

# Respuestas fisiológicas y metabólicas a la aplicación foliar de aminoácidos en plantas de tomate



Tesis doctoral

**Marina Alfosea Simón**

Director:

**Dr. Francisco García Sánchez**

Codirectora:

**Dra. Inmaculada Simón Vilella**

**Orihuela, 2022**

Universidad Miguel Hernández de Elche  
**Escuela Politécnica Superior de Orihuela**

Programa de doctorado en recursos y tecnologías agrarias,  
agroambientales y alimentarias

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE  
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN RECURSOS Y TECNOLOGÍAS  
AGRARIAS, AGROAMBIENTALES Y ALIMENTARIAS



**RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y METABÓLICAS A LA APLICACIÓN  
FOLIAR DE AMINOÁCIDOS EN PLANTAS DE TOMATE**

**2022**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

**Marina Alfosea Simón**

Director:

**Dr. Francisco García Sánchez**

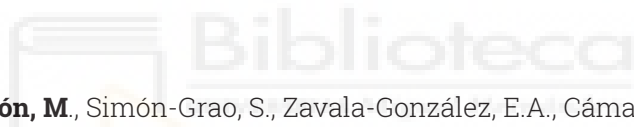
Codirectora:

**Dra. Inmaculada Simón Vilella**

Esta Tesis Doctoral, titulada "Respuestas fisiológicas y metabólicas a la aplicación foliar de aminoácidos en plantas de tomate" se presenta como **tesis por compendio de** las siguientes **publicaciones**:

**Alfosea-Simón, M.**, Simón-Grao, S., Zavala-González, E.A., Navarro, I., Martínez-Nicolás, J.J., Alfosea-Simón, F.J., Simón, I., y García-Sánchez, F. (2022). Ionic, metabolic and hormonal characterization of the phenological phases of different tomato genotypes using omics tools. *Scientia Horticulturae*, 293, 110697. DOI: 10.1016/j.scienta.2021.110697

**Alfosea-Simón, M.**, Simón-Grao, S., Zavala-González, E.A., Cámara-Zapata, J.M., Simón, I., Martínez-Nicolás, J.J., Lidón, V., y García-Sánchez, F. (2021). Physiological, nutritional and metabolomic responses of tomato plants after the foliar application of amino acids aspartic acid, glutamic acid and alanine. *Frontiers in Plant Science*, 11, 581234. DOI: 10.3389/fpls.2020.581234



**Alfosea-Simón, M.**, Simón-Grao, S., Zavala-González, E.A., Cámara-Zapata, J.M., Simón, I., Martínez-Nicolás, J.J., Lidón, V., Rodríguez-Ortega, W.M., y García-Sánchez, F. (2020). Application of biostimulants containing amino acids to tomatoes could favor sustainable cultivation: Implications for tyrosine, lysine, and methionine. *Sustainability*, 12 (22), 9729. DOI: 10.3390/su12229729

**Alfosea-Simón, M.**, Zavala-González, E.A., Cámara-Zapata, J.M., Martínez-Nicolás, J.J., Simón, I., Simón-Grao, S., y García-Sánchez, F. (2020). Effect of foliar application of amino acids on the salinity tolerance of tomato plants cultivated under hydroponic system. *Scientia Horticulturae*, 272, 109509. DOI: 10.1016/j.scienta.2020.109509

**IONOMIC, METABOLIC AND HORMONAL CHARACTERIZATION OF  
THE PHENOLOGICAL PHASES OF DIFFERENT TOMATO GENOTYPES  
THROUGH THE USE OF ICP, H-NMR, AND U-HPLC-MS**

Autores:

**Marina Alfosea-Simón, Silvia Simón-Grao, Ernesto A. Zavala-González, Iván  
Navarro, Juan José Martínez-Nicolás, Francisco Javier Alfosea-Simón,  
Inmaculada Simón y Francisco García-Sánchez**

Revista:

***Scientia Horticulturae***

DOI:

**10.1016/j.scienta.2021.110697**

Editores:

**Giuseppe Colla, WenWu Guo, Saturo Kondo, Pedro Martínez-Gómez y Bodie  
Pennisi**

ISSN:

**0304-4238**

Categoría JCR	Categoría de cuartil	Rango	Factor de impacto	Factor de impacto de los últimos 5 años
<b>Horticulture</b>	<b>Q1</b>	<b>4/37</b>	<b>3,463 (2020)</b>	<b>3,672</b>



**PHYSIOLOGICAL, NUTRITIONAL AND METABOLOMIC RESPONSES  
OF TOMATO PLANTS AFTER THE FOLIAR APPLICATION OF AMINO  
ACIDS ASPARTIC ACID, GLUTAMIC ACID AND ALANINE**

Autores:

**Marina Alfosea-Simón, Silvia Simón-Grao, Ernesto A. Zavala-González, José  
María Cámara-Zapata, Inmaculada Simón, Juan José Martínez-Nicolás,  
Vicente Lidón y Francisco García-Sánchez**

Revista:

***Frontiers in Plant Science***

DOI:

**10.3389/fpls.2020.581234**

Editores:

**Sakiko Okumoto**

ISSN:

**0304-4238**

Categoría JCR	Categoría de cuartil	Rango	Factor de impacto	Factor de impacto de los últimos 5 años
<b>Plant Science</b>	<b>Q1</b>	<b>17/235</b>	<b>5,754 (2020)</b>	<b>6,612</b>

**APPLICATION OF BIOSTIMULANTS CONTAINING AMINO ACIDS  
TO TOMATOES COULD FAVOR SUSTAINABLE CULTIVATION:  
IMPLICATIONS FOR TYROSINE, LYSINE, AND METHIONINE**

Autores:

**Marina Alfosea-Simón, Silvia Simón-Grao, Ernesto A. Zavala-González, José María Cámara-Zapata, Inmaculada Simón, Juan José Martínez-Nicolás, Vicente Lidón, Wilbert M. Rodríguez-Ortega y Francisco García-Sánchez**

Revista:

***Sustainability***

DOI:

**10.3390/su12229729**

Editor:

**Antonio Ruiz-Canales y Manuel Ferrández-Villena**

ISSN:

**2071-1050**

Categoría JCR	Categoría de cuartil	Rango	Factor de impacto	Factor de impacto de los últimos 5 años
<b>Enviromental Science</b>	<b>Q2</b>	<b>124/274</b>	<b>3,251(2020)</b>	<b>3,473</b>

**EFFECT OF FOLIAR APPLICATION OF AMINO ACIDS ON THE  
SALINITY TOLERANCE OF TOMATO PLANTS CULTIVATED UNDER  
HYDROPONIC SYSTEM**

Autores:

**Marina Alfosea-Simón, Ernesto A. Zavala-González, José María Cámara-Zapata, Juan José Martínez-Nicolás, Inmaculada Simón, Silvia Simón-Grao y Francisco García-Sánchez**

Revista:

***Scientia Horticulturae***

DOI:

**10.1016/j.scienta.2020.109509**

Editores:

**Giuseppe Colla, WenWu Guo, Saturo Kondo, Pedro Martínez-Gómez y Bodie Pennisi**

ISSN:

**0304-4238**

Categoría JCR	Categoría de cuartil	Rango	Factor de impacto	Factor de impacto de los últimos 5 años
<b>Horticulture</b>	<b>Q1</b>	<b>4/37</b>	<b>3,463 (2020)</b>	<b>3,672</b>



Esta Tesis Doctoral ha sido dirigida por el **D. Francisco García Sánchez**, Dr. en Ciencias Químicas y Científico Titular del Departamento de Nutrición Vegetal del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, y codirigida por **Dña. Inmaculada Simón Vilella**, Dra. por la Universidad Miguel Hernández y Profesora Titular de Universidad adscrita del Departamento de Física Aplicada de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

**CERTIFICAN:**

Que la Tesis Doctoral Titulada **“Respuestas fisiológicas y metabólicas a la aplicación foliar de aminoácidos en plantas de tomate”**, de la que es autora la graduada en Ingeniería Agroalimentaria y Agroambiental, Dña. Marina Alfosea Simón, ha sido realizada bajo nuestra dirección y autorizamos a que sea presentada para optar a la obtención del grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández.

Y para que conste a los efectos oportunos se firma el presente certificado en Orihuela a 21 de febrero de 2022.

**Dr. Francisco García Sánchez**

**Dra. Inmaculada Simón Vilella**

**Dra. Dña. Juana Fernández López**, Catedrática de Universidad y Coordinadora del Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias, Agroambientales y Alimentarias (ReTos-AAA) de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH),

**CERTIFICA:**

Que la Tesis Doctoral titulada **“Respuestas fisiológicas y metabólicas a la aplicación foliar de aminoácidos en plantas de tomate”** de la que es autora la graduada en Ingeniería Agroalimentaria y Agroambiental, y Máster en Ingeniería Agronómica, **Dña. Marina Alfosea Simón**, ha sido realizada bajo la dirección del **Dr. Francisco García Sánchez** y la codirección de la **Dra. Inmaculada Simón Vilella**, actuando como tutor de la misma el **Dr. Ángel Gil Izquierdo**. Considero que la Tesis es conforme, en cuanto a forma y contenido, a los requerimientos del Programa de Doctorado ReTos-AAA, siendo por tanto apta para su exposición y defensa pública.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Orihuela a 21 de febrero de 2022.

**Dra. Dña. Juana Fernández López**  
Coordinadora del Programa Doctorado ReTos-AAA



Esta tesis doctoral se ha realizado gracias a la financiación por el Programa Estatal I+D+i orientado a los Retos de la Sociedad, Ministerio de Innovación y Ciencia (Gobierno de España), proyecto RTC-2016-4568-2

## Agradecimientos

En primer lugar, manifestar mi más sincero agradecimiento a mi director de Tesis, Dr. Francisco García Sánchez, por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, así como su gran dedicación, implicación y apoyo durante todos estos años. Del mismo modo, hacer extensa mi gratitud a mi directora de Tesis, Dra. Inmaculada Simón Vilella, por introducirme desde pequeña al mundo de la investigación y por demostrarme la importancia de poner ímpetu en todo lo que se hace, gracias por aconsejarme y motivarme a dar lo mejor de mí en todo momento.

También mostrar mi gratitud a la Dra. Silvia Simón, sin ella esta Tesis no podría haber sido posible. Gracias por transmitirme esa pasión hacia la investigación, por mostrarme todo lo que sabes desinteresadamente, por esa alegría que te caracteriza, por tus consejos en cualquier momento, sin importar el día o la hora. En definitiva, gracias por tu generosidad, hacerme este camino mucho más fácil y ser más que una compañera de trabajo (amiga, confidente, compañera de risas y llantos).

Asimismo, dar las gracias al equipo EPSO-UMH (Dr. Vicente Lidón, Dr. Juan Carlos Fernández, Dr. Juan José Martínez, Dr. Javier Andreu, Dr. Manuel Nieves, Dra. Carmen Ballester, Dr. Jose María Cámara, José Joaquín García y Jose María Larrosa), por su gran disposición en todo momento, por aconsejarme y guiarme en este camino.

Agradecer, a los doctores del departamento de Nutrición Vegetal del CEBAS-CSIC, Vicente Martínez, Francisco Rubio, Rosa Rivero, Manuel Nieves, Teresa Mestre y Reyes Ródenas. Y, especialmente, a los que han formado y forman parte de nuestro pequeño grupo de investigación Ginés, Miguel, David y Valeria que han realizado un trabajo excepcional en el invernadero durante todo este tiempo. Igualmente, quiero agradecer, al personal de servicio del metabólica (Jose Enrique y Víctor) e iónica (Paco, Serafín, Mati y Carmen). Y a todos mis compañeros de laboratorio y de la finca experimental (Ulises, Juanan, María, Alberto, Jesús, Almudena, Miriam, Adrián, Olmo, Juan y Antonio). Gracias por vuestro apoyo profesional y personal.

De igual forma, dar las gracias y reconocer la colaboración del equipo de investigación de la empresa 'Atlántica Agrícola' (Ernesto, Almudena, Rafa e Iván).

A mi amiga Patri, gracias por estar siempre a mi lado, por interesarte en todo lo que hago y estar siempre orgullosa de mí. Además, agradecer a Natalia, Mari, Tania y Vero por vuestra amistad y ser las encargadas de proporcionarme los momentos de desconexión.

A mi familia, particularmente a mis abuelos por enseñarme el valor de la fortaleza, a no rendirme ante las adversidades y por supuesto, el amor hacia la naturaleza. A mis padres, por haberme forjado la persona que soy en la actualidad, muchos de mis logros han sido y son gracias a vosotros. A mis hermanos, gracias por ser tan generosos, por sacarme una sonrisa en todo momento y por aportarme solo cosas buenas a mi vida. A mi familia política, gracias por hacerme sentir como una más. No tengo palabras para expresar mi gratitud, soy lo que soy gracias a vosotros.

Por último, quiero agradecer a Jose por ser mi acompañante en este camino, apoyarme en todo momento, ser mi consejero, confiar siempre en mí y no soltar nunca mi mano. No hay palabras suficientes para expresar ese sentimiento que demuestre lo especial que eres para mí.

En definitiva, todo esto no habría sido posible sin vosotros, por lo que una vez más **GRACIAS DE CORAZÓN.**

*Friends will be friends  
When you're in need of love  
They give care and attention  
Friends will be friends  
When you're through with life  
And all hope is lost  
Hold out your hand  
'Cause friends will be friends  
Right till the end*

The Queen - Friends will be friends





Biblioteca  
UNIVERSIDAD ALFONSO X el Magnífico

**A mi familia y a Jose**

---

# ÍNDICE

<b>1. ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS</b> .....	20
1.1. Abreviaciones .....	20
1.2. Símbolos .....	22
1.3. Definiciones .....	23
<b>2. ESTRUCTURA DE LA TESIS</b> .....	26
<b>3. RESUMEN Y ABSTRACT</b> .....	30
3.1. Resumen .....	30
3.2. Abstract .....	33
<b>4. INTRODUCCIÓN</b> .....	38
4.1. El cultivo del tomate .....	38
4.1.1. Origen, taxonomía y descripción botánica .....	38
4.1.2. Importancia económica .....	40
4.1.3. Cultivo del tomate en el Sureste español .....	42
4.1.4. Valor comercial y nutricional del tomate .....	44
4.1.5. Problemas a los que enfrenta la agricultura en el Sureste español .....	44
4.2. Efectos negativos de la salinidad en los cultivos .....	45
4.3. Bioestimulantes en agricultura .....	46
4.3.1. Tipos de Bioestimulantes .....	47
4.3.2. Uso de Bioestimulantes en el mundo y perspectiva futura .....	48
4.4. Aminoácidos en las plantas y sus funciones .....	49
4.4.1. Asimilación de Nitrógeno: Glutamato, Glutamina y Ácido aspártico .....	49
4.4.2. Familia del aspártico: Lisina, Metionina, Treonina, Isoleucina y Asparagina .....	54
4.4.3. Ruta del piruvato: Alanina, Valina y Leucina .....	60
4.4.4. Familia siquimato: Tirosina, Fenilalanina y Triptófano .....	62
4.4.5. Ciclo de Calvin: Serina, Glicina y Cistefna .....	68
4.4.6. Otros aminoácidos: Arginina, Histidina y Prolina .....	73
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	84

<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	88
6.1. Primer ensayo .....	88
6.1.1. Material vegetal y condiciones de cultivo .....	88
6.1.2. Establecimiento de las diferentes fases del desarrollo de las plantas de tomate.....	90
6.1.3. Parámetros físicos de calidad de los frutos y producción final .....	91
6.1.4. Parámetros químicos de calidad de los frutos de tomate .....	92
6.1.5. Parámetros de crecimiento .....	92
6.1.6. Análisis metabolómico de las hojas de tomate .....	93
6.1.7. Determinación de la concentración de nutrientes minerales en hojas de tomate .....	94
6.1.8. Determinación del perfil hormonal en hojas de tomate .....	95
6.1.9. Análisis estadístico .....	95
6.2. Segundo ensayo y tercer ensayo .....	96
6.2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo .....	96
6.2.2. Aminoácidos empleados y preparación .....	97
6.2.3. Aplicación de los tratamientos .....	98
6.2.4. Parámetros de intercambio gaseoso.....	98
6.2.5. Parámetros de fluorescencia de clorofilas y concentración de clorofilas.....	99
6.2.6. Parámetros de crecimiento.....	100
6.2.7. Determinación de la concentración de nutrientes minerales en hojas de tomate .....	101
6.2.8. Análisis metabólico de las hojas de tomate .....	101
6.2.9. Análisis estadístico .....	101
6.3. Cuarto ensayo .....	102
6.3.1. Material vegetal y condiciones de cultivo .....	102
6.3.2. Tratamiento de salinidad .....	103
6.3.3. Preparación de los aminoácidos y aplicación de AAs y mezclas durante el periodo de estrés por salinidad .....	103
6.3.4. Parámetros de crecimiento .....	104
6.3.5. Concentración de clorofilas en hojas de tomate .....	106
6.3.6. Parámetros bioquímicos .....	107
6.3.7. Análisis mineral .....	107
6.3.8. Análisis estadístico .....	107

---

<b>7. PUBLICACIONES</b> .....	110
7.1. Publicación 01.....	110
7.2. Publicación 02 .....	124
7.3. Publicación 03.....	142
7.4. Publicación 04 .....	162
<b>8. RESUMEN DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b> .....	174
8.1. Publicación 01.....	174
8.1.1. Resumen de resultados y discusión.....	175
8.1.2. Conclusión .....	177
8.2. Publicación 02 .....	178
8.2.1. Resumen de resultados y discusión .....	178
8.2.2. Conclusión.....	181
8.3. Publicación 03 .....	182
8.3.1. Resumen de resultados y discusión .....	182
8.3.2. Conclusión .....	185
8.4. Publicación 04 .....	186
8.4.1. Resumen de resultados y discusión .....	186
8.4.2. Conclusión .....	188
<b>9. CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	192
<b>10. INVESTIGACIONES FUTURAS</b> .....	196
<b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	200

# ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

| 1



Biblioteca  
UNIVERSIDAD Miguel Hernández

# 1. ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

## 1.1. Abreviaciones

Abreviación Español	Abreviación Inglés	Significado
AAs	AAs	Aminoácidos
ABA	ABA	Ácido abscísico
AC	CA	Análisis clúster
ACP	PCA	Análisis de componentes principales
AJ	JA	Ácido jasmónico
Ala	Ala	Alanina
Arg	Arg	Arginina
AS	SA	Ácido salicílico
Asn	Asn	Asparagina
Asp	Asp	Ácido aspártico
ATP	ATP	Adenosín trifosfato
BER	BER	Podredumbre apical o Blossom end rot
CE	EC	Conductividad eléctrica
Chl	Chl	Clorofilas
CRA	RWC	Contenido relativo de agua
Cys	Cys	Cisteína
DDT	DAT	Días después del trasplante
GABA	GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
Gln	Gln	Glutamina
Glu	Glu	Ácido glutámico
Gly	Gly	Glicina
GSA	GSA	Glutamato-5-semialdehído
HB	LB	Hojas de los brotes
HD	DL	Hojas desarrolladas
HGA	HGA	4-hidroxifenilacetaldehído sintasa
His	His	Histidina
HPP	HPP	4-hidroxifenilpiruvato

Abreviación Español	Abreviación Inglés	Significado
HPPD	HPPD	Hidroxifenilpiruvato reductasa
HR	RH	Humedad relativa
IAP	IAP	Imidazol acetol-fosfato
IGP	IGP	Imidazol glicerol-fosfato
Ile	Ile	Isoleucina
IM	MI	Índice de madurez
iP	iP	Isopenteniladenina
KG	KG	Ácido $\alpha$ -cetoglutarico
Leu	Leu	Leucina
Lys	Lys	Lisina
Met	Met	Metionina
NAD <sup>+</sup>	NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP	NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PA	SH	Parte aérea
PB	BP	Productos bioestimulantes
Phe	Phe	Fenilalanina
Pro	Pro	Prolina
P5C	P5C	L-pirrolina-5-carboxílico
QAC	QAC	Compuestos de amonio cuaternario
RFA	PAR	Radiación fotosintéticamente activa
RMN	NMR	Resonancia Magnética Nuclear
Ser	Ser	Serina
SST	TSS	Sólidos solubles totales
Thr	Thr	Treonina
Trp	Trp	Triptófano
TSP	TSP	Sal sódica del ácido trimetilsililpropiónico
Tyr	Tyr	Tirosina
Tyr-AT	Tyr-AT	Tiramina hidroxicinamoiltransferasa
tZ	tZ	<i>Trans</i> -Zeatina
UEA	WUE	Uso eficaz del agua
Val	Val	Valina

## 1.2. Símbolos

Símbolo	Definición
$A_{CO_2}$	Asimilación neta de $CO_2$
$C_i/C_a$	$C_i$ : $CO_2$ subestomático. $C_a$ : $CO_2$ externo
$g_s$	Conductancia estomática
$\Phi_{PSII}$	Eficiencia fotoquímica del fotosistema II (PSII)
$F_v'/F_m'$	Eficiencia de las antenas en los centros de reacción del fotosistema II (PSII)
$qP$	Coefficiente de decaimiento fotoquímico o quenching fotoquímico





### 1.3. Definiciones

Concepto	Definición
<b>Aminoácidos cetogénicos</b>	Son aquellos que en su catabolismo generan acetil Co-A y acetoacetil Co-A
<b>Aminoácidos de cadena ramificada</b>	Son los aminoácidos isoleucina, leucina y valina. Su nombre tiene relación con la distribución espacial de la molécula (no poseen forma lineal) y son conocidos por su designación con las siglas en inglés BCAAs (Branched-Chain Amino Acids)
<b>Aminoácidos glucogénicos</b>	Son aquellos que en su catabolismo producen piruvatos
<b>Aminoácidos procedentes de la ruta del <math>\alpha</math>-cetoglutarato</b>	Estos aminoácidos son el glutamato, la glutamina, la prolina, la arginina y la histidina





Biblioteca  
UNIVERSIDAD Miguel Hernández

## 2. ESTRUCTURA DE LA TESIS

Para la elaboración de la presente Tesis Doctoral se ha seguido la metodología basada en la publicación de un compendio de artículos de investigación siguiendo la normativa vigente de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

La estructura de esta Tesis Doctoral consta de las siguientes partes:

**Resumen.** Contiene una exposición abreviada de los resultados y conclusiones más relevantes.

**Introducción.** Incluye una breve revisión bibliográfica sobre la importancia del cultivo del tomate y la problemática a la que se enfrenta la agricultura del levante español. Además, se describen los aminoácidos de las plantas y sus funciones, así como los mecanismos fisiológicos y metabólicos en los que están implicados estos compuestos.

