disorders (IDD)*. Nottingham: British Geological Survey.

Kaplan DI, Denham ME, Zhang S, Yeager C, Xu C, Schwehr KA. 2014. Radioiodine biogeochemistry and prevalence in groundwater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 44: 2287–2335.

Kato S, Wachi T, Yoshihira K, Nakagawa T, Ishikawa A, Takagi D, Takahashi M. 2013. Rice (*Oryza sativa* L.) roots have iodate reduction activity in response to iodine. *Frontiers in Plant Science* 4:227.

Kiferle C, Gonzali S, Holwerda HT, Ibaceta RR, Perata P. 2013. Tomato fruits: a good target for iodine biofortification. *Frontiers in Plant Science* 4: 205.

Kupper FC, Carpenter L, Mcfiggans G, Palmere G, Waiteh T, Bonebergb E, Woitsch S, Weiller M, Abela R, Grolimund D, Potin P, Butler A, Luther G, Kroneck P, Meyer-Klaucke W, Feiters MC. 2008. Iodide accumulation provides kelp with an inorganic antioxidant impacting atmospheric chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 6954-6958.

Lailou A, Mam B, Oeurn S, Chea C. 2015. Iodized salt in Cambodia: trends from 2008 to 2014. *Nutrients* 7:4189-4198.

Landini M, Gonzali S, Perata P. 2011. Iodine biofortification in tomato. *Journal of Plant Nutrition and Soil Sciece* 174 : 480–486.

- Landini M, Gonzali S, Kiferle C, Tonacchera M, Agretti P, Dimida A, Perata P. 2012. Metabolic engineering of the iodine content in Arabidopsis. Scientific reports 2: 338.
- Lawson PG, Daum D, Czauderna R, Meuser H, Härtling JW. 2015. Soil versus foliar iodine fertilization as a biofortification strategy for field-grown vegetables. Frontiers in Plant Science 6:450.
- Lazarus JH, Bestwick JP, Channon S, Paradise R, Maina A, Rees R. 2012. Antenatal thyroid screening and childhood cognitive function. The New England Journal of Medicine.
- Le Blanc CC, Colin A, Cosse L, Delage S, La Barre P, Morin B, Fiévet C, Voiseux Y, Ambroise E, Verhaeghe D, Amouroux O, Donard E, Tessier P. 2006. Iodine transfers in the coastal marine environment: the key role of brown algae and of their vanadium-dependent haloperoxidases. Biochimie 88:1773-1785.
- Leung AM, Braverman LE, Pearce EN. 2012. History of US iodine fortification and supplementation. Nutrients 4: 1740-1746.
- Leyva R, Sánchez-Rodríguez E, Ríos JJ, Rubio-Wilhelmi MM, Romero L, Ruiz JM, Blasco B. 2011. Beneficial effects of exogenous iodine in lettuce plants subjected to salinity stress. Plant science 181: 195-202.
- Lu Z, Jenkyns HC, Rickaby RE. 2010. Iodine to calcium ratios in marine carbonate as a paleo-redox proxy during oceanic anoxic events. Geology 38:1107-1110.
- Luther GW, Wu J, Cullen JB. 1995. Redox chemistry of iodine in seawater: Frontier molecular orbital theory considerations. In: Huang, C. P., O'Melia, C. R., & Morgan, J. J. (Eds.), Advances in Chemistry: Washington, DC American Chemical Society, pp: 135- 155.
- Mackowiak CL, Grossl PR. 1999. Iodate and iodide effects on iodine uptake and partitioning in rice (*Oryza sativa* L.) grown in solution culture. Plant Soil 212:135-143.
- Medrano-Macías J, Leija-Martínez P, González-Morales S, Juárez-Maldonado A, Benavides-Mendoza A. 2016a. Use of Iodine to Biofortify and Promote Growth and Stress Tolerance in Crops. Frontiers in plant science 7
- Medrano-Macías J, Leija-Martínez P, Juárez-Maldonado A, Rocha-Estrada A, Benavides-Mendoza A. 2016b. Efecto de la aplicación de yodo sobre antioxidantes en plántulas de jitomate. Revista Chapingo Serie Horticultura XXII:133–143.
- Michalojc Z, Szewczuk C. 2003. Theoretical aspects of foliar nutrition. Acta Agrophisica 85: 9–17.

- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in plant science 7: 405-410.
- Moisan TA, Dunstan WM, Udomkit A, Wong GTF. 1994. The Uptake of Iodate By Marine Phytoplankton. Journal of Phycology 30:580–587.
- Moore RM, Groszko W. 1999. Methyl iodide distribution in the ocean and fluxes to the atmosphere. Journal of Geophysical Research: Oceans 104: 11163–11171.
- Moreda-Piñeiro A, Romarís-Hortas V, Bermejo-Barrera P. 2011. A review on iodine speciation for environmental, biological and nutrition fields. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 26: 2107–2152.
- Mottiar Y. 2013. Iodine biofortification through plant biotechnology. Nutrition 29: 1431-1433.
- Muller L. 1961. Un aparato micro-Kjeldahl simple para análisis rutinarios de materiales vegetales. Turrialba (CR) 11:17-25.
- Nakano Y, Asada K. 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. Plant Cell Physiology 28: 131–140.
- Noctor G, Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. Annual review of plant biology 49:249–79.
- Nsor-Atindana J, Zhong F, Mothibe K, Bangoura M, Lagnika C. 2012. Quantification of Total Polyphenolic Content and Antimicrobial Activity of Cocoa (*Theobroma cacao L.*) Bean Shells. Pakistan Journal of Nutrition 11: 574-579.
- Powell AA, Corbineau F, Franca-Neto J, Léchappé J, Mesterhazy A, Noli E, Tarp G. 2005. Towards the future in seed production, evaluation and improvement. Seed Science and Technology 33: 265-281.
- Rahman I, Kode A, Biswas SK. 2006. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. Nature protocols 1: 3159-3165.
- Ramos SJ, Faquin V, Guilherme LRG, Castro EM, Ávila FW, Carvalho GS, Bastos CEA, Oliveira C. 2010. Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. Plant soil and environment 12: 584–588.
- Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H. 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. Toxicology 177: 67-80.
- Sands R, Bachelard EP. 1973. Uptake of picloram by eucalypt leaf discs. New phytologist 72: 69-86.

Saunders RW, Kumar R, MacDonald SM, Plane JMC. 2012. Insights into the photochemical transformation of iodine in aqueous systems: humic acid photosensitized reduction of iodate. *Environmental Science and Technology* 46: 11854–11861.

Schnetger B y Muramatsu Y. 1996. Determination of halogens, with special reference to iodine, in geological and biological samples using pyrohydrolysis for preparation and inductively coupled plasma mass spectrometry and ion chromatography for measurement. *Analyst* 121:1627-1631.

Schonherr J. y Bukovac MJ. 1972. Penetration of stomata by liquids - dependence on surface-tension, wettability, and stomatal morphology. *Plant Physiology*. 49:813-819.

Shetaya WH, Young SD, Watts MJ, Ander EL, Bailey EH. 2012. Iodine dynamics in soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 77: 457-473.

Smolen S, Rozek R, Ledwozyw-Smolen I, Strzetelski P. 2011. Preliminary evaluation of the influence of soil fertilization and foliar nutrition with iodine on the efficiency of iodine biofortification and chemical composition of lettuce. *Journal of Elementology* 16:613–622.

Smolen S, Kowalska I, Sady W. 2014. Assessment of biofortification with iodine and selenium of lettuce cultivated in the NFT hydroponic system. *Scientia Horticulturae* 166:9–16.

Smolen S, Skoczylas Ł, Rakoczy R, Ledwozyw-Smolen I, Kopec A, Piatkowska E. 2015. Mineral composition of field-grown lettuce (*Lactuca sativa* L.) depending on the diversified fertilization with iodine and selenium compounds. *Acta Scientiarum Polonorum Horticulturae* 14: 97–114.

Steiner A. 1961. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and soil* 15: 134-154.

Suh HJ, Sook Kim C, Lee JY, Jung J. 2002. Photodynamic Effect of Iron Excess on Photosystem II Function in Pea Plants. *Photochemistry and photobiology* 75: 513-518.