**Objetivos.** Se describen los objetivos generales de la tesis, así como los objetivos específicos.

**Resumen de la metodología.** Se explican las condiciones experimentales de los ensayos llevados a cabo; así como las distintas determinaciones realizadas y los equipos y técnicas utilizadas para su medición.

**Publicaciones científicas.** Artículos publicados que componen la base de la tesis doctoral, se detallan a continuación:

- En la **primera publicación** (*Scientia Horticulturae*, 293, 110697), se caracterizaron las fases fenológicas de diferentes variedades de tomate a nivel agronómico, ionómico, hormonal y metabólico.
- En la **segunda publicación** (*Frontiers in Plant Science*, 11, 581234), a plantas de tomate var. 'Óptima' se les aplicaron foliarmente aminoácidos y sus mezclas, concretamente: ácido aspártico, ácido glutámico y alanina, evaluándose su comportamiento agronómico, fisiológico. bioquímico.
- En la **tercera publicación** (*Sustainability*, 12(22), 9729), a plantas de tomate var. 'Óptima' se les aplicaron foliarmente los aminoácidos tirosina, lisina y metionina y sus mezclas, evaluándose su comportamiento agronómico y fisiológico.

- En la **cuarta publicación** (*Scientia Horticulturae*, 272, 109509), las plantas de tomate var. 'Óptima' cultivadas en un sistema hidropónico y bajo condiciones de salinidad fueron tratadas con la aplicación foliar de los aminoácidos arginina, prolina, ácido glutámico, triptófano y metionina, y sus mezclas para testar sus efectos en la tolerancia de las plantas a la salinidad.

**Resumen de los resultados, discusión y conclusiones.** Análisis y resumen de los resultados y conclusiones obtenidos en cada uno de los ensayos realizados.

**Conclusiones generales.** Conclusiones globales de los estudios que forman parte de la tesis doctoral.

**Investigaciones futuras.** Posibles nuevas líneas de trabajo futuras.

**Referencias bibliográficas.** Todas las referencias utilizadas para la elaboración de esta memoria, sin tener en cuenta el apartado de Publicaciones Científicas.





Biblioteca  
UNIVERSIDAD Algora Hernández

## 3. RESUMEN Y ABSTRACT

### 3.1. Resumen

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los alimentos vegetales más consumidos a nivel mundial por sus propiedades nutricionales y antioxidantes. Su cultivo tiene una gran repercusión a nivel social y económico. En los últimos años se ha producido una disminución de la producción y la calidad de la cosecha debido a los efectos adversos del cambio climático, y a la incidencia de plagas y enfermedades. Por lo tanto, la agricultura se enfrenta al reto de tener que incrementar la producción en un ambiente de cambio climático, con el objetivo añadido de emplear técnicas sostenibles que repercutan lo menos posible en el medio ambiente. A día de hoy, se están diseñando y evaluando nuevas estrategias agronómicas como alternativa a las prácticas convencionales, como puede ser la utilización de productos bioestimulantes. Concretamente, el uso de estos productos tiene un papel fundamental en la mejora del rendimiento de los cultivos al incidir de forma beneficiosa en las plantas. Muchos de estos productos están formulados a base de aminoácidos, y, aunque no hay ninguna duda de los efectos positivos que tiene la aplicación de productos ricos en aminoácidos, se sabe muy poco sobre el papel que juegan cada uno de los aminoácidos en los procesos fisiológicos y metabólicos de las plantas. Bajo este contexto, el objetivo global de esta tesis ha consistido en conocer el papel que juegan los aminoácidos en las plantas de tomate y como se podrían aplicar estos compuestos con la finalidad de mejorar la producción y calidad del cultivo. Para ello, se han llevado a cabo cuatro experimentos independientes y cada uno de ellos corresponde con un capítulo de la tesis.

En el **primer experimento** se ensayó el comportamiento agronómico de 10 variedades de tomate para seleccionar aquellas cuatro que tuvieran las características agronómicas más diferentes entre sí. De estas diez, se eligieron 'Cherry', 'Green Zebra', 'Montserrat' y 'Tres Cantos' y se hizo un estudio iónico, metabólico y hormonal con el fin de determinar los nutrientes y metabolitos que predomina en los estados fenológicos y relacionar las características agronómicas con estos compuestos.

Por su parte, en el **segundo experimento** se evaluó en plántulas de tomate cultivadas en maceta el efecto que tiene la aplicación foliar de los aminoácidos ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), alanina (Ala) y las mezclas Asp+Glu y Asp+Glu+Ala en las respuestas fisiológicas, morfológicas y nutricionales en dichas plantas.

De igual forma, el **tercer ensayo** fue similar al segundo, con la diferencia de que este experimento se realizó para conocer los efectos de la aplicación foliar de tirosina (Tyr), lisina (Lys), metionina (Met) y su mezcla (Tyr+Lys+Met) en plántulas de tomate.

Por último, en el **cuarto experimento** consistió en estudiar la tolerancia a la salinidad de plantas de tomate cultivadas en hidropónico a las que se les aplicó foliarmente los aminoácidos metionina (Met), arginina (Arg), prolina (Pro), ácido glutámico (Glu), triptófano (Trp) y las mezclas Met+Arg, Met+Trp y Glu+Pro.

De todos estos experimentos las conclusiones más relevantes fueron las que se muestran a continuación:

- **Primer ensayo:** de las diez variedades estudiadas agrónomicamente, 'Cherry', 'Green Zebra', 'Montserrat' y 'Tres Cantos' fueron seleccionadas para un estudio iónico, metabólico y hormonal para determinar los nutrientes y metabolitos predominantes en las diferentes fases fenológicas, y relacionarlos con sus características agronómicas. Se observó que la variabilidad de los resultados podría explicarse principalmente por las diferentes fases fenológicas durante el desarrollo del cultivo, más que por la variedad. Los compuestos principales fueron N (4,71 g 100 g<sup>-1</sup> ps), K (3,86 g 100 g<sup>-1</sup> ps), P (0,53 mg g<sup>-1</sup> ps), glutamato (5,21 mg g<sup>-1</sup> ps), glutamina (2,89 mg g<sup>-1</sup> ps), aspartato (1,54 mg g<sup>-1</sup> ps), tirosina (2,36 mg g<sup>-1</sup> ps), fenilalanina (1,70 mg g<sup>-1</sup> ps), sacarosa (14,4 mg g<sup>-1</sup> ps), malato (13,2 mg g<sup>-1</sup> ps) e isopenteniladenina (iP) (2,65 ng g<sup>-1</sup> ps). Estos compuestos variaron según el estado fenológico y mediante el análisis estadístico, no se encontró ninguna correlación entre estos compuestos y las características agronómicas. Pero, se puede concluir, para cada fase fenológica que compuestos podrían formar parte de los productos bioestimulantes para suministrar a los cultivos aquellos que más necesitan.
- **Segundo ensayo:** en este experimento se concluyó que la aplicación foliar de aminoácidos puede tener un efecto beneficioso en el desarrollo vegetativo de las plantas de tomate. Concretamente, en este experimento la aplicación foliar combinada de Asp+Glu tuvo mejores resultados que cuando eran aplicados de forma individual. Por su parte, cuando la Ala era aplicada con una dosis de 15 mM resultó tóxica y esta acción no fue revertida cuando se aplicaron simultáneamente Asp+Glu+Ala. Finalmente destacar que todos los aminoácidos produjeron cambios en el perfil iónico, fisiológico y metabólico de las plantas.

- **Tercer ensayo:** en este experimento se puso de manifiesto que la aplicación foliar de Tyr, Lys y Met a una concentración de 15 mM tuvo efectos beneficiosos en las plantas de tomate, ya que se produjo un incremento del desarrollo vegetativo en relación a las plantas control. Estos tratamientos estimularon la  $A_{CO_2}$  e incrementaron el uso eficaz de los nutrientes de manera que a pesar de que durante el experimento se observó que en las plantas tratadas con aminoácidos se redujo la concentración mineral, esto no tuvo limitaciones en los procesos fisiológicos. Se concluyó que la aplicación de estos AAs pueda llegar a ser útil en el cultivo de plantas hortícolas como el tomate.
- **Cuarto ensayo:** los resultados en este experimento mostraron que la salinidad disminuyó el crecimiento de las plantas, pero aquellas tratadas con Met, Pro+Glu y Met+Trp invirtieron el efecto negativo causado por este estrés. Esto no se debió a diferencias en la concentración de  $Cl^-$  o Na acumuladas en las hojas o a cambios en el estado hídrico de las plantas, sino a una mayor acumulación de azúcares solubles totales, lo que podrían haber actuado como compuestos antioxidantes desactivando las especies reactivas de oxígeno causadas por la toxicidad de estos iones. En los resultados de este experimento también destacan el haber conocido los efectos antagónicos o sinérgicos que se dan entre los AAs, conocimiento que se debe tener en cuenta a la hora de formular productos bioestimulantes.



### 3.2. Abstract

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most consumed vegetables worldwide due to its great nutritional and antioxidant properties. Its cultivation has a great impact on a social and economic level. In recent years there has been a decrease in production and harvest quality due to the adverse effects of climate change, and the incidence of pests and diseases. Therefore, agriculture faces the challenge of having to increase production in a climate change environment, with the added objective of using sustainable techniques that have the least possible impact on the environment. At the present time, new agronomic strategies are being designed and evaluated as an alternative to conventional practices, such as the use of biostimulant products. Specifically, the use of these products plays a fundamental role in improving crop yield by having a beneficial effect on plants. Many of these products are formulated with amino acids, and although there is no doubt about the positive effects of the application of products rich in amino acids, little is known about the role that each amino acid plays in physiological and metabolic processes of plants. Under this context, the overall objective of this thesis has consisted of knowing the role played by amino acids in tomato plants and how these compounds could be applied in order to improve the production and quality of the crop. For this, four independent experiments have been carried out and each of them corresponds to a chapter of the thesis.

In the **first experiment**, the agronomic performance of 10 tomato varieties were tested in order to select those four that had the most different agronomic characteristics. Of these ten, 'Cherry', 'Green Zebra', 'Montserrat' and 'Tres Cantos' were chosen and an ionic, metabolic and hormonal study was conducted with the purpose of determining the nutrients and metabolites that predominate in the phenological states and relate the agronomic characteristics with these compounds.

For its part, in the **second experiment**, in pot-grown tomato seedlings it was evaluated the effect of foliar application of the following amino acids: aspartic acid (Asp), glutamic acid (Glu), alanine (Ala) and the mixtures Asp+Glu and Asp+Glu+Ala, in the physiological, morphological and nutritional responses in these plants.

The **third experiment** was similar to the second, with the difference that this experiment was conducted to know the effects of foliar application of tyrosine (Tyr), lysine (Lys), methionine (Met) and their mixture (Tyr+Lys+Met) in tomato seedlings.

Finally, the **fourth experiment** consisted of studying the tolerance to salinity of tomato plants grown in hydroponics with foliar application of the amino acids: methionine (Met), arginine (Arg), proline (Pro), glutamic acid (Glu), tryptophan (Trp) and the Met+Arg, Met+Trp and Glu+Pro mixtures.

Of all these experiments, the most relevant conclusions were those shown below:

- **First test:** of the ten varieties studied agronomically, 'Cherry', 'Green Zebra', 'Montserrat' and 'Tres Cantos' were selected for an ionic, metabolic and hormonal study to determine the predominant nutrients and metabolites in the different phenological phases and relate them to their agronomic characteristics. It was observed that the variability of the results could be explained mainly by the different phenological phases during the development of the crop, rather than by the variety. The main compounds were N (4.71 g 100 g<sup>-1</sup> dw), K (3.86 g 100 g<sup>-1</sup> dw), P (0.53 mg g<sup>-1</sup> dw), glutamate (5.21 mg g<sup>-1</sup> dw), glutamine (2.89 mg g<sup>-1</sup> dw), aspartate (1.54 mg g<sup>-1</sup> dw), tyrosine (2.36 mg g<sup>-1</sup> dw), phenylalanine (1.70 mg g<sup>-1</sup> dw), sucrose (14.4 mg g<sup>-1</sup> dw), malate (13.2 mg g<sup>-1</sup> dw) and isopentenyladenine (iP) (2.65 ng g<sup>-1</sup> dw). These compounds varied according to the phenological state, and, through statistical analysis, no correlation was found between these compounds and the agronomic characteristics. But, it can be concluded, for each phenological phase, which compounds could be part of the biostimulant products to supply the crops with those they need most.
- **Second test:** in this experiment it was concluded that the foliar application of amino acids can have a beneficial effect on the vegetative development of tomato plants. Specifically, in this experiment the combined foliar application of Asp+Glu had better results than when they were applied individually. On the other hand, when Ala was applied with a dose of 15 mM it was toxic and this action was not reversed when Asp+Glu+Ala were applied simultaneously. Finally, it should be noted that all amino acids produced changes in the ionic, physiological and metabolomic profile of the plants.
- **Third test:** in this experiment it was revealed that the foliar application of Tyr, Lys and Met at a concentration of 15 mM had beneficial effects on tomato plants, since there was an increase in vegetative development in relation to the control plants. These treatments stimulated A<sub>CO2</sub> and increased the effective use of nutrients so, despite the fact that during the experiment it was observed that plants treated with amino acids the mineral concentration was reduced, this did not have limitations in the physiological processes. It

was concluded that the application of these AAs could become useful in the cultivation of horticultural plants, such as tomatoes.

- **Fourth test:** the results in this experiment showed that salinity decreased the growth of the plants, but those treated with Met, Pro+Glu and Met+Trp reversed the negative effect caused by this stress. This was not due to differences in the concentration of  $\text{Cl}^-$  or Na accumulated in the leaves or to changes in the water state of the plants, but to a greater accumulation of total soluble sugars, which could have acted as antioxidant compounds deactivating the reactive species of oxygen caused by the toxicity of these ions. The results of this experiment also highlight having known the antagonistic or synergistic effects that occur between AAs, knowledge that must be taken into consideration when formulating biostimulant products.





## 4. INTRODUCCIÓN

### 4.1. El cultivo del tomate

#### 4.1.1. Origen, taxonomía y descripción botánica

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es originario de las regiones Andinas, correspondiendo actualmente a los países de Bolivia, Colombia, Chile, Ecuador y Perú (Taylor, 1986; Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995; Tapia y col., 2019). Este hecho ha sido corroborado por diversos investigadores ya que se han encontrado solamente especies silvestres en zonas no antropizadas de América del Sur. No obstante, hoy en día, se supone que la domesticación del tomate ocurrió en México, concretamente a partir de plantas de *L. esculentum* variedad *cerasiforme*. Estas son plantas silvestres que crecen como malas hierbas (Melomey y col., 2019).

Con la llegada de los españoles a América se vio que el tomate se producía en el área mesoamericana en la que existían una gran cantidad de frutos con diferentes tamaños, formas y colores. Posteriormente en el siglo XVI, el tomate fue introducido en Europa y el resto de mundo, teniendo una aceptación muy desigual, ya que en España, Italia y Portugal se integró como parte de la gastronomía; mientras que en el resto de Europa su uso fue exclusivamente ornamental (Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995; Rouphael y col., 2021). Hoy en día, el tomate es cultivado en todos los continentes consumiéndose más que ningún otro producto hortícola gracias a que es una gran fuente de vitaminas y minerales, y gracias a sus características organolépticas (Espinosa-Alonso y col., 2020; Gholami y col., 2021).

La primera descripción botánica del tomate se llevó a cabo en el año 1554 en el jardín botánico de Padua (Italia), a manos de Pier Andrea Mattioli. Actualmente, el tomate corresponde a la familia *Solanaceae* y concretamente al género *Solanum*. Este género tiene una gran importancia económica gracias a la gran variedad de especies que contiene y al uso que se les da a las plantas y al fruto ya que se destinan a la alimentación, medicamentos, uso ornamental, etc. Su familia está compuesta por más de 300 especies, las cuales se pueden encontrar en diversos hábitats (Samuels, 2015; Liao y col., 2020). La taxonomía del tomate ha experimentado variaciones a lo largo de los años y siempre ha sido objetivo de debate y controversia. La primera clasificación fue llevada a cabo por Linneo, denominándose *Solanum lycopersicum* (Linnaeus, 1753). Posteriormente, fue Miller en el año 1754 quien la reclasificó como *Lycopersicon esculentum*. Finalmente, el uso de herramientas moleculares permitió establecer como denominación botánica decisiva la planteada por Karl Linneo, volviendo

a introducirla dentro del género *Solanum* en la sección de *Lycopersicon* (Foolad, 2007; Sosa-Baldivia y col., 2018). Por lo tanto, a continuación, se detalla la taxonomía aceptada:

**Tabla 4.1.** Clasificación taxonómica de *Solanum lycopersicum* L.

Clase	<i>Dicotyledoneas</i>
Orden	<i>Solanales (Personatae)</i>
Familia	<i>Solanaceae</i>
Subfamilia	<i>Solanoideae</i>
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>Lycopersicum</i>

El tomate es una planta dicotiledónea y perenne, que según su crecimiento se pueden clasificar como i) plantas de crecimiento indeterminado, que se caracterizan por tener un crecimiento "sin límite", requieren de entutorado para su cultivo y producen tomates de forma escalonada; y, ii) plantas de crecimiento determinado, estas tienen forma arbustiva, poseen un crecimiento "limitado", no requieren entutorado y producen cosecha toda a la vez (no escalonada).

El tamaño aproximado de los tallos es de 2-4 cm de diámetro, siendo de color verde, gruesos, angulosos y están cubiertos por pelos, que pueden ser glandulares o no. El sistema radicular está compuesto por: i) raíz principal, ii) raíces secundarias y iii) raíces adventicias. Las hojas son anchas, compuestas y con borde en forma de sierra.

La inflorescencia se compone de 4 a 12 flores, y dichas flores se caracterizan por ser hermafroditas, simétricas, regulares e hipóginas. Además, las flores se distinguen por poseer 5 estambres. La corola está compuesta por pétalos amarillos, con forma de lanza y los cuales se fusionan en la base. Por su parte, los sépalos tienen un tamaño menor en comparación con los pétalos. El pistilo está compuesto por un ovario bilocular o plurilocular, de carácter delgado. Los carpelos se encuentran de forma oblicua al plano de mediano de la flor. Por último, el fruto es una baya con diferentes formas y tamaños, su color característico es el rojo, con una placenta espesa y con abundantes semillas cubiertas de una sustancia mucilaginoso. La unión con la planta la realiza a través de un pedicelo que está engrosado y es articulado, también dispone de una semilla que es discoidal-lenticular y un embrión enrollado (Chamarro, 1995; Naika y col., 2005; Knapp y Peralta, 2016).



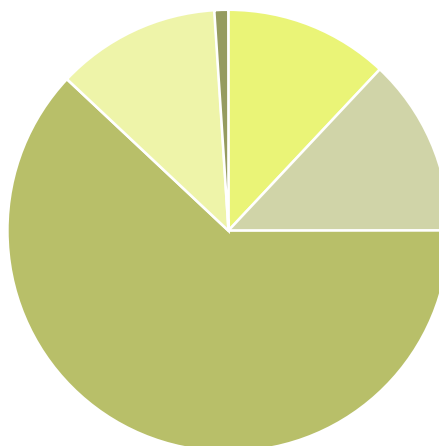
**Figura 4.1.** (A) Racimo de flores de tomate. (B) Cuajado del racimo de flores de tomate. (C) Frutos de tomate en proceso de maduración. (D) Frutos de tomate maduros.

#### 4.1.2. Importancia económica

El tomate es considerado uno de los cultivos con mayor importancia a nivel mundial, esto es debido a la gran demanda que tiene por parte de los consumidores (Tonhati y col., 2020). Su fruto despierta un alto interés en la sociedad gracias a la gran cantidad de compuestos bioactivos que contienen relacionados con la salud. Los datos de la FAO (2019) indican que la producción de tomate ha aumentado progresivamente a lo largo de los años, alcanzado en 2019 los 180 MMt (millones de Toneladas) en todo el mundo, con un rendimiento promedio de  $36 \text{ t ha}^{-1}$ , con una superficie cultivada de 5 millones de hectáreas. A nivel mundial los principales continentes productores son Asia (112 MMt), América (24 MMt) y Europa (23 MMt) (Figura 4.2). Centrándonos en Europa, en la tabla 4.2 se pueden ver que los mayores productores son Italia (23,03%) y España (21,92%). Italia es el país con mayor producción y área cosechada, mientras España es el que tiene un mayor rendimiento por superficie cultivada con  $88 \text{ t ha}^{-1}$  frente a los  $57 \text{ t ha}^{-1}$  de Italia. Esta diferencia de rendimiento, es debido a que las explotaciones españolas poseen una mayor infraestructura tecnológica, la cual se adapta de forma flexible a las necesidades de las diferentes variedades de este cultivo (Valera y col., 2015).

## Producción mundial (%)

- 12% África
- 13% América
- 62% Asia
- 12% Europa
- 1% Oceanía



**Figura 4.2.** Producción mundial de tomate dividida en continentes. Fuente: FAO. Datos: 2019.

**Tabla 4.2.** Producción (t), área cosechada (ha) y rendimiento ( $t\ ha^{-1}$ ) de los principales países europeos para el cultivo del tomate ordenados de forma creciente en función de la producción.

<b>País Europeo</b>	<b>Producción (t)</b>	<b>Área cosechada (ha)</b>	<b>Rendimiento (<math>t\ ha^{-1}</math>)</b>
Italia	5.252.690	91.410	57
España	5.000.560	56.940	88
Ucrania	2.224.440	72.900	31
Portugal	1.544.380	16.130	96
Polonia	917.800	13.500	68
Países Bajos	910.000	1.800	506
Grecia	808.670	15.010	54
Francia	709.280	5.660	125

Fuente: FAO. Datos: 2019.



### 4.1.3. Cultivo del tomate en el Sureste español

Por comunidades (CC.AA), las mayores zonas de producción de tomate en España son las siguientes en orden decreciente: Extremadura > Andalucía > Región de Murcia > Navarra > Galicia > Castilla la Mancha > Comunidad Valenciana; las dos primeras comunidades autónomas producen cada una 2 MMt, mientras que el resto de CC.AA. presentan una producción entre 76-229 mil Toneladas (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3.** Producción de tomate en España por Comunidad Autónoma en los años 2017-2018.

<b>Comunidad Autónoma</b>	<b>Producción (toneladas)</b>
<b>Andalucía</b>	2.229.975
<b>Extremadura</b>	2.075.704
<b>R. de Murcia</b>	228.780
<b>Navarra</b>	146.828
<b>Galicia</b>	95.563
<b>Castilla-La Mancha</b>	82.935
<b>C. Valenciana</b>	75.684
<b>Canarias</b>	74.098
<b>Aragón</b>	56.666
<b>Cataluña</b>	46.473
<b>La Rioja</b>	18.800
<b>Baleares</b>	10.709
<b>País Vasco</b>	6.875
<b>Madrid</b>	5.052
<b>Castilla y León</b>	4.976
<b>P. de Asturias</b>	3.543
<b>Cantabria</b>	805
<b>Total España</b>	<b>5.163.466</b>

Fuente: Anuario de Estadística Agraria. Datos: 2017- 2018.

El Sureste español (Alicante, Almería y Murcia) es una zona muy productiva para una gran cantidad de cultivos, entre ellos el tomate, destacando también por la cantidad de frutos que exportan al extranjero. Hoy en día, se cultivan una gran variedad de tomates que difieren entre sí por su color, forma, sabor, etc, en las que caben destacar las siguientes variedades de tomate: Beef, Cherry, Corazón de buey, Kumato, Larga vida, Liso, Marglobe, Moneymaker, Montserrat, Muchamiel, Óptima, Pera, Raf, Ramillete y Valenciano (Raposo y col., 2001; García-Martínez y col., 2013). Las condiciones climáticas de estas zonas permiten cultivar el tomate con alta calidad prácticamente durante todo el año. Sin embargo, debido al cambio climático que impone condiciones adversas para los cultivos con periodos de sequía cada vez más intensos y prolongados, el uso de fuentes de agua alternativa, la aparición de nuevas plagas y enfermedades, la aparición de resistencias de las plagas a muchas materias activas, etc, están poniendo en peligro la hegemonía de la producción agrícola en estas zonas.

De acuerdo con el Anuario Nacional de Estadística Agraria (2017-2018), en el cultivo de tomate Almería representa el 77% de la producción total, seguido de R. Murcia (18%) y Alicante (4%). En los sistemas de producción destacan los sistemas de cultivo protegido con un sistema de fertirrigación (Tabla 4.4). En los cultivos protegidos destacan los invernaderos y macrotúneles (estructuras de protección permanente) y los acolchados y pequeños túneles (estructuras no permanentes) (Duque-Acevedo y col., 2020). Generalmente, el agua que se utiliza para riego es el que procede del trasvase Tajo-Segura. Este es un tipo de agua de baja salinidad y con un equilibrio nutricional adecuado para los cultivos. En épocas de sequía también se utilizan aguas salinas procedentes de acuíferos y, aguas de depuradoras y desaladoras, aunque este tipo de aguas se utilizan con cierta precaución. Estas regiones también apuestan por el empleo de alta tecnología en los sistemas de regadío para aumentar la eficiencia y ahorro de agua (Hardy y col., 2012; Gil-Meseguer y col., 2019).

**Tabla 4.4.** Superficie sembrada (ha), rendimiento (kg ha<sup>-1</sup>) y producción (t) del cultivo de tomate bajo regadío en el Sureste español para el año 2017-2018.

Provincias del Sureste Español	Superficie de regadío (hectáreas)			Rendimiento de regadío (kg ha <sup>-1</sup> )		Producción (toneladas)
	Aire libre	Protegido	Total	Aire libre	Protegido	
Alicante	130	411	541	40.000	109.635	50.260
Almería	96	10.124	10.220	50.625	99.171	1.008.867
Región de Murcia	123	2.353	2.476	28.503	95.739	228.780

Fuente: Anuario de Estadística Agraria. Datos: 2017- 2018.

#### 4.1.4. Valor comercial y nutricional del tomate

El tomate es un fruto con alto valor nutricional con grandes beneficios para la salud ya que contienen compuestos bioactivos entre los que se incluyen carotenoides, licopeno, vitaminas, azúcares y compuestos fenólicos. Estos compuestos tienen una gran capacidad antioxidante actuando contra el desarrollo de enfermedades relacionadas con problemas cardiovasculares, degeneración macular retiniana y otras enfermedades de los ojos (Gholami y col., 2021). De todos esos compuestos, los mayores efectos beneficiosos son atribuidos a los carotenoides, concretamente a: i) licopeno, da el color rojo al fruto y tiene una alta actividad antioxidante; y ii) b-caroteno, tiene actividad provitamina A, representado aproximadamente el 10% del contenido total de los carotenoides (Frusciante y col., 2007; Diretto y col., 2020). Otros de los componentes importantes del tomate son los azúcares (glucosa y fructosa) y los ácidos orgánicos (cítrico y málico) que, aunque aportan poco valor nutritivo, sin embargo, tienen un papel importante en el sabor. Ambos compuestos representan un 50% y 10% de la materia seca, respectivamente (Famiani y col., 2015). El contenido en proteínas, aminoácidos, lípidos y minerales es muy bajo (menor del 1%), por lo que son considerados poco relevantes en este fruto.

#### 4.1.5. Problemas a los que se enfrenta la agricultura en el Sureste español

Según el informe “Cambio Climático: El impacto en la agricultura y los costos de adaptación” realizado por la FAO (2009) son diversos los efectos negativos que impondrá el cambio climático en la agricultura y el bienestar humano en los años venideros. Dentro de todos estos cabe destacar: i) disminución del rendimiento de los cultivos, ii) efectos negativos sobre los precios, producción y consumo, e iii) impacto en la malnutrición infantil y en el consumo de calorías. Por lo tanto, con el paso de los años será necesario disponer de estrategias agronómicas y tecnología necesaria para hacer frente al cambio climático con el fin de mantener o incrementar la producción de los cultivos con la que alimentar a la población mundial (Parry, 2019).

Debido al cambio climático, se están produciendo períodos prolongados e intensos de sequía y altas temperaturas, y alteraciones en los modelos y distribución de las precipitaciones. Todo esto propicia que los cultivos en las zonas de clima árido y semiárido sufran déficit hídrico. Para paliar esto los agricultores emplean aguas de riego de mala calidad procedentes de acuíferos, depuradoras y desaladoras que se caracterizan por sus elevados contenidos en sales, boro, y desequilibrios nutricionales. Estas aguas de mala calidad afectan de forma negativa a los procesos fisiológicos y metabólicos de las plantas,

originando una disminución de la producción y crecimiento vegetativo, y, mala calidad de la cosecha, lo que produce numerosas pérdidas económicas (Mutale-Joan y col., 2020). Debido a las nuevas problemáticas a las que se enfrenta la agricultura es necesario realizar algunas actuaciones urgentes para frenar las consecuencias del cambio climático en la agricultura y viceversa. Estas actuaciones están encaminadas a: i) modernización de los sistemas de regadío para optimizar el uso del agua mediante el uso del fertirriego, ii) uso de bioestimulantes para disminuir el uso descontrolado de fertilizantes inorgánicos de síntesis, iii) empleo de tecnologías de la comunicación para optimizar la gestión de agua y el uso de los fertilizantes lo más ecológicamente posible para que no dañen el medio ambiente (Tilman y col., 2002; Foley y col., 2011; Mutale-Joan y col., 2020).

## 4.2. Efectos negativos de la salinidad en los cultivos

La salinidad del suelo es uno de los factores ambientales de mayor importancia que afectan a la productividad y la calidad de las cosechas (Zhang et al., 2019). Se estima que el 20% de la superficie mundial donde se aplica el regadío se ve afectada por la salinidad (Kader y Lindberg, 2010), especialmente en las regiones más productivas como California, el sur de Asia y parte de la región mediterránea (FAO, 2019). Por lo tanto, la salinidad de suelos y aguas es una gran amenaza para la agricultura, debido a que la gran mayoría de los cultivos, entre ellos el tomate (*Solanum Lycopersicum* L.), se ven afectados por dicho factor ambiental. El impacto negativo de la salinidad en el crecimiento de los cultivos es debido a una combinación de múltiples influencias (Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2001; Syvertsen y García-Sánchez, 2014) entre las que se incluyen: i) el déficit hídrico debido al efecto osmótico, a causa de la alta concentración de sales que conduce a la formación de áreas con bajo potencial hídrico, dificultando la absorción de agua por parte de las raíces; ii) produce toxicidad iónica específica generalmente asociada con una absorción excesiva de iones de sodio y cloruro; iii) el exceso Na y Cl<sup>-</sup> en el suelo provoca una menor absorción de nutrientes minerales inferior o a desequilibrios nutricionales entre potasio, calcio, nitrato o fosfato (Negrão y col., 2017). A su vez, todos estos factores conducen a la alteración de diferentes procesos fisiológicos entre los que se incluyen las relaciones hídricas, tasa de asimilación neta de CO<sub>2</sub>, procesos de captación de la luz, disminución de la capacidad antioxidante, etc., que conducen a la disminución de la producción y merma de calidad comercial de la cosecha.

Las plantas para adaptarse a las condiciones de salinidad ponen en juego una serie de mecanismos fisiológicos entre los que se encuentran la síntesis de aminoácidos como la prolina; este aminoácido está involucrado en procesos de ajuste osmótico, protección de membranas celulares, desactivación de especies reactivas de oxígeno (ROS), a la vez que actúa como compuestos de reserva de nitrógeno (Dar y col., 2016).

Numerosos investigadores, centros de investigación y empresas del sector de los bioestimulantes han observado que la aplicación foliar de ciertas materias primas que contienen aminoácidos pueden potenciar los mecanismos de adaptación de las plantas a la salinidad (Sadak y col., 2015; Wani y col., 2016). En la agricultura materias primas ricas en aminoácidos han sido estudiadas y usadas en términos nutricionales desde hace mucho tiempo para la formulación de bioestimulantes (Du Jardin, 2015). Normalmente este tipo de productos se formulan a partir de la hidrólisis de proteínas de procedencia animal o vegetal. La hidrólisis ataca a los péptidos de las proteínas liberando todos los aminoácidos, sin embargo, este método puede tener algunos inconvenientes como (Colla y col., 2015) i) la destrucción de algunos aminoácidos, como es el caso del triptófano, cisteína y treonina, ii) conversión de los aminoácidos a sus formas ácidas como la asparagina y la glutamina, iii) composición y concentración de aminoácidos no deseados. Para fabricar bioestimulantes de forma eficaz habría que conocer que función desempeña cada uno de los aminoácidos en las plantas, esto permitirá hacer una formulación a la carta basada en un conocimiento previo.

### 4.3 Bioestimulantes en agricultura

La EBIC (European Biostimulant Industry Council) define los Bioestimulantes como: “productos que contienen sustancias y/o microorganismos cuya función cuando se aplica a las plantas o a la rizosfera es estimular los procesos fisiológicos de las plantas, incrementar la absorción y eficiencia de los nutrientes minerales; y esto puede producir un aumento en la producción y calidad de la fruta, así como ayudar a las plantas a tolerar los estreses abióticos”. Además, se han descrito diversos efectos que pueden tener los Bioestimulantes sobre las plantas y el suelo, los cuales son los siguientes: i) mejoran la eficiencia del metabolismo de las plantas induciendo un incremento en la producción y mejora la calidad de la fruta, ii) incrementan la producción de los cultivos entre un 5-10%, iii) aumentan la eficacia de los fertilizantes inorgánicos tradicionales entre un 5-25%, iv) inducen más resistencia durante el almacenamiento y manipulación en la post-cosecha, v) mejoran los estados fenológicos de las

plantas incluyendo la floración, cuajado, homogeneización del color de los frutos y aumento del tamaño de los mismos en algunos casos superior al 15%, vi) incrementan el beneficio económico de los agricultores, viii) mejoran la eficiencia del uso de fertilizantes reduciendo las pérdidas de nutrientes al entorno evitando contaminación medioambiental, ix) mejoran la eficiencia en el uso de agua, x) incrementan la tolerancia de las plantas a los estreses abióticos, y xi) favorecen la protección de la salud del suelo, promoviendo el desarrollo de microorganismos beneficiosos (Khan y col., 2009; Rouphael y Colla, 2020).

#### 4.3.1. Tipos de Bioestimulantes

Los productos Bioestimulantes (PB) están formados por diferentes familias químicas, entre las que se incluyen: i) ácidos húmicos y fúlvicos, ii) proteínas hidrolizadas, iii) extractos de algas, iv) quitosano y biopolímeros, v) compuestos inorgánicos, vi) hongos beneficiosos, y vii) bacterias beneficiosas (Du Jardin, 2015).

De todos estos tipos de PB, los que poseen una mayor importancia son los que están formados por aminoácidos y proteínas, que a su vez se dividen en dos categorías: i) mezcla de péptidos y AAs procedentes de proteínas hidrolizadas de origen animal o vegetal, y ii) productos preparados a base de mezclas de aminoácidos libres. En primer lugar, tenemos que la primera categoría, se prepara a partir de proteínas hidrolizadas por vía enzimática, química o térmica a partir de residuos animales o vegetales. Además, el contenido de proteínas/péptidos y aminoácidos varía en el rango de 1-85% (p/p) y 2-18% (p/p), respectivamente. Donde los aminoácidos mayoritarios son: alanina, arginina, glicina, prolina, glutamato, glutamina, valina y leucina. Mientras que los componentes no proteicos que contienen estos hidrolizados pueden contribuir a estimular el crecimiento vegetativo de las plantas, entre estos compuestos cabe destacar lo siguientes: ácidos grasos, carbohidratos, fitohormonas, macronutrientes y micronutrientes. Por otro lado, la segunda categoría se caracteriza por prepararse a partir de aminoácidos libres, entre los que se incluyen los 22 aminoácidos estructurales que están involucrados en la síntesis de proteínas además de aminoácidos no proteicos, los cuales son numerosos en algunos grupos de plantas. Asimismo, son numerosas las evidencias que indican que la aplicación exógena de aminoácidos (tanto estructurales como no proteicos) pueden llegar a proporcionar a las plantas protección contra los estreses medioambientales mediante la activación de diferentes procesos metabólicos (Rouphael y Colla, 2020).

### 4.3.2. Uso de Bioestimulantes en el mundo y perspectiva futura

El mercado mundial de PB se encuentra en constante crecimiento, en el año 2019 se valoró en 2240 millones de Euros y se proyecta que en el año 2027 se hayan alcanzado los 3440 millones de Euros. Actualmente, el principal productor de PB es Europa, seguido de América del Norte, Asia y América del Sur. Si nos centramos en Europa, cabe destacar que es el continente donde más se fabrican estos productos (Francia, Italia y España son los principales productores). Además, en los últimos años el incremento del uso de PB, ha supuesto un aumento de la producción de los cultivos (4 millones de toneladas) y una reducción de la huella de carbono (0,8 millones de toneladas de CO<sub>2</sub>).

Estos datos muestran la necesidad de promover la agricultura sostenible, combinando los recursos disponibles con nuevos productos y estrategias de cultivo para obtener una mayor productividad de forma sostenible (Yakhin y col., 2017). En base a todo esto, en el año 2019 la normativa europea aprobó el Reglamento (UE) n° 2019/1009, donde se incluyó la definición de "Bioestimulante de plantas", siendo la primera vez que se define este término de forma oficial. Esto supuso un cambio para el sector agrícola, ya que los agricultores, fabricantes y distribuidores, obtuvieron de forma definida el marco de actuación, proporcionándoles una libre circulación de los PB por todo el territorio.

No obstante, la industria de los Bioestimulantes se encuentra en constante cambio, con nuevos retos y desafíos. Uno de ellos, es conocer los efectos que tienen la aplicación de cada uno de los aminoácidos en los cultivos y como dependen del tipo de cultivo, dosis empleada, clima, modo y momento de aplicación. Por lo tanto, para formular Bioestimulantes que sean más específicos y eficientes, el primer paso es conocer el papel que tienen los aminoácidos en los procesos fisiológicos y metabólicos de los cultivos, e identificar los efectos antagónicos, neutros o sinérgicos que se dan entre ellos cuando se aplican en mezclas (Colla y col, 2015; Parađiković y col., 2019). Para ello, hoy en día, se disponen de nuevos avances en las ciencias ómicas (especialmente en la metabolómica), los cuales son fundamentales para acelerar la adquisición de nuevo conocimiento del modo de acción de los compuestos bioactivos y optimizar su uso. Todos estos avances permitirán en un futuro próximo, que científicos, industrias privadas, legisladores y partes interesadas, lleguen a desarrollar una segunda generación de estos productos formulados a la carta entendiendo a las diferentes variables del cultivo (Rouphael y Colla, 2020).

## 4.4. Aminoácidos en las plantas y sus funciones

Los aminoácidos tienen un papel fundamental en los procesos metabólicos y fisiológicos de las plantas, es por ello, que las empresas de bioestimulantes los utilizan en sus formulaciones. A continuación, se describe brevemente para cada uno de los aminoácidos cuáles son sus rutas bioquímicas anabólicas y catabólicas, las funciones que tienen en el metabolismo y sus efectos cuando se aplican en los cultivos.

### 4.4.1. Asimilación de Nitrógeno: Glutamato, Glutamina y Ácido aspártico

Estos aminoácidos intervienen en la asimilación de nitrógeno en las plantas en reacciones en las que tiene lugar el origen de la síntesis prácticamente del resto de aminoácidos. En estas reacciones intervienen el glutamato, glutamina, y, ácido aspártico.

#### ***Glutamato (Glu)***

El glutamato, conocido como ácido  $\alpha$ -aminoglutarico, ocupa una disposición central en el metabolismo y síntesis de los AAs en las plantas.

**Anabolismo:** se forma a partir de la glutamina y el 2-oxoglutarato, y la actuación de la enzima glutamato sintasa.

**Catabolismo:** el glutamato es el sustrato junto al amonio de la síntesis de glutamina a partir de amoníaco, reacción catalizada por glutamina sintetasa, que es la base de la asimilación del nitrógeno en las plantas. El grupo amino del Glu también puede transferirse a otros aminoácidos por medio de una amplia gama de enzimas aminotransferasas multiespecíficas. Además, tanto el esqueleto carbonatado como el grupo amino del glutamato son el sustento para la síntesis del ácido  $\gamma$ -aminobutírico, arginina y prolina. También se puede dar la reacción reversible en la que el glutamato puede ser desaminado por el glutamato deshidrogenasa para formar amoníaco y 2-oxoglutarato, molécula que interviene en las reacciones de respiración.

**Funciones:** se cree que el glutamato puede tener funciones de señalización en las plantas formando parte de la homeostasis de N que le permite a las plantas monitorear y adaptarse a cambios del estado de nitrógeno que suceden en sus tejidos y en el suelo (Forde y Lea, 2007; Ramakrishna y Atanu, 2020).



**Aplicación:** Se ha visto que la aplicación exógena de este aminoácido modula una gran cantidad de procesos en las plantas que determinan la morfología y arquitectura de la raíz e induce resistencias a salinidad, calor, inundación, sequía, y frío. Algunos ejemplos de la aplicación de este aminoácido en los cultivos pueden ser:

- En *Arabidopsis*, Walch-Liu y col. (2006) observaron que la aplicación foliar de glutamato (50  $\mu\text{M}$ ) afectó positivamente el crecimiento y varios procesos de desarrollo de las plantas.
- Sadak y col. (2015) observaron que la aplicación foliar de Glu (7,24-9,12%) vía foliar en plantas de haba disminuyó los efectos nocivos de salinidad y mejoró el crecimiento.
- En cultivo de soja, la aplicación foliar de Glu en plantas o semillas mejoró la capacidad antioxidante al activar a las enzimas catalasa, peroxidasa, superóxido dismutasa, polifenol oxidasa y fenilalanina amoniaco liasa (Teixeira y col., 2017) mejora del metabolismo y la productividad del nitrógeno (Teixeira y col., 2018). Los tratamientos aplicados en estos ensayos fueron: i) vía foliar ( $\mu\text{M}$ ): Glu (4,2), Cys (5,15), Phe (0,94), Gly (6,18), Glu+Cys+Phe+Gly (4,20+5,15+0,94+6,18), y ii) vía radicular ( $\text{mg kg}^{-1}$ ): Cys (12), Phe (12), Gly (9), Glu+Cys+Phe+Gly (12+12+3+9).
- Tratamientos de Glu exógeno indujo resistencia contra *Penicillium expansum* en frutos de pera (Jin y col., 2019).