Sultana B, Anwar F, Ashraf M. 2009. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules* 14: 2167-2180.

Sun WQ, Leopold AC. 1995. The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. *Physiologia Plantarum* 94: 94–104.

Terzano R, Cesco S, Mimmo T. 2014. Dynamics, thermodynamics and kinetics of exudates: crucial issues in understanding rhizosphere processes. *Plant Soil* 386:399–406.

Venturi S, Venturi M. 1999. Iodide, Thyroid and Stomach Carcinogenesis: Evolutionary Story of a Primitive Antioxidant?. *European journal of endocrinology* 140: 371-2.

Venturi S, Venturi M. 2007. Evolution of Dietary Antioxidants: Role of Iodine. *Tutto Sulla Nutrizione*, <http://www.tuttosullanutrizione.com/English/antioxidant-evolution-iodine.htm>.

Venturi S. 2011. Evolutionary significance of iodine. *Current Chemical Biology*. 5: 155–162.

Villasanti C, Pantoja A. 2013. El cultivo de tomate con buenas prácticas agrícolas en la agricultura urbana y periurbana. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i3359s.pdf>.

Voogt W, Holwerda HT, Khodabaks R. 2010. Biofortification of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with iodine: the effect of iodine form and concentration on growth, development and iodine uptake of lettuce grown in water culture. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90:906-913.

Weng HX, Weng JK, Yong WB, Sun XW, Zhong H. 2003. Capacity and degree of iodine absorbed and enriched by vegetable from soil. *Journal of Environmental Sciences* 15:107-111.

Weng HX, Weng JK, Yan AL, Hong CL, Yong W Bin, Qin YC. 2008. Increment of iodine content in vegetable plants by applying iodized fertilizer and the residual characteristics of iodine in soil. *Biological Trace Element Research* 123:218–228.

Weng HX, Hong CL, Yan AL, Pan LH, Qin YC, Bao LT, Xie LL. 2008b. Mechanism of iodine uptake by cabbage: effects of iodine species and where it is stored. *Biological trace element research* 125:59.

Weng HX, Yan AL, Hong CL, Qin YC, Pan L, Xie LL. 2009. Biogeochemical transfer and dynamics of iodine in a soil–plant system. *Environmental geochemistry and health* 31:401-411.

Weng HX, Liu HP, Li DW, Ye M, Pan L, Xia T. H. 2014. An innovative approach for iodine supplementation using iodine-rich phytogetic food. *Environmental Geochemistry and Health* 36: 815-828.

Whitehead DC. 1974. The influence of organic matter, chalk, and sesquioxides on the solubility of iodide, elemental iodine, and iodate incubated with soil. *Journal of soil sciences* 25: 461–470.

Whitehead DC. 1984. The distribution and transformations of iodine in the environment. *Environment International* 10: 321–339.

White PJ, Broadley M. 2009. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diet- Iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist* 182 :49-84.

World Health Organization. 2007. Assessment of the Iodine Deficiency Disorders and Monitoring their Elimination. A Guide for Programme Managers. Geneva.

Xue T, Hartikainen H, Piironen V. 2001. Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing Lettuce. *Plant and Soil* 237: 55–61.

Yu Z, Dahlgren R.A. 2000. Evaluation of methods for measuring polyphenols in conifer foliage. *Journal of Chemical Ecology* 26: 2119- 2140.

Zelko IN, Manriani YJ, Folz RJ. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine* 33: 337–349.

Zhang S, Yang H, Singh L. 2014. Organic acids in the rhizosphere- a critical review. *Plant Soil* 1225: 41–42.

Zhao J, Wang P, Shang L, Kevin M, Sullivan KM, Van der Haar F. y Maberly, G. 2000. Endemic goiter associated with high iodine intake. *American journal of public health* 90: 1633-63

Zhu YG, Huang YZ, Hu Y, Liu XY. 2003. Iodine uptake by spinach (*Spinacia oleracea* L.) plants grown in solution culture: effects of iodine species and solution concentrations. *Environment International* 29:33-37.

Zimmermann MB. 2009. Iodine deficiency. *Endocrine Reviews* 30: 376-408.