### **Glutamina (Gln)**

La glutamina, junto con el glutamato son uno de los aminoácidos más importantes en cuanto a la asimilación de nitrógeno en las plantas.

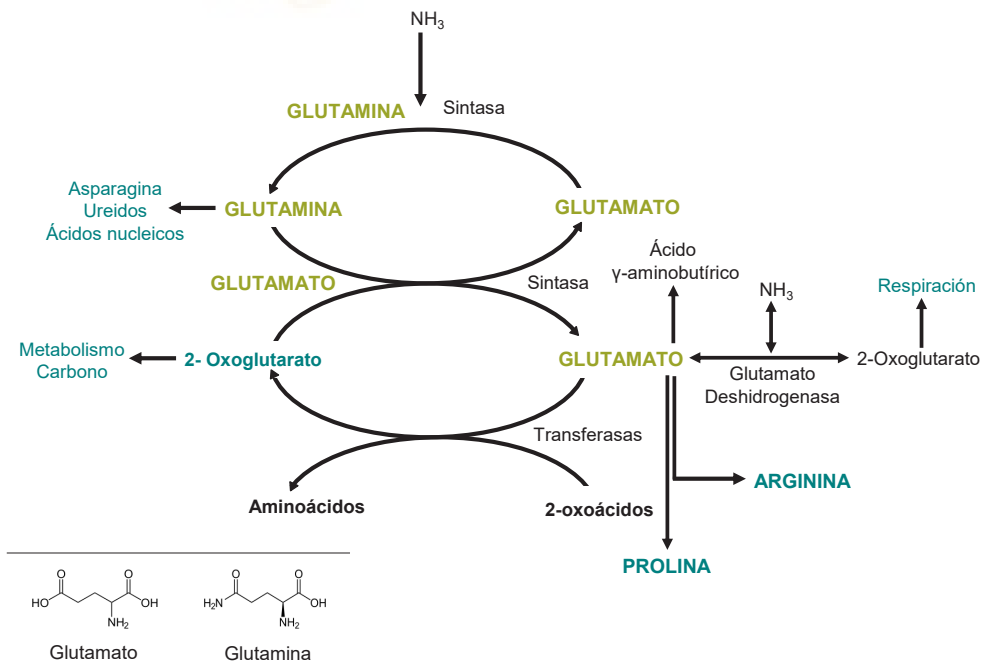
**Anabolismo:** en las plantas, el nitrógeno inorgánico se asimila al reaccionar con el glutamato dando lugar a glutamina, reacción que interviene la enzima glutamina sintetasa (GS), teniendo un papel central en la asimilación y reasimilación de amoniaco en plantas superiores.

**Catabolismo:** esta reacción es seguida por la transferencia reductora del grupo amida de la glutamina al  $\alpha$ -cetoglutarato (AKG) para producir dos moléculas de glutamatos, reacción catalizada por la enzima glutamato sintasa (GOGAT) y las dos enzimas juntas forman el ciclo GS-GOGAT (Forde y Lea, 2007; Lea y Mifflin, 2011). Por tanto, este aminoácido es clave en el metabolismo del nitrógeno en las plantas y en la formación del resto de compuestos orgánicos que contienen nitrógeno entre ellos los aminoácidos. A partir de la glutamina también se pueden formar aspargina, ureidos y ácidos nucleicos.

**Funciones:** Este aminoácido está implicado en la biosíntesis de glutatión que posee un papel clave en la desintoxicación de ciertos xenobióticos en plantas superiores (Rossini y col., 1996) ya que sirve como precursor de las fitoquelatinas, que desempeñan un papel importante en la desintoxicación de ciertos metales pesados en las plantas (Rauser, 1995) y está implicado en la inactivación de los radicales libres en plantas sometidas a estreses (Smirnoff y Pallanca, 1996).

**Aplicación:** Algunos ejemplos de la aplicación de este aminoácido en los cultivos son:

- En plantas de cebolla la aplicación foliar de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de Gln incrementó el rendimiento del cultivo y la calidad de la cosecha, al intensificar los procesos de división celular y al aumentar la concentración de clorofilas (Amin y col., 2011).
- La aplicación foliar de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de glutamina a semillas de cebolla cultivadas bajo salinidad mejoró el porcentaje de germinación, y el crecimiento radicular de las plántulas (Çavuşoğlu y col., 2020b).
- La aplicación foliar de Gln  $0,4 \text{ mM}$ , mejoró el crecimiento de los brotes de maíz. Este aminoácido indujo una mayor concentración de N. Por otro lado, el crecimiento de las raíces se redujo cuando se expuso a Gln, existiendo una mayor translocación de N desde la raíz a la parte aérea (Hassan y col., 2020).



**Figura 4.3.** Ruta de la biosíntesis del glutamato y glutamina, con su estructura química.

### ***Ácido Aspártico (Asp)***

Ácido aspártico, es el tercero de los aminoácidos que interviene en la asimilación de nitrógeno inorgánico en las plantas.

**Anabolismo:** se forma mediante la reacción del glutamato y el oxalacetato para dar aspartato y 2-oxoglutarato, reacción catalizada por la aspartato aminotransferasa.

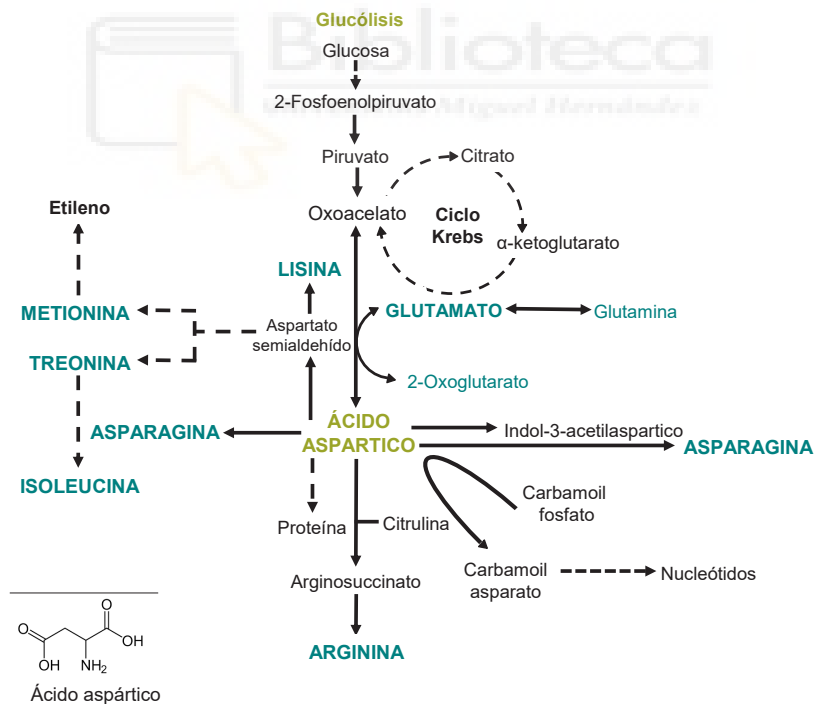
**Catabolismo:** este aminoácido es un precursor que conduce a la biosíntesis de múltiples biomoléculas necesarias para el crecimiento y la defensa de las plantas, como nucleótidos, dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD), ácidos orgánicos, aminoácidos y sus metabolitos derivados. Está bien documentado que la metionina (Met), treonina (Thr), lisina (Lys) e isoleucina (Ile), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) y Arginina (Arg) se forman a partir del aspartato y de estos 8 los cinco primeros (Met, Thr, Lys, Ile, Phe) se forman a través de una vía conocida como aminoácidos de la "familia del aspartato".

**Funciones:** Los aminoácidos Asp y Glu, junto con Asn y Gln, son los que regulan el nitrógeno en las plantas, teniendo un papel principal en el reciclaje, almacenamiento y transporte de nitrógeno en semillas, órganos vegetativos y órganos de senescencia. Se ha visto que el Asp tiene las siguientes funciones: i) limitación metabólica endógena para la proliferación celular, ii) coordina la asimilación de nitrógeno en aminoácidos, iii) es un metabolito sensible al estrés por sequía, iv) los niveles de Asp está estrechamente relacionados con la aclimatación al estrés, v) actúa como un biomarcador de estrés biótico y exposición inducida por el medio ambiente, y vi) tiene funciones de señalización y está asociado con las fitohormonas (Han y col., 2021).

**Aplicación:** En la literatura científica se pueden encontrar numerosos ejemplos en los que la aplicación foliar de este aminoácido puede ayudar a las plantas a soportar números estreses abióticos:

- Aplicaciones foliares de 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido aspártico mejoró el comportamiento de plantas de tomate a la salinidad al intensificar la capacidad antioxidante de las plantas así como la absorción de agua (Akladios y Abbas, 2013).
- Aplicaciones foliares de 50-150 mg L<sup>-1</sup> de ácido aspártico mejoró el rendimiento agronómico y la calidad de las cosechas de plantas de habas (Amin y col., 2014). Los autores señalan que esto podría haber sido debido a que este aminoácido facilita el transporte de los carbohidratos de los órganos fuente a los órganos sumidero, participa en la síntesis de auxinas, citoquininas y clorofilas, y estimula la división celular.

- Aplicación foliar de 10 a 20 mg L<sup>-1</sup> de este aminoácido aumentó la tolerancia a la toxicidad por Cd en plantas de arroz (Rizwan y col., 2017a), gracias principalmente a que estas aplicaciones redujeron la concentración de Cd en las hojas. Aunque los mecanismos por lo que pasa esto aún no han sido revelados (efecto de dilución y/o limitación de la absorción de Cd en las raíces al acomplejarse con compuestos fenólicos cuya síntesis es inducido por este aminoácido).
- Aplicaciones foliares de 50 mg L<sup>-1</sup> de ácido aspártico palió los efectos negativos de la salinidad en plantas de cebolla al incrementar el porcentaje de germinación de las semillas, el crecimiento de las plántulas y el índice mitótico (Çavuşoğlu y col., 2020a). Los autores sugieren que para entender los mecanismos que hacen posible este efecto será necesario estudiar cómo afecta este aminoácido a la división y ciclo celular, y los mecanismos moleculares implicados en la germinación.



**Figura 4.4.** Ruta de la biosíntesis del ácido aspártico y su estructura química.

#### 4.4.2. Familia del aspártico: Lisina, Metionina, Treonina, Isoleucina y Asparagina

##### ***Lisina (Lys)***

Este aminoácido ha sido estudiado más por su importancia nutricional en la dieta humana que por su función en las plantas.

**Anabolismo:** se forma a partir del ácido aspártico por la acción de las enzimas aspartato quinasa (AK) y dihidrodipicolinato sintasa (DHDPS). La primera está controlada por retroalimentación inhibida por lisina y treonina, mientras que la segunda es inhibida solo por la lisina.

**Catabolismo:** la lisina se transloca en cantidades apreciables (5% del total de los aminoácidos translocados) de los tejidos vegetativos al reproductor. Hasta la fecha, se han establecido tres rutas para el catabolismo de la lisina en plantas: i) la vía de la cadaverina que es un alcaloide cuyo primer paso de su síntesis interviene la enzima lisina descarboxilasa, ii) vía sacaróide, SACPATH, en el que la lisina se convierte en  $\alpha$ -aminoadipato y glutation iii) vía NHP en la que se convierte en N-hidroxipípecolato.

**Funciones:** Parece ser que las plantas cultivadas bajo estrés ambiental intensifican el catabolismo de la ruta de la vía sacaróide ya que el compuesto  $\alpha$ -aminoadipic semialdehído podría aliviar el estrés hiperosmótico al producir solutos compatibles. Esta ruta también está relacionada con los procesos de senescencia en respuesta a los estreses abióticos y bióticos (Arruda y Barreto, 2020).

**Aplicación:** aplicaciones foliares de lisina han tenido efectos beneficiosos en plantas afectadas por diferentes estreses:

- Rizwan y col., (2017b) observaron que la aplicación foliar de 60 mg L<sup>-1</sup> de lisina acomplejada con Zn en plantas de trigo redujo los efectos adversos del estrés por metales pesados, específicamente en la toxicidad de Cd. Para este mismo estrés las plantas de colza también aumentaron su tolerancia cuando se les aplicó foliarmente la lisina (5 mM) acomplejada con Fe (Zaheer y col., 2020). Todos los resultados apuntan a que la toxicidad del Cr es reducida en las plantas con aplicaciones de Lys acomplejada con Fe y Zn ya que forman complejos con el Cr que inactivan su reactividad, estimulan la absorción de nutrientes minerales y reducen el estrés oxidativo. En este sentido hay muchas referencias bibliográficas en las que se informa de que la aplicación de este aminoácido acomplejado con Fe y Zn ayudan a las plantas a tolerar la toxicidad de los metales pesados (Hussain y col., 2018) en plantas de arroz con Zn-Lys 10-30 mg L<sup>-1</sup>; Ahmad y col. (2020) en plantas

de maíz con Zn-Lys a 15-25 mM; Rizwan y col. (2017b) en trigo con Zn-Lys 10-30 mg L<sup>-1</sup>.

- El tratamiento foliar con lisina a una concentración de 0,1 mM inhibió el desarrollo de la pudrición por *Alternaria* de frutos de pera al incrementar la capacidad antioxidante (Liu y col., 2021). Sin embargo, los mecanismos que hacen que esto sea posible todavía no han sido descifrados.

### **Metionina (Met)**

**Anabolismo:** la biosíntesis de metionina en plantas tiene lugar principalmente a través de la vía metabólica del aspartato en la que intervienen diferentes metabolitos, utilizando tres rutas convergentes. En esta reacción, el S que forma parte de su estructura proviene de la cisteína, la columna vertebral de Carbono procede del aspartato y el grupo metilo lo toma del aminoácido serina.

**Catabolismo:** como otros aminoácidos, tiene otras funciones además de su importante papel en la biosíntesis de proteínas. Está involucrado en la preparación de S-adenosilmetionina. En reacciones de transmetilación dona su grupo metilo para la formación de fitohormonas tales como etileno y poliaminas (Zemanová y col., 2014). Además, la metionina es muy sensible a los procesos de oxidación, por lo que se convierte rápidamente en sulfóxido.

**Funciones:** este aminoácido tiene propiedades oxidativas por lo que se considera como antioxidante. Según Maxwell y Kieber (2010), los AAs están muy involucrados en la formación de compuestos reguladores del crecimiento; por ejemplo, metionina participa en la biosíntesis de auxinas, brasinoesteroides y citoquininas en plantas (Hansen y col., 2009).

**Aplicación:** la aplicación exógena de este aminoácido también se ha visto que es beneficiosa para los cultivos:

- Aplicaciones de concentraciones altas de metionina de 2 mM (Padgett y Leonard, 1996) en plantas de crisantemo produjo un trastorno fisiológico llamado metionosis, con el patrón típico de una relación metabolito-antimetabolito. Se piensa que en este caso, la metionina, aplicada en grandes cantidades puede funcionar como un antimetabolito que interfiere con el metabolismo normal de los aminoácidos. Los autores concluyen que los aminoácidos deben ser aplicados meticulosamente, ya que podrían reducir el porcentaje de peso seco porque provocan hinchazón de los tejidos porque se llenan de agua y provocan una reducción del peso seco.

- En maíz, la pulverización foliar de metionina a una concentración de 0,01 g L<sup>-1</sup> mejoró los parámetros fisiológicos incluyendo la tasa fotosintética y concentración de clorofilas en plantas infectadas por el virus del mosaico (Ludmerszki, 2011).
- En plantas de trigo la pulverización foliar de metionina a 0,2 mg ml<sup>-1</sup> aumentó la tolerancia a la sequía y esta respuesta fue asociada con una mejora en las relaciones hídricas planta-suelo, y en los procesos fisiológicos y bioquímicos que condujeron a un incremento en el rendimiento agronómico y calidad nutricional de la cosecha (Hammad y Ali, 2014).
- En habas, la aplicación foliar de metionina entre 0,23 y 0,3% aumentó la tolerancia a la salinidad (Sadak y col., 2015).
- En helechos, Shekari y Javanmardi (2017) observaron que la aplicación foliar de metionina, 100 mg L<sup>-1</sup> y 200 mg L<sup>-1</sup>, mejoró la absorción de N, P y K, conduciendo a un aumento del peso seco de los brotes, el área foliar y las clorofilas.
- En caupí, una concentración de 0,4 mM de metionina aplicada via foliar fue eficaz para mejorar la tolerancia al estrés hídrico al incrementar el crecimiento vegetativo, el rendimiento agronómico, y el contenido de clorofilas, carotenoides, y nutrientes minerales (Merwad y col., 2018).
- En plantas de lechuga se observó que su crecimiento mejoró con la aplicación foliar de 2 mg L<sup>-1</sup> y 0,02 mg L<sup>-1</sup> de metionina (Khan y col., 2019). La aplicación de este aminoácido supuso un aumento de la absorción de N y S en las plantas. Los autores sugieren que la metionina juega un papel importante en i) el mantenimiento de la estructura de las proteínas necesarias para la división celular, ii) la diferenciación celular y el crecimiento, iii) estimula la absorción de azufre y nitrógeno, iv) se convierten en poliaminas, y v) en hormonas (citoquinina, brasinoesteroides y auxina). Sin embargo, la alta concentración de metionina redujo el crecimiento de las plantas debido a daños en el aparato fotosintético y bloqueo de la absorción de nutrientes (aplicaciones superiores a 2,2 mg L<sup>-1</sup>).
- En ampalaya, la aplicación foliar de metionina (10 y 20 mg L<sup>-1</sup>), aumentó el peso fresco de brotes y raíces, longitud de brotes, y compuestos fenólicos, ácido ascórbico, y glicina betaína de plantas cultivadas bajo déficit hídrico (Akram y col., 2020).

## ***Treonina (Thr)***

**Anabolismo:** este aminoácido junto con la metionina, lisina e isoleucina comparten en común el que su síntesis parte del aminoácido aspártico. Las enzimas que participan en la síntesis de treonina son HSDH (homoserina deshidrogenasa) y (HK) homoserina kinasa que dan lugar a homoserina y O-Fosfoserina, respectivamente. A partir de aquí, de la O-Fosfoserina se obtiene la Treonina.

**Catabolismo:** la treonina se convierte en el aminoácido isoleucina por la acción de una única enzima la Threonina deaminasa.

**Funciones:** este aminoácido tiene una gran importancia en la dieta humana, sin embargo, en las plantas se encuentran en muy baja concentración como es el caso de los cereales, por lo que muchos estudios están enfocados en incrementar la concentración de este nutriente sobre todo a partir de ingeniería genética. En situaciones de estrés abiótico la metionina, treonina e isoleucina están muy ligadas entre sí (Joshi y col., 2010).

**Aplicación:** En la bibliografía hay pocas referencias en las que se estudie la aplicación foliar de treonina. Entre estas publicaciones las mas relevantes son:

- Aplicación foliar de 150 ppm de treonina a plantas de *Lilium longiflorum* mejoró el crecimiento de las plantas, numero de flores por planta y la composición química de algunos de sus tejidos como clorofilas a y b, carotenoides, carbohidratos y nutrientes minerales (Abdel-Said y col., 2019).
- Emam y col. (2017) observaron que aplicaciones de 25 ppm de treonina en plantas de Moringa mejoraron el crecimiento vegetativo al inducir un mayor numero de hojas por planta.



### ***Isoleucina (Ile)***

**Anabolismo:** como ya hemos comentado anteriormente, la isoleucina se forma a partir de la metionina mediante la acción de la enzima threonine deaminase (TD). Esta enzima cataliza la desaminación y deshidratación de treonina para producir 2-cetobutirato y amoníaco. Una de sus isoenzimas está predominantemente presente en los tejidos jóvenes en desarrollo de las plantas y es inhibida por isoleucina. También se ha observado una segunda isoenzima "biodegradativa" que es insensible a la isoleucina se encuentra principalmente en los tejidos envejecidos en la fase de senescencia (Azevedo y col., 2006).

**Catabolismo:** este aminoácido puede sufrir una transaminación con  $\alpha$ -cetoglutarato, el esqueleto de carbón puede ser convertido en succinil CoA, y entregado al ciclo del ácido tricarbóxico para oxidación o conversión en oxaloacetato para la glucogénesis.

**Funciones:** aunque la prolina es el aminoácido que más se hace referencia cuando se habla de estrés osmótico en las plantas, otros aminoácidos como la isoleucina también incrementan su concentración ante este tipo de estreses por lo que podría tener algún efecto para contrarrestar el efecto osmótico. Así se ha visto, un aumento relativo de isoleucina en 90 veces en hojas de plantas de *Arabidopsis* estresadas por la sequía, mientras que la prolina aumentó en 80 veces (Nambara y col., 1998). En la bibliografía consultada no hemos encontrado ninguna publicación en la que se estudie los efectos que tiene la aplicación de dicho aminoácido en los cultivos.

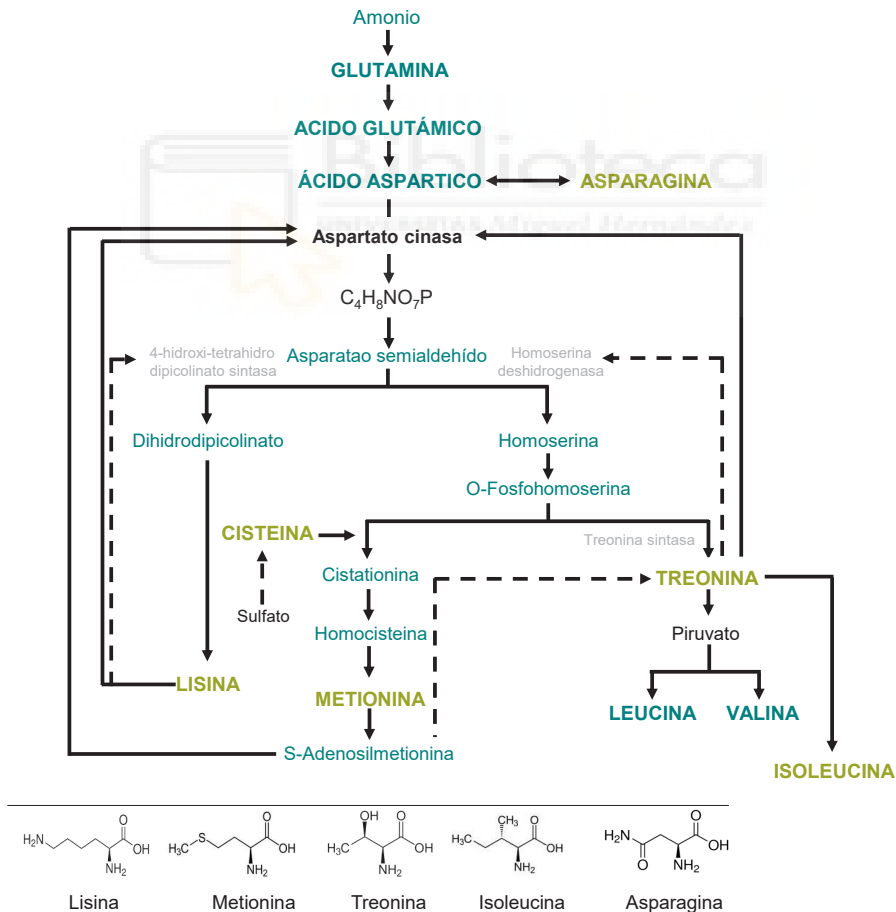
### ***Asparagina (Asn)***

La asparagina fue el primer aminoácido que se aisló de las plantas hace 200 años. Este aminoácido es muy eficiente para el almacenamiento y transporte de nitrógeno en organismos vivos.

**Anabolismo:** existen tres vías establecidas para la formación de asparagina en plantas y son las siguientes: i) producción a través de la asparagina sintetasa, dependiente del paso de amoníaco a aspartato y la presencia de Mg. ii) la asparagina se metaboliza a través del cianuro y la cisteína, convirtiéndose en ciano-l-alanina y sulfuro gracias a la cianoalanina sintasa y finalmente la cianoalanina se hidroliza para formar asparagina. No obstante, esta vía puede tener ciertas limitaciones en función de la disponibilidad de cianuro y cisteína en las células vegetales. Y, iii) otra vía de formación, aunque no muy común en plantas es a través de la transaminación de ácido 2-oxosuccinámico en una reacción inversa por asparagina.

**Catabolismo:** en la primera vía establecida el aspartato procede de la transaminación de oxaloacetato y el cual es un precursor de AAs como: lisina, treonina, metionina e isoleucina. Además, las dos primeras vías son consideradas donantes de nitrógeno, por un lado tenemos: i) grupo amida de amonio o glutamina y por otro lado ii) cianuro que se forma como subproducto de la síntesis de etileno (conversión de glioxilato e hidroxilamina en cianuro) (Gaufichon y col., 2010).

**Funciones:** la principal función de este aminoácido es el almacenamiento y transporte de N. Todo esto se debe a la implicación de la asparagina en el metabolismo del nitrógeno, por lo tanto, está involucrada en: i) germinación de semillas, ii) respuesta a estreses bióticos y abióticos y, iii) transporte desde la fuente hasta los órganos sumideros.



**Figura 4.5.** Ruta de la biosíntesis de la lisina, metionina, treonina, isoleucina y asparagina, con su estructura química.

### 4.4.3. Ruta del piruvato: Alanina, Valina y Leucina

#### ***Alanina (Ala)***

**Anabolismo:** es un aminoácido que se forma a partir del ácido glutámico. La acción de transaminación de la enzima alanina aminotransferasa (AlaAT) hace que el glutamato y piruvato formen Alanina y el 2-oxoglutarato, una reacción que es reversible y hace que este aminoácido posea una acción dual entre el metabolismo del carbono y el nitrógeno. Además, la AlaAT se caracteriza por la similitud tanto a nivel estructural como en sus características de las proteínas aminotransferasas (Kendziorek y col. 2012).

**Catabolismo:** para la degradación de la Ala interviene la enzima AlaAT, la cual es dependiente del fosfato piridoxal. Esta enzima es el nexo de unión entre el metabolismo del carbono y la biosíntesis de AAs; teniendo función de intercambio de carbono intercelular y la fotosíntesis C4 (Hildebrandt y col., 2015).

**Funciones:** este aminoácido está relacionado con la síntesis de clorofilas, la actividad fotosintética y la protección de las plantas frente a diferentes estreses abióticos (D'Mello, 2015).

**Aplicación:** diversos estudios exploran cada vez más la aplicación de este aminoácido para aplicaciones industriales y antibacterianas, donde su aplicación foliar aumenta la susceptibilidad de algunos patógenos a los antibióticos (Sidiq y col., 2021) y otro estudio realizado por Jaisi y Panichayupakaranant (2020) reveló que su aplicación foliar de 5 mM combinada con quitosano en el cultivo de *Plumbago* indica supuso una mejora de la producción.

#### ***Leucina (Leu)***

Como se ha mencionado anteriormente y al igual que ocurre con la valina e isoleucina; la leucina forma parte del grupo de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA).

**Anabolismo:** la biosíntesis de la leucina comienza con la transaminación del 2-oxoisovalerato para formar valina. Hay cuatro enzimas las que poseen un papel fundamental en la biosíntesis de leucina (isopropilmalato sintasa, isopropilmalato, isopropilmalato deshidrogenasa y cadena ramificada aminotransferasa).

**Catabolismo:** isopropilmalato isomerasa cataliza la conversión de  $\alpha$ -isopropilmalato en  $\beta$ -isopropilmalato en el segundo paso de biosíntesis de leucina (Tang y col., 2019).

**Funciones:** sirve como sustrato de la síntesis de proteínas, capacidad para iniciar vías de transducción de señales y precursor de metabolitos secundarios de las plantas (Liu y col., 2016).

**Aplicación:** No hay publicaciones en las que se aplique estos aminoácidos en los cultivos.

### ***Valina (Val)***

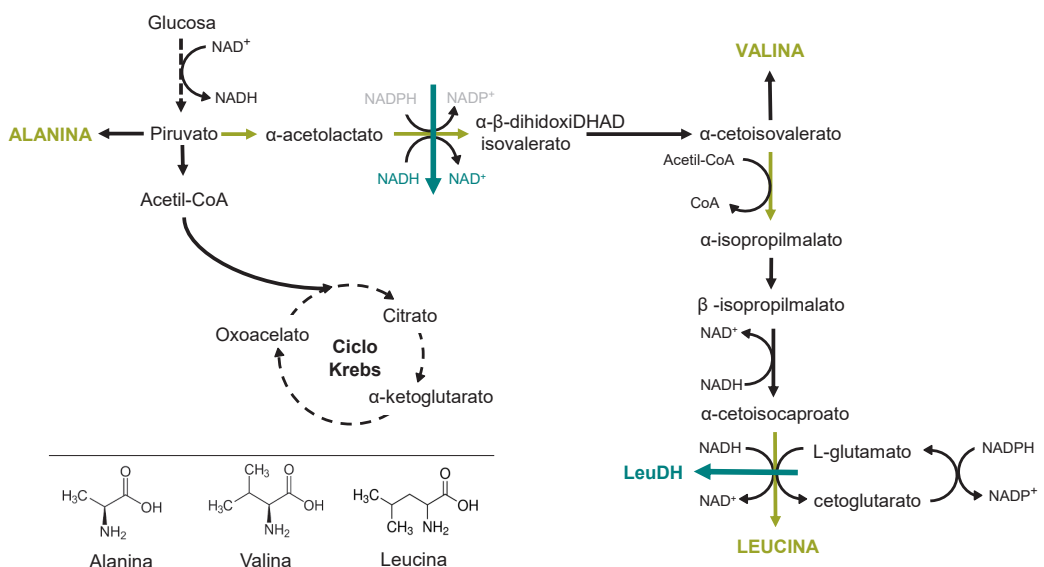
Este aminoácido es uno de los tres, junto con la Iso y Leu, denominados aminoácidos de cadena ramificada porque su estructura no es lineal.

**Anabolismo:** se forma a partir del piruvato por la acción de las enzimas AHAS acetohidroxiácido sintasa, AHRI acetohidroxiácido isómero reductasa y DHAD hidroxihidroxiácido deshidratasa.

**Catabolismo:** este aminoácido se degrada en las mitocondrias celulares de las plantas para dar ATP en reacciones de fosforilación oxidativa, principalmente en situaciones de estrés, en las que intervienen las enzimas 3-hidroxiisobutirato y adicionalmente 3-hidroxipropionato como sustrato.

**Funciones:** Este aminoácido es esencial en humanos y animales. En plantas su concentración es muy baja ya que las enzimas que intervienen en su formación se inhiben con el producto final de la reacción (Wang y col., 2018; Gao y col., 2021).

**Aplicación:** No hay publicaciones en las que se haya ensayo su aplicación en los cultivos.



**Figura 4.6.** Ruta de la biosíntesis de alanina, valina y leucina, con su estructura química.

#### 4.4.4. Familia siquimato: Tirosina, Fenilalanina y Triptófano

##### ***Tirosina (Tyr)***

La tirosina es un aminoácido aromático necesario para la síntesis de proteínas y metabolitos.

**Anabolismo:** la síntesis de la Tyr se produce a partir del corismato, este intermediario bioquímico resulta como producto final de la vía del shikimato, y es precursor de: i) los AAs aromáticos (tirosina, fenilalanina y triptófano), ii) metabolitos dependientes de los aminoácidos aromáticos, iii) hormonas (ácido salicílico y auxinas), y iv) vitaminas (K1 y B9). En base a lo anterior, el corismato pasa a prefenato a través del corismato mutasa. Por su parte, el prefenato se puede transformar de dos formas: i) convertirse en tirosina mediante transaminación y descarboxilación oxidativa, ii) convertirse en 4-hidroxifenilpiruvato (HPP) mediante una deshidrogenasa de TyrA y la transaminación por Try aminotransferasa, y iii) vía alternativa mediante la cual el prefenato se transamina en arogenato y acaba descarboxilándose a Tyr.

**Catabolismo:** en primer lugar la tirosina se transamina por Tyr-AT a HPP y posteriormente se descarboxila oxidativamente por HPPD (4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa) a HGA (ácido 2,5-dihidroxifenilacético). El siguiente paso es la producción de acetoacetato de malino a través del HGA y el cual se convierte en acetoacetato de fumarilo por medio de la isomerasa de acetoacetato de maléola. Por último, el acetoacetato de fumarilo pasa a acetoacetato y fumarato (participando en el ciclo de Krebs).

**Funciones:** las más relevantes es la función antioxidante, atracción de polinizadores, defensa y recuperación de la energía celular tras la senescencia o períodos de estrés. Además, también se caracteriza por dar sustento estructural a las plantas (debido a la lignina) y participa en el transporte de electrones (Schenck y Maeda, 2018).

- La aplicación exógena de este aminoácido también se ha visto que es beneficiosa para los cultivos:
- En un estudio llevado a cabo por Refaat y Naguib (1998), observaron como la aplicación foliar de Tyr en plantas de menta produjo un aumento del contenido total de carbohidratos.
- En plantas de remolacha la aplicación foliar de Tyr a una concentración de 100 mg L<sup>-1</sup> se incrementó el crecimiento vegetativo (El-Sherbeny y Teixeira da Silva, 2013).

- Otro estudio también llevado a cabo en plantas de remolacha se observó que la aplicación foliar de tyrosina y prolina a una dosis de 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> aumentó el rendimiento y los pigmentos de las hojas (uso en industrias para colorantes y fines medicinales) (Rashad y col., 2014).
- Al-Mohammad y Al-Taey, (2019) observaron como la aplicación foliar de tirosina (100 y 200 mg L<sup>-1</sup>) combinada con una fertilización de azufre (0,50 y 100 kg ha<sup>-1</sup>) en plantas de rúcula, supuso un incremento de la concentración de los compuestos antioxidantes.

### ***Fenilalanina (Phe)***

Al igual que la tirosina, la fenilalanina es un aminoácido aromático.

**Anabolismo:** al igual que la biosíntesis de la Tyr, la síntesis de Phe se produce a través del corismato (producto final obtenido en la vía del shikimato). El corismato pasa a pefenato a través del corismato mutasa y finalmente el pefenato se convierte en fenilalanina a través de rutas alternativas, las cuales se detallan a continuación: i) transaminación por pefenato aminotransfesa, produciendo arogenato y que es deshidratado/descarboxilado a Phe (vía argoenatos). ii) pefenato es sometido a descarboxilación y forma fenilpiruvato; los productos correspondientes son sometidos a transaminación a fenilalanina (Tohge y col., 2013).

**Catabolismo:** el catabolismo de la fenilalanina en plantas no está del todo claro, esto es debido a que actualmente no se ha hallado ningún homólogo de fenilalanina hidroxilasa en el genoma de Arabidopsis. Además, son diversos los estudios que corroboran que la Phe no se degrada fácilmente (Hildebrandt y col., 2015).

**Funciones:** casi un 30% del carbono fijado mediante la fotosíntesis es destinado para la síntesis de Phe y lignina (componente estructural). Así pues, son diversos los compuestos procedentes de la fenilalanina que tienen diversas acciones en las plantas como: i) defensa, ii) protección ultravioleta, iii) señalización, y iv) reproducción (Yoo y col., 2013).

**Aplicación:** en la bibliografía son diversas las referencias que estudian la aplicación foliar de fenilalanina, ya sea de forma individual o mediante mezcla con otros compuestos. Entre estas publicaciones las mas relevantes son:

- En plantas de colza la aplicación foliar de fenilalanina (20 mM) aumentó el contenido de polifenoles, lo que supuso una reducción de los ataques por parte de plagas de vertebrados en comparación con las plantas control (Grey y col., 1997).

- La aplicación foliar de fenilalanina ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) y ácido nicotínico ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) en plantas de geranio mejoraron de forma significativa el crecimiento vegetativo, rendimiento y la cantidad de los aceites esenciales (Mona y Talaat, 2005).
- Singh y col. (2010) y Bahadur y col. (2012), corroboraron de forma independiente que la pulverización de Phe ( $50\text{-}150 \text{ ppm}$ ) produjo un aumento de la actividad PAL y el contenido de ácido ferúlico en las hojas.
- Garde-Cerdán y col. (2014) evaluaron la influencia de la aplicación foliar de diferentes fuentes de nitrógeno en plantas de uva, mostrando que los mejores resultados se obtuvieron con la aplicación de fenilalanina a una dosis de  $750 \text{ mg de N L}^{-1}$ ; mejorando la composición del N del mosto y la calidad del vino.
- Otro estudio llevado a cabo en plantas de uva, a las cuales se les aplicó de forma foliar fenilalanina ( $150 \text{ y } 250 \text{ mg planta}^{-1}$ ) y urea ( $150 \text{ y } 250 \text{ mg N planta}^{-1}$ ); revelaron que a dosis elevadas de Phe y bajas de urea, el contenido de antocianinas y flavonoles aumenta con respecto a otros tratamientos (Portu y col., 2015).
- La aplicación foliar de Phe ( $50\text{-}100 \text{ ppm}$ ) y níquel ( $50\text{-}100 \text{ ppm}$ ) en plantas de albahaca mostró que cuando eran aplicados de forma simultánea Phe y Ni ( $100 \text{ y } 50 \text{ ppm}$  respectivamente), incrementó el crecimiento vegetativo y el contenido de aceites esenciales (Reham y col., 2016).
- Un ensayo llevado a cabo con plantas de naranjo evaluó la aplicación de diversos tratamientos de aminoácidos. De todos ellos, la aplicación foliar de fenilalanina a  $200 \text{ y } 300 \text{ ppm}$  mejoró la relación entre los ácidos solubles y la acidez de los frutos (El-Tanany y Abdallah, 2019).
- La planta medicinal de hisopo mostró una mejora de crecimiento, rendimiento, sustancias activas y pigmentos fotosintéticos cuando se aplicó de forma foliar Phe a dosis entre  $500\text{-}1000 \text{ mg L}^{-1}$ . Esta mejora se vio incrementada con el uso combinado de este aminoácido con la aplicación de estiércol, vermicompost y hongos micorrízicos arbusculares (Aghaei y col., 2019).
- Aghdam y col. (2019) observaron como la pulverización de Phe ( $5 \text{ mM}$ ) confirió tolerancia al frío en frutos de tomate.
- La pulverización de fenilalanina ( $100\text{-}200 \text{ mg L}^{-1}$ ) y ácido naftaleno acético ( $50\text{-}100 \text{ mg L}^{-1}$ ), mostraron un aumento de la actividad antioxidante, calidad y rendimiento en plantas de fenogreco (Al-Duraid y col., 2019).
- En plantas de eneldo se pulverizó  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de arginina y fenilalanina,

cuyas aplicaciones aumentaron de forma significativa los parámetros de crecimiento, rendimiento agronómico, clorofilas y diversos metabolitos primarios y secundarios (Salman y col., 2019).

- Samani y col. (2019) realizaron un experimento en plantas de salvia, a las que fue aplicada Phe de forma foliar (250 y 500 ppm) y varios biofertilizantes. Los resultados mostraron que Phe influyó en la cantidad de aceite esencial de las hojas, clorofilas, crecimiento y rendimiento. Además, esto se vio incrementado cuando la aplicación foliar era combinada con la inoculación de hongos micorrízicos.
- En plantas de uva se les aplicó Phe (53,6 mM) y metil jasmonato (10 mM), aplicados de forma foliar, tanto de forma individual como su combinación. Los terpenoides y bencenoides incrementaron con el tratamiento conjunto, reforzando el contenido de compuestos volátiles, los cuales están relacionados con la calidad del mosto y del vino (Román y col., 2020).
- Almas y col. (2021) evaluaron en plantas de tomate aplicación foliar de metionina y fenilalanina bajo estrés salino a dosis de 0,01 y 0,02% para cada uno de los AAs, respectivamente. Los resultados revelaron que la aplicación de Met y Phe aliviaron los efectos nocivos de la sanidad.

### **Triptófano (Trp)**

El Trp procede de la ruta del ácido shikímico, concretamente del corismato, siendo este último un precursor de los otros AAs aromáticos (Phe y Tyr).

**Anabolismo:** en primer lugar, el antranilato sintasa (Ans) es el encargado de la conversión del corismato en atranilato. En segundo lugar, el atranilato mediante reacciones con las enzimas fosforosilantranilato transferasa, fosforribosilantranilato isomerasa, indol-3-glicerol fosfato sintasa y triptófano sintasa hace que se produzca la conversión en Trp.

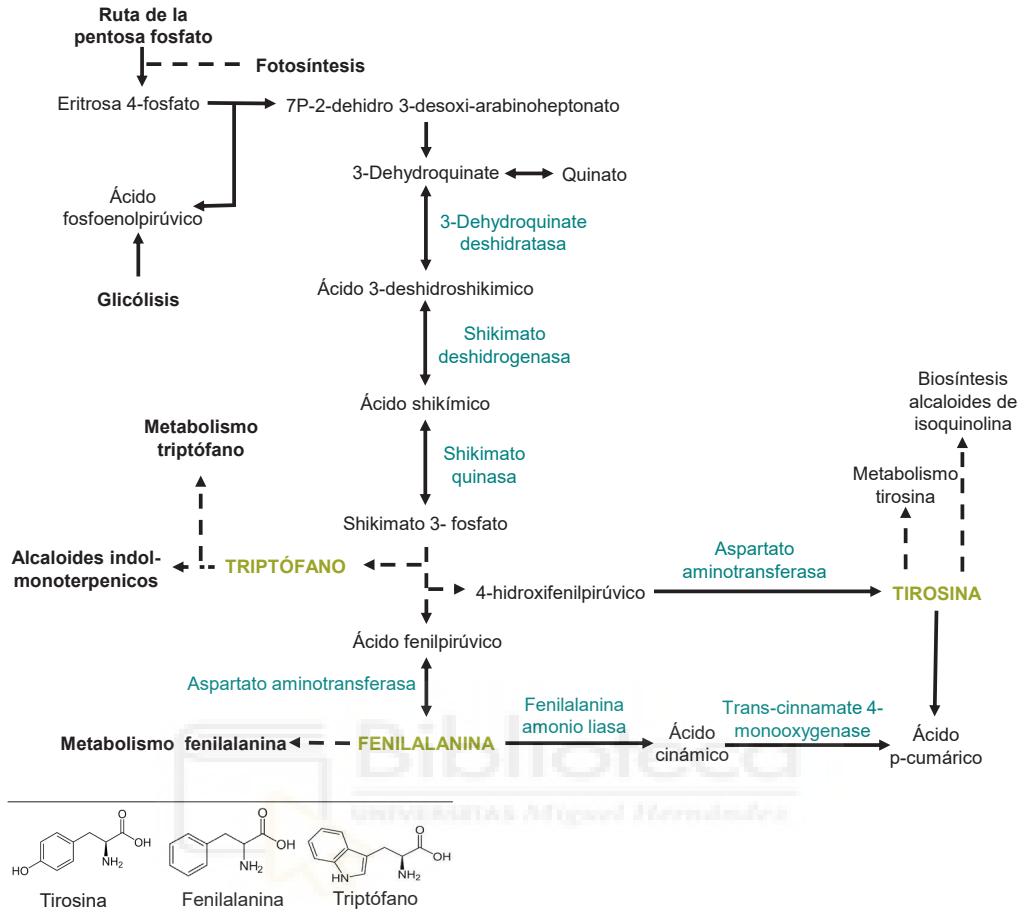
**Catabolismo:** el triptófano es el encargado de proporcionar precursores de metabolitos secundarios (auxina, fitoalexinas, glucosinolatos y alcaloides).

**Funciones:** este aminoácido se caracteriza por ser un precursor fisiológico de las auxinas, cuya concentración puede llegar a incrementar con la aplicación de Trp de forma exógena. Además, afecta de forma positiva en el crecimiento y rendimiento de las plantas, regulando la apertura de estomas, transporte de iones y desintoxicando los efectos perjudiciales causados por los metales pesados (Mustafa y col., 2016).



**Aplicación:** la aplicación exógena de este aminoácido también se ha visto que es beneficiosa para los cultivos:

- La aplicación radicular de triptófano a  $3 \text{ mg kg}^{-1}$  en un ensayo en plantas de rábano mostró que se mejora el rendimiento agronómico de las plantas (Frankenberger y col., 1990).
- En plantas de naranjo, cuando se les aplicó Zn (37,7 y 75 ppm), Trp (25, 50 y 100 ppm) e IAA (100, 200 y 300 ppm) de forma foliar, mostraron unos mayores parámetros de crecimiento, producción y calidad de la cosecha con respecto a las plantas a las que no se les aplicó nada (Ahmed y col., 2012).
- Rao y col. (2012) evaluaron la respuesta de plantas de maíz bajo estrés por sequía con la aplicación foliar de ácido salicílico (100, 150, 200 ppm) y triptófano (5, 10, 15 ppm) observando que estos productos pueden llegar a mitigar los efectos negativos producidos por dicho estrés.
- Mustafa y col. (2016) aplicaron Trp al suelo ( $20, 40$  y  $80 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y de forma foliar ( $5, 10$  y  $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) a plantas de okra (*Abelmoschus esculentus* L.), observándose que los mejores resultados se dieron en cuanto a crecimiento, rendimiento, Chl y tasa fotosintética con las aplicaciones de  $40 \text{ mg kg}^{-1}$  (suelo) y  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (foliar).
- La pulverización de peptona (500, 1000 y 1500 ppm) y triptófano (50, 100 y 150 ppm) en plantas de *Ficus microcarpa* determinó que las dosis más altas mejoraron de forma significativa los parámetros de crecimiento y los componentes químicos (Soad y Lobna, 2016).
- La pulverización, en plantas de lechuga bajo estrés por salinidad, de melatonina (100, 300 y 500  $\mu\text{M}$ ) y triptófano (125, 250 y 375 ppm) reveló que las dosis más elevadas tuvieron un mayor efecto en los parámetros de crecimiento, lo que supuso un aumento de los parámetros de tolerancia a la salinidad (Hanci y Tuncer, 2020).
- En plantas de manzano en las que se pulverizaron triptófano y glicina (tanto de forma individual como en sus mezclas), reveló que la dosis de 50 mM fue la que obtuvo mejores resultados (Mosa y col., 2021).



**Figura 4.7.** Ruta de la biosíntesis de tirosina, fenilalanina y triptófano, con su estructura química.

#### 4.4.5. Ciclo de Calvin: Serina, Glicina y Cisteína

##### ***Serina (Ser)***

La Serina, Glicina y Cisteína son tres aminoácidos que proceden del 3-fosfoglicerato, molécula que participa en la ruta del ciclo de Calvin.

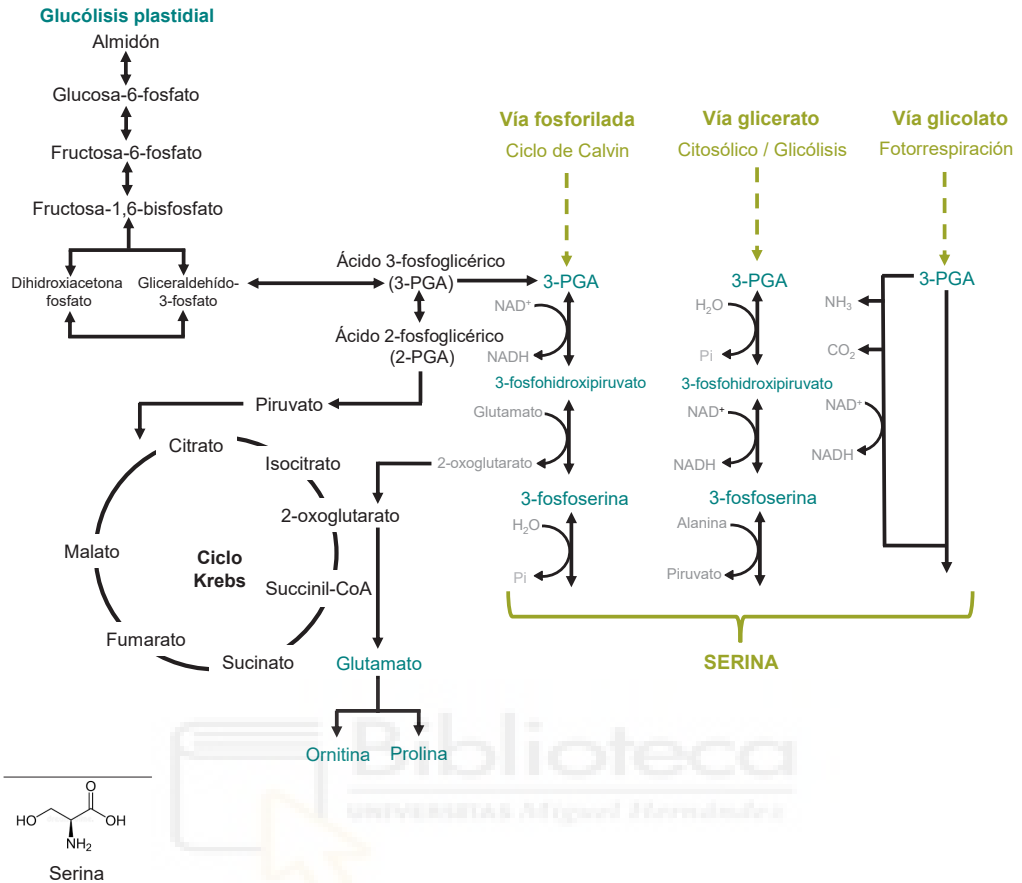
**Anabolismo:** la síntesis de Ser se produce por tres vías: i) vía glicolato, asociada a la fotorrespiración; ii) vía fosforilada procedente del ciclo de Calvin, y, iii) vía glicerato, procedente de la glucólisis citosólica. La primera de las vías, la del glicolato, es considerada la de mayor importancia y su reacción se produce en la matriz mitocondrial. Su síntesis comienza con la glicina que se descarboxila mediante la enzima glicina descarboxilasa (GDC) formando  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$ . El carbono metileno obtenido de esta reacción se transfiere a tetrahidrofolato (THF) formando metileno-THF. Este último reacciona con otra glicina y acaba formando Serina. Las otras dos vías desfosforilan el ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA) para sintetizar serina. Esta ruta está catalizada por las enzimas: 3-PGA fosfatasa, glicerato deshidrogenasa, alanina-hidroxi piruvato aminotransferasa y glicina hidroxipiruvato aminotransferasa.

**Catabolismo:** En su catabolismo se produce la escisión de la glicina que es un aminoácido indispensable para la fotorrespiración. También, existe una ruta alternativa a la degradación de la Ser a través del piruvato (actividad serina deshidratasa).

**Funciones:** El aminoácido Ser tiene un papel indispensable en el desarrollo, señalización y metabolismo de las plantas. Su deficiencia puede llegar a producir alteraciones en el desarrollo vegetativo e inhibir la embriogénesis. La Ser está involucrada en procesos de respuesta frente a estreses abióticos (Ros y col., 2014).

La **aplicación** exógena de este aminoácido no ha sido bien estudiada, pero se ha visto:

- Al-Kazzaz y col. (2009) aplicaron de forma foliar serina ( $15$  y  $30 \text{ mg L}^{-1}$ ) y arginina ( $20$  y  $40 \text{ mg L}^{-1}$ ) en alcaravea (*Carum carvi* L.), observando un aumento de los parámetros de crecimiento con respecto a los que no fueron tratadas con estos aminoácidos.



**Figura 4.8.** Ruta de la biosíntesis de la serina y su estructura química.

### ***Glicina (Gly)***

La glicina es un aminoácido que se encuentra de forma libre en el suelo, permitiendo que sea fácilmente absorbible por las plantas.

**Anabolismo:** la glicina procede directamente de la serina mediante la pérdida de un átomo de carbono que lo cede al tetrahidrofolato. La reacción es catalizada por la serina transhidroximetilasa y da lugar a glicina y metilen-tetrahidrofolato.

**Catabolismo:** la glicina, catalizada por el "Sistema de fragmentación de la glicina", reacciona con tetrahidrofolato para dar lugar a metilen-tetrahidrofolato (Hildebrandt y col., 2015).

**Funciones:** es un aminoácido modelo para la investigación del N orgánico en plantas. Participan en las respuestas de las plantas a los estreses abióticos como sequía, salinidad y bajas temperaturas. Promueve la acumulación de glucosa, sacarosa, fructosa (carbohidratos) y es un precursor de flavonoides (Yang y col., 2018).

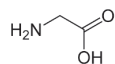
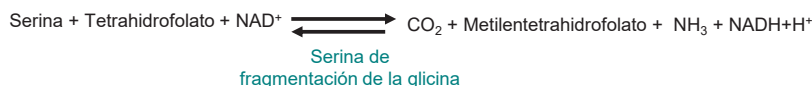
**Aplicación:** la glicina es un aminoácido muy utilizado en agricultura. En la literatura científica se pueden encontrar numerosos ejemplos de la aplicación foliar de este aminoácido para mejorar el rendimiento de los cultivos en diferentes condiciones medioambientales:

- En plantas de *Chorispora bungeana* la aplicación foliar de glicina (5-20 mM) palió de forma significativa los efectos negativos de la sequía (Yang y col., 2016).
- Tratamientos con glicina de 2,85 mmol L<sup>-1</sup> en la solución nutritiva redujeron de forma significativa los efectos causados por el estrés por frío en plantas de arroz (Xiaochuang y col., 2017).
- En plantas de lechuga cultivadas en hidropónico y cuya solución nutritiva contenía glicina (4,5-18 mM) se observó que las dosis de 9 y 18 mM produjeron un incremento del peso fresco de las plantas, así como un aumento de la actividad antioxidante (Yang y col., 2017).
- Yang y col. (2017) llevaron a cabo un estudio en plantas de lechuga cultivadas en hidropónico a las cuales se les aplicó 9 mmol L<sup>-1</sup> de Gly. Los resultados revelaron que este aminoácido puede ser una fuente de nitrógeno alternativa a la convencional, y, además, produjo una mayor acumulación de metabolitos (aminoácidos, ácido ascórbico, glicosilados y flavonoides).
- Mohammadipour y Sour (2019) evaluaron la aplicación de glicina de forma foliar y radicular (300 y 600 mg kg<sup>-1</sup>) en plantas de cilantro, obteniendo como resultado un mejor crecimiento, altura, clorofilas, sólidos solubles y vitamina C.
- Un estudio llevado a cabo en plantas de lechuga, a las cuales se les pulverizó glicina o glutamina (250-1000 mg L<sup>-1</sup>) tanto de forma individual como en mezcla, reveló que a una dosis moderada la aplicación de estos dos AAs incrementaron el crecimiento, rendimiento, clorofilas y vitamina C (Noroozlo y col., 2019).
- Un ensayo en el que se aplicó foliarmente Arg y Gly en el rango 0,006-9 mM mostró como la aplicación de dichos AAs disminuyó los efectos causados por el estrés por temperatura a las dosis de 3 y 6 mM (Matysiak y col., 2020).
- La aplicación en mezcla de Trp + Gly a 50 mM en plantas de manzano mejoró de forma significativa el crecimiento vegetativo con respecto a las plantas control (Mosa y col., 2021).

- **Degradación para síntesis de Glicina (reversible):**



- **Degradación de la Glicina (reversible):**



Glicina

**Figura 4.9.** Síntesis y degradación de la glicina y su estructura química.

### **Cisteína (Cy)**

La Cys es la primera molécula que actúa como donante de azufre en el metabolismo vegetal, de ahí su gran importancia bioquímica y fisiológica.

**Anabolismo:** la síntesis de Cys se produce a partir de la serina en los plastidios, citosol y mitocondrias por la acción de la enzima serina acetiltransferasa (SAT). Esta enzima se caracteriza por producir O-acetilserina (OAS) y O-acetilserinal(tiol)liasa (OASTL), produciendo finalmente cisteína.

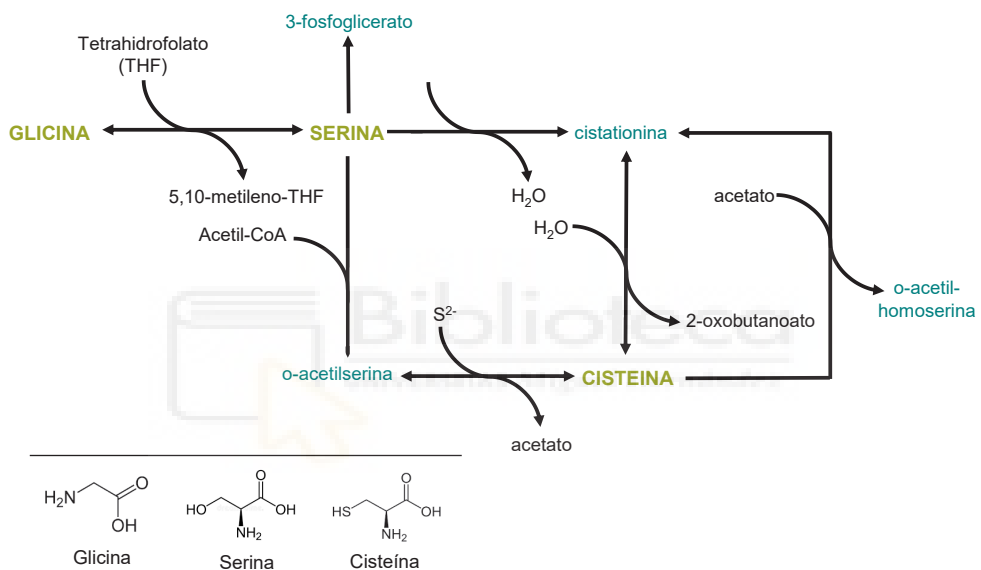
**Catabolismo:** la eliminación de los grupos amino y sulfhidrilo hace que la cisteína se convierta en piruvato.

**Funciones:** participa en numerosas reacciones enzimáticas ya que es un precursor metabólico de vitaminas, cofactores, antioxidantes y compuestos de defensa en respuesta a condiciones ambientales adversas. Este aminoácido por contener azufre posee un papel esencial en la postcosecha ya que previene el pardeamiento de frutas y verduras tras su corte (Banin Sogvar y col., 2020).

**Aplicación:** hay pocos ejemplos de la aplicación de este aminoácido en los cultivos, la mayoría de las investigaciones utilizan este aminoácido en tecnología de los alimentos para alargar la vida de los mismos y evitar su pardeamiento. Los estudios en los que se ensayan su aplicación son:

- Bajo estrés por cobalto, la aplicación exógena de Cys (0,5-2,5 mM) en semillas y durante la etapa vegetativa en plantas de albahaca mostró buenos resultados al disminuir los efectos negativos causados por este metal pesado (Azarakhsh y col., 2015).

- Pulverización de cisteína y ácido fólico en un rango de 10-30 mg L<sup>-1</sup> en plantas de haba produjo un incremento en el crecimiento vegetativo, producción y contenido de minerales y clorofilas (Jerry y Al-Jarah 2015).
- Bajo estrés salino se aplicó cisteína a 20 o 40 mg L<sup>-1</sup> en semillas de plantas de soja observándose que el tratamiento de 40 mg L<sup>-1</sup> palió los efectos negativos causados por la salinidad (Sadak y col., 2020)
- Aplicaciones foliares de cisteína a una dosis de 10 mmol L<sup>-1</sup> redujo la concentración de Cd en arroz en un cultivo regado con aguas que contenían este metal pesado (Zhang y col., 2021).



**Figura 4.10.** Ruta de la biosíntesis de glicina, serina y cisteína, con su estructura química.

#### 4.4.6. Otros aminoácidos: Arginina, Histidina y Prolina

##### ***Arginina (Arg)***

**Anabolismo:** la biosíntesis de Arg se da en dos fases: i) el glutamato se convierte en ornitina (Orn); y ii) la ornitina en arginina. En la primera fase intervienen las enzimas N-acetilglutamato sintasa (NAGS) y N-acetilglutamato-5-P reductasa (NAGPR). En la segunda fase intervienen la ornitina transcarbamoilasa (OTC) y la arginosuccinato liasa (ASL).

**Catabolismo:** la hidrólisis de la Arg se produce en las mitocondrias, produciendo urea y ornitina (por medio de la arginasa). Seguidamente, se produce una hidrólisis adicional, en la cual se produce amoníaco y carbamato. La degradación completa de la Arg da lugar al glutamato.

**Funciones:** la Arg es un aminoácido esencial para las plantas, tiene un papel fundamental en la síntesis de proteínas, está involucrado en transporte y almacenamiento de nitrógeno orgánico y, es un precursor del óxido nítrico y poliaminas (Winter y col., 2015).

**Aplicación:** la aplicación foliar de arginina ha tenido efectos beneficiosos en plantas, tal y como mostraron las siguientes publicaciones:

- Zeid (2009) mostró una mejora en la respuesta de plantas de frijol al estrés por salinidad cuando se trataron las semillas con 4 mM de Arg y 0,1 % de Urea.
- Bajo estrés por sequía, la aplicación de 2 mM de Arg como pretratamiento en semillas de girasol produjo una mejora en los parámetros de crecimiento vegetativo (Hassan y Mohamed, 2019).
- En plantas de coliflor bajo estrés por alta temperatura la aplicación de arginina (1 y 4 mM) redujo los efectos nocivos causados por dicho estrés (Collado-González y col., 2021).
- La pulverización de 1 mmol L<sup>-1</sup> de Arg en plantas de tomate mejoró de forma significativa el crecimiento, rendimiento, tamaño de la fruta, niveles de nitrógeno y actividad fotosintética (Wang y col., 2021).



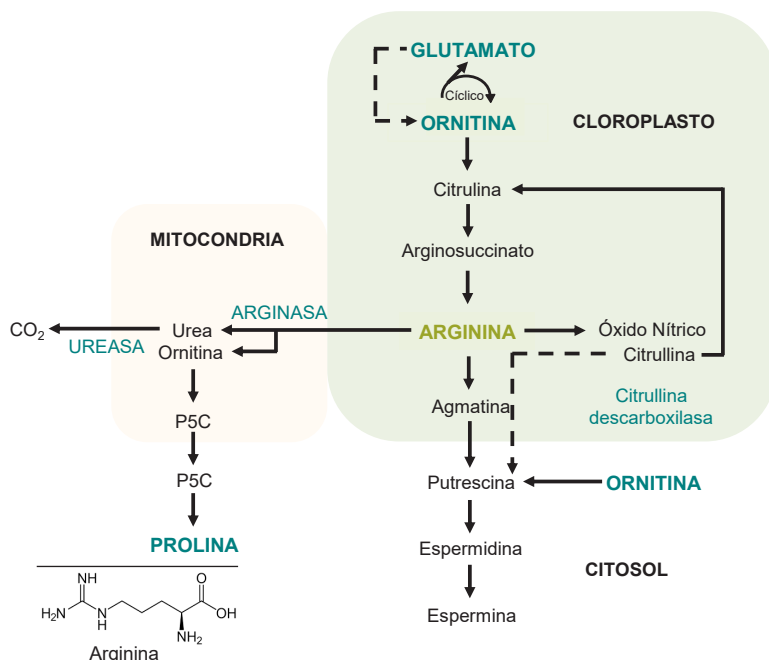


Figura 4.11. Ruta de la biosíntesis de la arginina y su estructura química.

### ***Histidina (His)***

La histidina (His) es un aminoácido proteínogénico. Después de los aminoácidos aromáticos Phe, Trp y Tyr es el cuarto con mayor dificultad de síntesis.

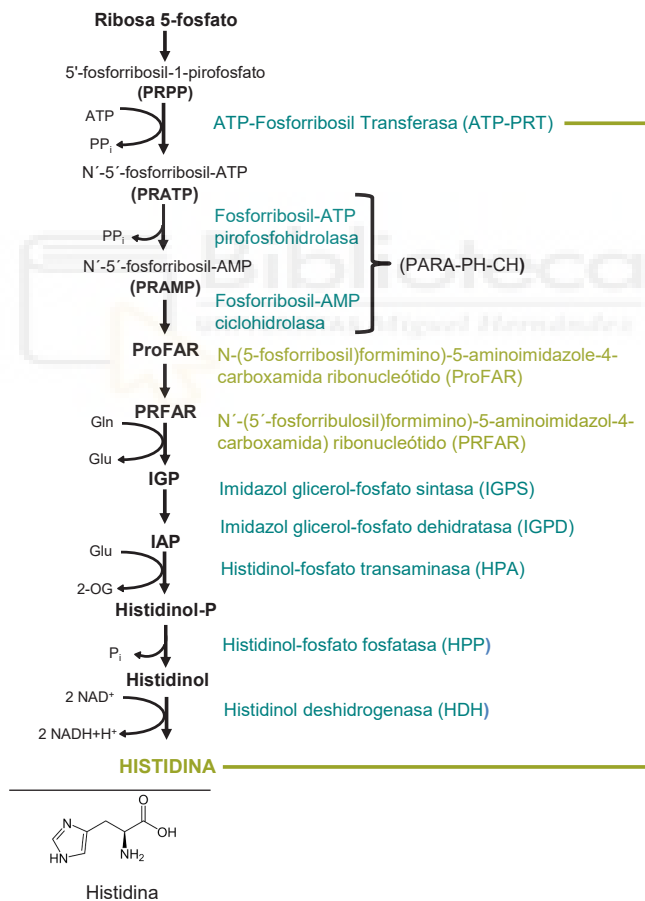
**Anabolismo:** la His se desarrolla a partir de la ribosa-5-fosfato mediante la actuación de 11 reacciones enzimáticas. Algunas de las enzimas que intervienen en estas reacciones son: fosforribosil-ATP transferasa (ATP-PRT), fosforribosil ATP pirofosfohidrolasa (PRA-PH), fosforribosil-AMP ciclohidrolasa (PRA-CH), imidazol glicerol-fosfato sintasa (IGP sintasa), imidazol glicerol-fosfato deshidratasa (IGPD), aminotransferasa imidazol acetol-fosfato (IAP), histidinol fosfato fosfatasa, entre otras.

**Catabolismo:** en la actualidad no se ha determinado de manera concreta el catabolismo de la histidina. No existe información de la regulación transcripcional de los genes de este aminoácido, así como de sus requisitos metabólicos en las plantas.

**Funciones:** es un aminoácido esencial en las plantas para su desarrollo y crecimiento. Además de participa en la catálisis ácido-base y en la complejación de iones metálicos (Stepansky y Leustek, 2006; Ingle, 2011).

**Aplicación:** En la bibliografía hay pocas referencias en las que se estudie la aplicación foliar de histidina. Entre estas publicaciones las más relevantes son:

- En tres variedades de tomate cultivados en hidropónio y bajo toxicidad por Ni se aplicaron mezclas de las siguientes combinaciones Ca (400 y 700  $\mu\text{M}$ ), His (0 y 300  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{NiSO}_4$  (0, 150 y 300  $\mu\text{M}$ ), observándose los mejores resultados con las combinaciones de Ca con 300  $\mu\text{M}$  de His ya que mejoraron los parámetros nutricionales y de crecimiento (Mozafari, 2013).
- Seo y col. (2016) evaluaron la aplicación exógena de His en el rango de 0,1-10 mM en plantas de tomate y de arabis observándose una reducción de los síntomas causados por el hongo patógeno *Ralstonia solanacearum*.
- La aplicación de histidina en semillas de arroz (10 mL L<sup>-1</sup>) suprimieron la aparición de enfermedades bacterianas (Yariyama y col., 2019).



**Figura 4.12.** Ruta de la biosíntesis de la histidina y su estructura química.

## ***Prolina (Pro)***

Este es uno de los aminoácidos más empleados en la formulación de productos bioestimulantes por las funciones que tiene en las plantas.

**Anabolismo:** la ruta responsable de la síntesis de prolina se inicia con el aminoácido glutamato. El glutamato se fosforila por la enzima  $\gamma$ -Glutamyl quinasa dando como resultado el Glutámico-  $\gamma$ -semialdehído (GSA). Este sufre una reacción de ciclación pasando de GSA a D1-pirrolina-5carboxilato (P5C) y seguidamente se produce la reducción de P5C a prolina.

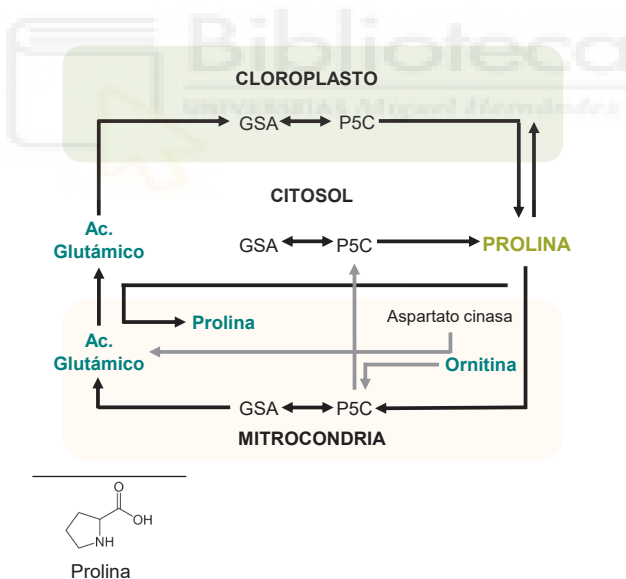
**Catabolismo:** ocurre en las mitocondrias y produce glutamato. La prolina deshidrogenasa convierte la prolina en la ornitina y esta pasa a P5C por la 1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (P5C). Finalmente, este compuesto se oxida a glutamato.

**Funciones:** actúa como componente estructural de las proteínas, acumulación en condiciones de estrés, involucrada en procesos de ajuste osmótico, protección de membranas celulares, desactivación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y actúa como compuestos de reserva de nitrógeno (Lehmann y col., 2010).

**Aplicación:** algunos ejemplos de la aplicación de este aminoácido en los cultivos incluyen:

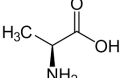
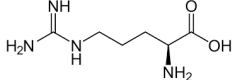
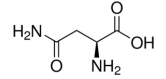
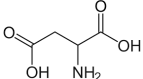
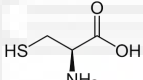
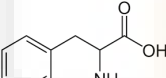
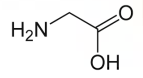
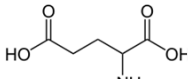
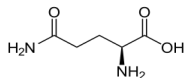
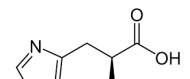
- En plantas de haba pulverizadas con prolina a 5 mM se produjo un aumento de la resistencia estomática (Rajagopal, 1981).
- En plantas de tomate sometidas a estrés salino la aplicación foliar de prolina en el rango 1-10 mM produjo una disminución de la acumulación Na y Cl<sup>-</sup> (Kahlaoui y col., 2018).
- Ali y col. (2008) en plantas de maíz aplicaron prolina foliar a una dosis de 30 mM lo que causó una reducción de los daños provocados por la sequía al aumentar la absorción de nutrientes.
- En condiciones de estrés salino las aplicaciones foliares de prolina en plantas de rábano (0,2 g L<sup>-1</sup>), olivo (25 y 50 mM), frijol (5 mM), trigo (100 mM), haba (25 y 50 mM) y arroz (25 mM), supuso una reducción de los efectos nocivos causados por dicho estrés. Concretamente, se mejoraron las actividades fotosintéticas, crecimiento, rendimiento y estrés oxidativo (Shaddad, 1990; Ben Ahmed y col., 2010; Abdelhamid y col., 2013; Aqsa y col., 2013; Dawood y col., 2014; Siddique y col., 2015).
- Kaushal y col. (2011) evaluaron en plantas de garbanzo sometidas a altas temperaturas la aplicación foliar de prolina a 10  $\mu$ M, observándose un incremento de la longitud de los brotes y las raíces, además de una disminución del daño oxidativo con respecto a las plantas que no se les aplicó prolina.

- En condiciones de salinidad y níquel, a las plantas de guisante que se les aplicó de forma foliar Pro (60 mM) mejoraron el crecimiento y el metabolismo de las poliaminas (Shahid y col., 2014).
- En plantas de avena sometidas a estrés por sequía la aplicación foliar de Pro a 40 mM mejoró el crecimiento de la raíz y el tallo con respecto a las plantas que no se les aplicó prolina (Ghafoor y col., 2019).
- Mohammadrezakhani y col. (2019) llevaron a cabo un experimento en plantas de *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis* y *Citrus paradisi*, a las cuales se les pulverizó prolina (0, 15 y 20 mM), observándose una inhibición de los efectos negativos causados por las bajas temperaturas. Esto mismo, fue corroborado por Yaqoob y col. (2019) en plantas de quinoa con la aplicación de Pro a 25 y 50 mM.
- La pulverización de prolina (3 y 6 mM) en plantas de *Cajanus cajan* L. sometidas a estrés por Cd, mostraron un aumento de la actividad enzimática, fotosintética, crecimiento y absorción de nutrientes con respecto a las no tratadas con este aminoácido (Hayat y col., 2021).



**Figura 4.13.** Ruta de la biosíntesis de la prolina y su estructura química.

**Tabla 4.5.** Clasificación de los aminoácidos en función de su abreviatura, estructura química, fórmula molecular, tipo, peso molecular, pK<sub>a</sub> α-COOH, pK<sub>a</sub> α-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, pK<sub>a</sub> R grupo\*, pl\*\* e índice de hidropatía\*\*\*.

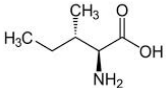
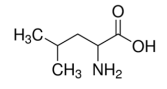
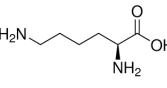
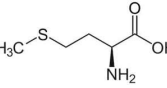
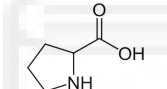
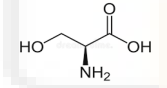
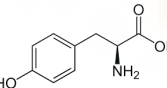
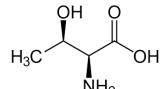
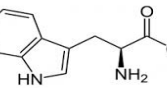
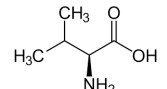
AMINOÁCIDO	ABREVIATURA	ESTRUCTURA QUÍMICA	FÓRMULA MOLECULAR	TIPO	PESO MOLECULAR (g mol <sup>-1</sup> )	pK <sub>a</sub> α-COOH	pK <sub>a</sub> α-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	pK <sub>a</sub> R grupo	pl	ÍNDICE DE HIDROPATÍA	AMINOÁCIDO	
Alanina	Ala	A		C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	Apolar – alifático	89,09	2,34	9,69	-	6,01	1,8	Alanina
Arginina	Arg	R		C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Polar – con carga positiva	174,20	2,17	9,94	-	10,76	-4,5	Arginina
Asparagina	Asn	N		C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Polar – sin carga	132,12	2,02	8,80	12,48	5,41	-3,5	Asparagina
Aspartato	Asp	D		C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	Polar – con carga negativa	133,11	1,88	9,60	3,65	2,77	-3,5	Aspartato
Cisteína	Cys	C		C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S	Polar – sin carga	121,16	1,96	10,28	8,18	5,07	2,5	Cisteína
Fenilalanina	Phe	F		C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	Apolar – aromático	165,19	1,83	9,13	-	5,48	2,8	Fenilalanina
Glicina	Gly	G		C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	Apolar – alifático	74,07	2,34	9,60	-	5,97	-0,4	Glicina
Glutamato	Glu	E		C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	Polar – con carga negativa	147,13	2,19	9,67	4,25	3,22	-3,5	Glutamato
Glutamina	Gln	Q		C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Polar – sin carga	146,14	2,17	9,13	-	5,65	-3,5	Glutamina
Histidina	His	H		C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Polar – con carga positiva	155,15	1,82	9,17	6,00	7,59	-3,2	Histidina

\*pK<sub>a</sub>: magnitud capaz de cuantificar la tendencia de las moléculas a disociarse en solución acuosa. Los aminoácidos tiene pk diferentes, siendo para el grupo de carbonilo, grupo amino y grupo funcional en la cadena lateral.

\*\*Índice de hidropatía: número que representa las propiedades hidrofílicas (armonía con el agua) o hidrofóbicas (resistencia con el agua), cuanto mayor es el número más hidrofóbico es el aminoácido y cuanto menor es el número más hidrofílico es el aminoácido.

\*\*\*Punto isoeléctrico (pl): pH donde la cantidad de carga positiva de un aminoácido es igual a la carga negativa. Es decir, es el pH en el que los aminoácidos tienen carga.

**Tabla 4.5.** Clasificación de los aminoácidos en función de su abreviatura, estructura química, fórmula molecular, tipo, peso molecular, pK<sub>a</sub> α-COOH, pK<sub>a</sub> α-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, pK<sub>a</sub> R grupo\*, pI\*\* e índice de hidropatía\*\*\*.

AMINOÁCIDO	ABREVIATURA		ESTRUCTURA QUÍMICA	FÓRMULA MOLECULAR	TIPO	PESO MOLECULAR (g mol <sup>-1</sup> )	pK <sub>a</sub> α-COOH	pK <sub>a</sub> α-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	pK <sub>a</sub> R grupo	pI	ÍNDICE DE HIDROPATÍA	AMINOÁCIDO
Isoleucina	Ile	I		C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	Apolar – alifático	131,17	2,36	9,68	-	6,02	4,5	Isoleucina
Leucina	Leu	L		C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	Apolar – alifático	131,17	2,36	9,60	-	5,98	3,8	Leucina
Lisina	Lys	K		C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Polar – con carga positiva	146,29	2,18	8,95	10,53	9,74	-3,9	Lisina
Metionina	Met	M		C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	Apolar – alifático	149,21	2,28	9,21	-	5,74	1,9	Metionina
Prolina	Pro	P		C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	Polar – sin carga	115,13	1,99	10,96	-	6,48	1,6	Prolina
Serina	Ser	S		C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	Polar – sin carga	105,09	2,21	9,15	-	5,68	-0,8	Serina
Tirosina	Tyr	Y		C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Apolar – aromático	181,19	2,20	9,11	10,07	5,66	-1,3	Tirosina
Treonina	Thr	T		C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	Polar – sin carga	119,12	2,11	9,62	-	5,87	-0,7	Treonina
Triptófano	Trp	W		C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Apolar – aromático	204,23	2,38	9,39	-	5,89	-0,9	Triptófano
Valina	Val	V		C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	Apolar – alifático	117,15	2,32	9,62	-	5,97	4,2	Valina

\*pK<sub>a</sub>: magnitud capaz de cuantificar la tendencia de las moléculas a disociarse en solución acuosa. Los aminoácidos tiene pk diferentes, siendo para el grupo de carbonilo, grupo amino y grupo funcional en la cadena lateral.

\*\*Índice de hidropatía: número que representa las propiedades hidrofílicas (armonía con el agua) o hidrofóbicas (resistencia con el agua), cuanto mayor es el número más hidrofóbico es el aminoácido y cuanto menor es el número más hidrofílico es el aminoácido.

\*\*\*Punto isoelectrico (pI): pH donde la cantidad de carga positiva de un aminoácido es igual a la carga negativa. Es decir, es el pH en el que los aminoácidos tienen carga.



## 5. OBJETIVOS

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los cultivos más importante a nivel mundial tanto por su producción como por su superficie cultivada. La agricultura es uno de los sectores que causan un gran impacto en el medio ambiente debido al uso desmesurado de fertilizantes convencionales y además, es uno de los que más lo sufren por las condiciones severas que impone el cambio climático en las plantas. Así, la falta de agua, las lluvias extremas, las altas temperaturas, y otros estreses relacionados con los ya comentados como la salinidad, toxicidad por boro, etc, producen pérdidas en la producción y calidad de la cosecha. Bajo este contexto, el cultivo de tomate no se escapa a estos problemas, por lo que muchas empresas del sector están desarrollando nuevos productos agroquímicos, denominados bioestimulantes, que permiten practicar una agricultura sostenible y respetable con el medio ambiente.

Como ya hemos dicho anteriormente, la aplicación de bioestimulantes en los cultivos contribuyen a hacer una agricultura más sostenible y de calidad, ya que reduce la aplicación de fertilizantes tradicionales con todos los aspectos positivos que esto supone: disminución de la huella de carbono y de la contaminación de nitratos en acuíferos, mares y océanos. Estos productos se caracterizan por contener sustancias y/o microorganismos que cuando se aplican a los cultivos son capaces de estimular los procesos fisiológicos e incrementar la absorción y eficiencia de los nutrientes minerales en las plantas; esto conlleva un aumento en la producción y calidad de la fruta. Europa es el continente en el que más se aplican estos productos; según los datos de la EBIC (European Biostimulants Industry Council), para el año 2022 el mercado mundial de bioestimulantes alcanzará una venta de 1.900 millones de euros y actualmente mantienen un crecimiento anual del 12.5%.

A pesar de las ventajas que ya se conocen de estos productos en agricultura, la mayoría de los bioestimulantes que se comercializan en la actualidad son hidrolizados de extractos vegetales que contienen una gran cantidad de aminoácidos, compuestos nitrogenados y otros compuestos no conocidos, en concentraciones muy diferentes.

Actualmente se sabe que las plantas pueden absorber aminoácidos y péptidos, tanto por las hojas como por las raíces y que estos aminoácidos pueden mejorar los procesos metabólicos y fisiológicos de las plantas. La aplicación de estos productos ricos en aminoácidos puede incrementar la producción de los cultivos y mejorar el crecimiento vegetativo de las plantas, regular los procesos fisiológicos y metabólicos; y ayudar a las plantas a tolerar los estreses abióticos. Sin embargo, qué aminoácidos estimulan estos procesos



y como lo hacen no se conoce todavía. El estudio de las respuestas de las plantas de forma multidisciplinar incidiendo en los aspectos fisiológicos, metabólicos, nutricionales y agronómicos, permite obtener información científica básica y de calidad para formular “a la carta” los productos bioestimulantes según la función deseada y el cultivo al que van destinados. Por lo tanto, el **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es obtener la base del conocimiento científico necesario para crear productos bioestimulantes formulados con aminoácidos y dirigidos exclusivamente a las plantas de tomate cultivadas en diferentes condiciones medioambientales, además de evaluar y validar la eficacia agronómica de las nuevas formulaciones. Para la consecución de este objetivo general nos planteamos los siguientes **objetivos específicos**:

1. Caracterizar los procesos fisiológicos, bioquímicos, la concentración de nutrientes y los metabolitos primarios de las plantas de tomate en sus diferentes estados fenológicos, para variedades con diferentes características agronómicas.
2. Determinar los efectos que tienen la aplicación foliar de aminoácidos en el crecimiento vegetativo, procesos fisiológico, bioquímicos y los metabolitos de las plantas de tomate, cultivadas en condiciones óptimas en invernadero o regadas con aguas salinas.
3. Estimular el crecimiento vegetativo de las plantas de tomate mediante la aplicación foliar de aminoácidos.
4. Incrementar la tolerancia a la salinidad de las plantas de tomate cuando éstas se cultivan con aguas salinas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

6



Biblioteca  
UNIVERSIDAD Algora Hernández

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Primer ensayo

#### 6.1.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

El material vegetal empleado para este ensayo fueron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de las variedades: 'Green Zebra', 'Corazón de Buey', 'Tres Cantos', 'Montserrat', 'Roma VF', 'Óptima', 'Marglobe', 'Cherry' var. Mini Bell, 'Marmande VR' y 'Muchamiel', obtenidas de semillas adquiridas en "Semillas Batlle S.A." (Molins de Rei, Barcelona) y germinadas por "Semilleros Hnos. Lobo" (Orihuela, Alicante). Las plantas fueron trasplantadas a sacos de fibra de coco (FICO, Almería, España).

Doce plantas de cada variedad fueron trasplantadas a los sacos de fibra de coco. En cada saco se trasplantaron 3 plantas de la misma variedad que fue considerado como una unidad experimental. Las plantas se distribuyeron en cuatro bloques (n=4) y en cada bloque había un saco de cultivo de cada una de las variedades. El ensayo se llevó a cabo durante los meses comprendidos entre mayo y agosto en un invernadero multitunel situado en la finca experimental "Tres Caminos", perteneciente al Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC; Murcia, España).

Las plantas fueron regadas con solución nutritiva Hoagland (50%) preparada con agua del trasvase Tajo-Segura y los correspondientes fertilizantes comerciales incluyendo micronutrientes. Dicha solución nutritiva se aplicaba mediante un sistema de riego por goteo, utilizando para ello goteros autocompensantes de  $4 \text{ L h}^{-1}$ , cuyo volumen aplicado por planta se iba adaptando a las necesidades del cultivo en función de sus necesidades. A medida que las plantas fueron creciendo se aumentó progresivamente el porcentaje de solución nutritiva Hoagland hasta alcanzar el 100% de su composición.



**Figura 6.1.** Variedades de tomate empleadas durante el ensayo bajo condiciones de invernadero. a) Cherry b) Corazón de buey c) Green Zebra d) Marglobe e) Marmande VR f) Montserrat g) Muchamiel h) Óptima i) Roma VF J) Tres Cantos.



**Figura 6.2.** Vista aérea del invernadero donde se llevó a cabo el ensayo. Finca experimental que el CEBAS posee en el término municipal de Santomera, Región de Murcia.

### 6.1.2. Establecimiento de las diferentes fases de desarrollo de las plantas de tomate

El desarrollo del cultivo se dividió en las siguientes fases:

i) Fase I: Establecimiento del cultivo (cinco días después del trasplante DDT). ii) Fase II: Fase de desarrollo y de crecimiento vegetativo (tallo principal; 21 DDT). iii) Fase III: Primera floración y cuajado (fase reproductiva; 41 DDT), iv) Fase IV: Primera fase de desarrollo de fruto (fase de engorde del fruto; 61 DDT) y v) Fase V: Inicio cosecha y plena cosecha (84 DDT).

En cada una de las fases descritas se cogieron cuatro muestras de hojas para su análisis mineral. Las hojas se lavaron con agua desionizada y se secaron en estufa a 60°C durante al menos 48 h, otras cuatro muestras por variedad fueron congeladas en nitrógeno líquido y conservadas en un congelador a -80°C para su posterior análisis metabólico.





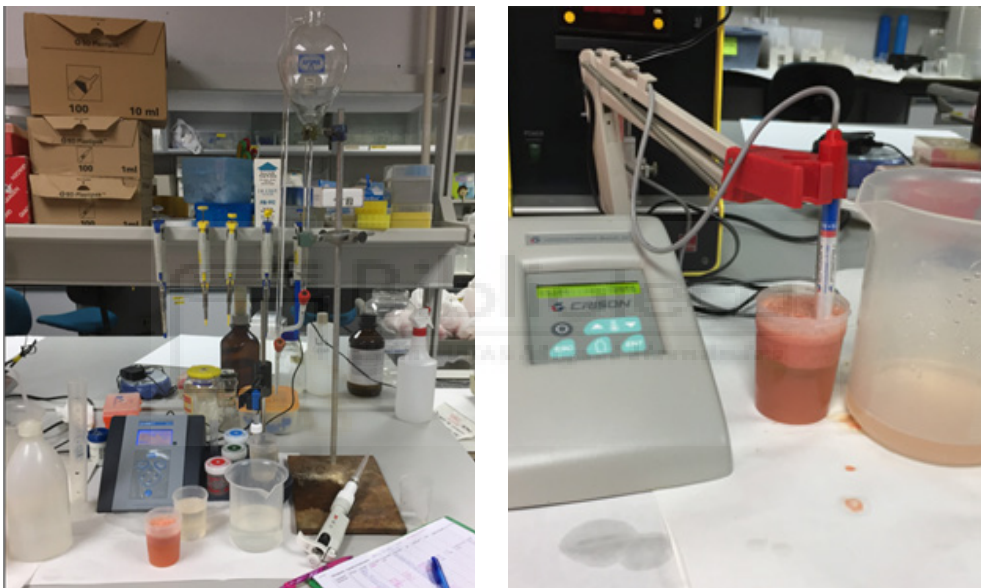
**Figura 6.3.** Desarrollo del cultivo del tomate dividido en **Fase I** (Establecimiento del cultivo), **Fase II** (Desarrollo y de crecimiento vegetativo), **Fase III** (Primera floración y cuajado), **Fase IV** (Primera fase de desarrollo de fruto) y **Fase V** (Inicio cosecha y plena cosecha).

### 6.1.3. Parámetros físicos de calidad de los frutos y producción final

Los frutos de tomate de cada variedad desarrollados durante los primeros cuatro racimos fueron cosechados dos días por semana cuando estos alcanzaron la calidad comercial. En cada planta los frutos se contaron y pesaron individualmente con una balanza de precisión Sartorius (Acculab), y se les midió el diámetro ecuatorial (mm) y el longitudinal (mm) con un calibre Digimatic digital de Mitutoyo CD-15D. También se evaluaron los daños visuales de los frutos cuando estos estaban afectados por alguna fisiopatía como el BER (Blosson and root) y/o rajado.

#### 6.1.4. Parámetros químicos de calidad de los frutos de tomate

En la última cosecha se eligieron diez frutos de tomate por planta y variedad, y se procedió a la extracción y filtrado del zumo para medir los parámetros químicos: i) pH y conductividad eléctrica (CE;  $\text{mS cm}^{-1}$ ) con un equipo pHmetro-conductímetro WTW pH/Cond 340I; ii) Sólidos solubles totales (SST), determinados por el índice de refracción expresado en  $^{\circ}\text{Brix}$ , mediante un refractómetro (Digital refractometer, DRB 0-45 nD); iii) Acidez valorable, medida por volumetría (AOAC, 1984); y iv) Fenoles Totales, medida por espectrofotometría basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción usando el reactivo de Folin Ciocalteu (Singleton y col., 1999).



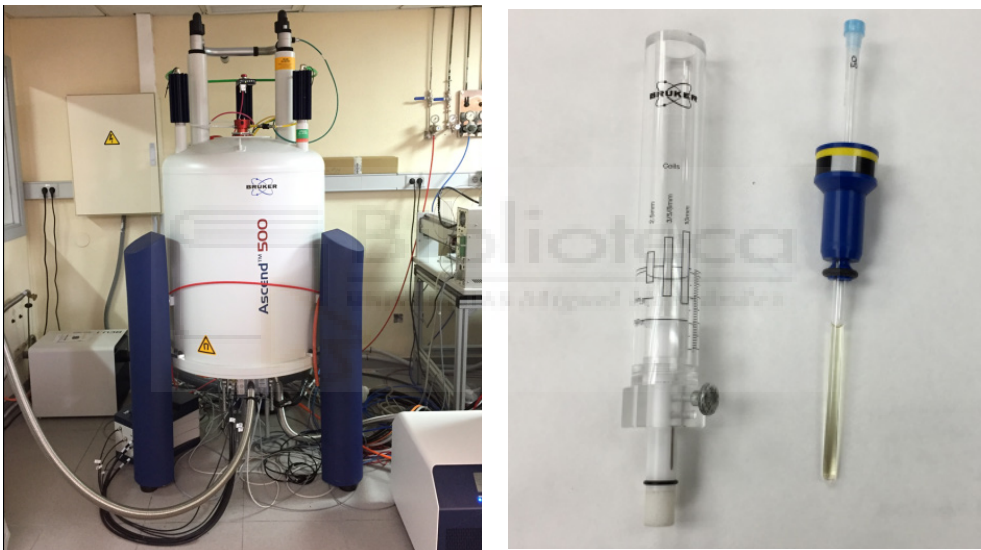
**Figura 6.4.** Determinación de los parámetros de calidad química en el zumo de los frutos de tomate.

#### 6.1.5. Parámetros de crecimiento

Una vez realizada la última cosecha de los frutos de tomate, se midió la altura de todas las plantas con la ayuda de una cinta métrica y posteriormente fueron decapitadas para medir por separado el peso fresco de las hojas y el tallo con una balanza de precisión Sartorius (Acculab) y se procedió al secado en una estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  durante al menos 48 h (g Ps parte aérea). Del tejido foliar, se cosecharon ocho folíolos por planta, los cuales se lavaron con agua desionizada; cuatro de ellos se procesaron en seco para el estudio nutricional y los otros cuatro se procesaron en fresco para el estudio metabólico. Las muestras de los folíolos se tomaron a una altura media de la planta y de hojas que estaban totalmente desarrolladas.

### 6.1.6. Análisis metabolómico de las hojas de tomate

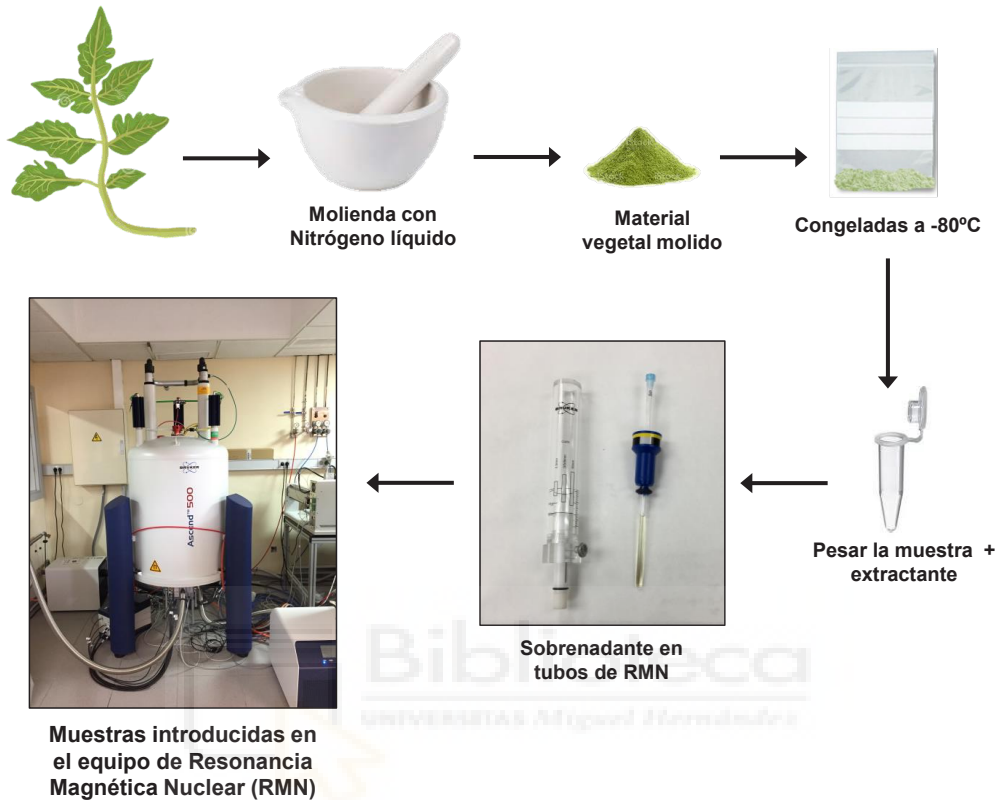
Se llevó a cabo un estudio metabolómico “no dirigido” con las muestras de hoja que se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  de las variedades ‘Cherry’, ‘Green Zebra’, ‘Montserrat’ y ‘Tres Cantos’. Estas muestras se liofilizaron y se sometieron a un proceso de extracción de acuerdo con el protocolo de Van der Sar y col. (2013). Para el análisis se utilizó la técnica de la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) con un espectrómetro Bruker de 500 MHz (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemania) equipado con una criosonda de N<sub>2</sub> Prodigy BBO de 5 mm de banda ancha (Figura 6.5). Todos los extractos de hojas de tomate se midieron a  $300.1 \pm 0.1 \text{ K}$ , sin rotación y con 4 como número de scans de prueba, antes de los 32 scans del experimento.



**Figura 6.5.** Equipo de Resonancia Magnética Nuclear (RMN Magnet 500 MHz).

Los espectros de <sup>1</sup>H-RMN resultantes se procesaron con el programa Chenomx NMR Suite versión 8.3 (Chenomx, Edmonton, Canadá), con la finalidad de identificar y cuantificar los metabolitos de interés. Todas las muestras se calibraron con la señal del estándar interno (IS), el 3-(trimetilsilil)propionato-2,2'-3,3'-sódico-d<sub>4</sub> (TSP) y el pH se fijó en torno a un valor de 6. En el software utilizado existe una amplia base de datos espectral donde se pueden detectar metabolitos que estén por encima de los 5-10  $\mu\text{M}$ ; entre los metabolitos que se han podido encontrar y/o cuantificar destacamos los siguientes: aspartato, glutamato, alanina, glutamina, isoleucina, valina, tirosina, prolina, fenilalanina, citrato, ácido formico, fumarato, malato, fructosa, glucosa, sacarosa, GABA y trigonelina (Duynhoven y col., 2013; Becerra-Martínez y col., 2017).





**Figura 6.6.** Determinación del perfil metabolómico en hojas de tomate.

### 6.1.7. Determinación de la concentración de nutrientes minerales en hojas de tomate

Para estudiar la concentración de los nutrientes foliares en todas las fases de desarrollo del cultivo, se analizaron las muestras de hojas que se fueron tomando durante todo el ensayo en las variedades 'Cherry', 'Green Zebra', 'Montserrat' y 'Tres Cantos'. La concentración de Na, K, Mg, Ca, P, S, Fe, Cu, Mn, Zn y B en hoja se analizó mediante espectrometría de plasma acoplado inductivamente (Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, Franklin, USA), tras la digestión con  $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$  (5:3 en volumen) utilizando un microondas (CERM Mars Xpress, North Carolina, USA) con rampa de temperatura en la que se alcanzaba los 200°C en 20 min, manteniendo esta temperatura durante 2 h. El N y C total se midió con un analizador elemental C/N Thermo Finnigan (Milan, Italy).

### 6.1.8. Determinación del perfil hormonal en hojas de tomate

Con las muestras foliares cogidas durante todo el experimento, guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  (ver apartado 6.1.2), se procedió a la determinación del perfil hormonal cuantificándose la concentración de *trans*-Zeatin (tZ), isopenteniladenina (iP), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (AS) y ácido jasmónico (AJ). Se analizaron de acuerdo al protocolo de Albacete y col. (2008) utilizando un equipo de U-HPLC-MS (Accela Serie U-HPLC ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) y analizando los datos con el software Xcalibur 2.2. (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU)



**Figura 6.7.** Equipo y determinación del perfil hormonal en hojas de tomate.

### 6.1.9. Análisis estadístico

El diseño experimental fue unifactorial (estudio de 10 variedades) para cada una de las 4 fases fenológicas, con un total de 3 bloques. El análisis estadístico de los datos incluyó un análisis de la varianza (ANOVA) con el programa estadístico SPSS versión 24 (Chicago, IL, USA). Cuando las variables resultaron significativas ( $P < 0.05$ ), las medias de los tratamientos fueron separadas utilizando el test de rangos múltiples de Duncan. Se realizaron análisis de componentes principales (ACP) y análisis de conglomerados (AC). El AC se aplicó a los datos estandarizados para asociaciones jerárquicas empleando el método de Ward para la aglomeración y la distancia euclidiana al cuadrado como medida de disimilitud. El ACP y los dendrogramas fueron utilizados para seleccionar las 4 variedades más diferentes entre sí. Se realizó un análisis de componentes de varianza, donde se estimó la contribución de múltiples factores a la variabilidad de una variable dependiente. Siendo la cantidad de variabilidad de los factores "variedad" y "fase fenológica".

## 6.2. Segundo ensayo y tercer ensayo

### 6.2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

El experimento se llevó a cabo en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de la variedad 'Óptima', adquiridas de un semillero comercial (Babyplant S.L., Santomera, Murcia, España) y se desarrolló en el invernadero descrito en el apartado 6.1.1. Las condiciones climáticas en el interior del invernadero fueron: temperatura día/noche  $32/19 \pm 3^\circ\text{C}$ , radiación fotosintéticamente activa máxima (PAR) de  $1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , humedad relativa del  $52/80 \pm 5\%$  y 15h de fotoperiodo.

Las plántulas de tomate, fueron seleccionadas de forma homogénea de acuerdo a su altura y número de hojas verdaderas desarrolladas, posteriormente se trasladaron a macetas de 3,5 L con sustrato "Universal" de granulometría fina, libre de patógenos y de semillas de malas hierbas, con una composición de turba rubia y negra, fibra de coco y perlita en la proporción 5:4:1 (Projar profesional, 2018, España). Las plantas se regaron con la solución nutritiva y goteros descritos en el apartado 6.1.1. Al igual que en el primer ensayo el agua procedió del trasvase Tajo-Segura, teniendo una conductividad eléctrica (CE) en torno a  $0,9 \text{ dS m}^{-1}$  y un pH de 8,2.



**Figura 6.8.** Trasplante de las plántulas de tomate var. Óptima a macetas con turba en invernadero. Fueron regadas mediante un sistema de goteros autocompensantes de  $4 \text{ L h}^{-1}$ .

### 6.2.2. Aminoácidos empleados y preparación

Los AAs empleados para el segundo ensayo fueron ácido glutámico (Glu), ácido aspártico (Asp) y alanina (L-Ala), mientras que para el tercer ensayo fueron tirosina (L-Tyr), lisina (L-Lys) y metionina (L-Met) adquiridos en Calid Ibérica (Barcelona, España). En primer lugar y para cada aminoácido de forma individual se preparó una solución madre con una concentración del 7%, dicha concentración procedió de pesar 7 g de cada uno de los AAs y se diluyeron con 100 mL de agua ultrapura; por su parte en el caso del caso del Glu y del Asp se les adicionó gotas de KOH al 50% para favorecer su disolución en agua. Una vez que los aminoácidos individuales (7%) estaban listos, se procedió a la preparación de los tratamientos. Para el segundo ensayo los tratamientos fueron: 15 mM Aspártico (Asp), 15 mM Glutamico (Glu), 15 mM Alanina (Ala), 15 mM Aspartico + 15 mM Glutamico (Asp+Glu) y 15 mM Aspartico + 15 mM Glutamico + 15 mM Alanina (Asp+Glu+Ala). Mientras que para el tercer ensayo los tratamientos fueron: 15 mM Tirosina (Tyr), 15 mM lisina (Lys), 15 mM Metionina (Met), 15 mM Tirosina + 15 mM Lisina + 15 mM Metionina (Tyr+Lys+Met). A cada formulado, se le adicionó Twenn-20 al 0.1% (tensoactivo que produce una mejoría en la adherencia de los formulados en las hojas de las plantas) y se ajustó el pH entre 5.5-6.5.

Por tanto, los tratamientos que se aplicaron para el segundo ensayo fueron: 1) Tratamiento control (sin AAs, en la que se pulverizaba a las plantas de tomate únicamente agua ultrapura); y tratamientos con aplicación foliar de los aminoácidos: 2) Asp, 3) Glu, 4) L-Ala, 5) Asp+Glu y 6) Asp+Glu+L-Ala. Para cada uno de los tratamientos la concentración de nitrógeno equivalente ( $\text{mg L}^{-1}$ ) fue Asp 0,22; Glu 0,22; L-Ala 0,22; Asp+Glu 0,44 y Asp+Glu+L-Ala 0,66.

Los tratamientos del tercer ensayo fueron: i) Tratamiento control (sin AAs, en la que se pulverizaba a las plantas de tomate únicamente agua ultrapura); y tratamientos con aplicación foliar de los aminoácidos: ii) Tyr, 3) Lys, 4) Met y 5) Tyr+Lys+Met. Además, estos tratamientos se caracterizaban por tener una concentración de nitrógeno en  $\text{mg L}^{-1}$ , Tyr: 0,09; Lys: 0,20; Met: 0,20; Tyr+Lys+Met: 0,49.

### 6.2.3. Aplicación de los tratamientos

La aplicación de los tratamientos se realizó tras dos semanas de aclimatación y se efectuó de forma foliar. Cada tratamiento se pulverizó sobre la parte aérea de las plantas, cubriendo la superficie foliar. Las plantas se dividieron en cuatro bloques y, dentro de cada bloque, se le aplicaron los tratamientos a tres plantas que se consideraron como una unidad experimental.



**Figura 6.9.** Aplicación foliar de los diferentes aminoácidos en plantas de tomate var. Óptima.

### 6.2.4. Parámetros de intercambio gaseoso

Una semana después de la aplicación de los tratamientos, se midió la tasa de asimilación neta de  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{CO}_2}$ ), la conductancia estomática ( $g_s$ ), y se calculó el uso eficaz del agua por parte de las plantas ( $\text{UEA} = A_{\text{CO}_2}/E_{\text{leaf}}$ , donde  $E_{\text{leaf}}$  corresponde al valor de transpiración foliar obtenido en cada medida) y la relación  $C_i/C_a$  (donde  $C_i$  corresponde al  $\text{CO}_2$  subestomático y  $C_a$  al  $\text{CO}_2$  externo). Estos parámetros se midieron en dos plantas por tratamiento y bloque, a lo largo de la mañana (8:30-11:00 h) utilizando un analizador portátil de gases para la medición de parámetros de intercambio gaseoso (PP System Ciras2, UK). El equipo se configuró para mantener la luz (PAR:  $1200 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y la concentración de  $\text{CO}_2$  (400 ppm) constante en la cámara de medida.



**Figura 6.10.** Medidas de los parámetros de intercambio gaseoso en plantas de tomate bajo condiciones de invernadero con el equipo portátil de fotosíntesis (PP System Ciras2, UK).



### 6.2.5. Parámetros de fluorescencia de clorofilas y concentración de clorofilas

Las medidas de fluorescencia de clorofilas se midieron, en las mismas plantas donde se midieron los parámetros de intercambio gaseoso, utilizando un fluorímetro de pulso modulado FMS-2 portátil (Hansatech Instruments Ltd., UK). Los parámetros de fluorescencia de la clorofila que se midieron fueron: la eficiencia cuántica de PSII,  $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s) / F_m'$ ; la eficiencia de antenas de PSII,  $F_v' / F_m' = (F_m' - F_0') / F_m'$ ; y el coeficiente de extinción fotoquímica,  $qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0')$ , donde  $F_s$  es el rendimiento de fluorescencia en estado estable,  $F_m'$  es el valor máximo cuando todos los centros de reacción se cierran después de un pulso de luz de saturación ( $12000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante 0,8 s), y  $F_0'$  es la fluorescencia mínima en el estado adaptado a la luz que se obtiene al apagar la luz actínica temporalmente y aplicar un pulso de luz roja lejana (735 nm) para drenar los electrones de PSII. También se realizaron medidas de las clorofilas mediante un medidor portátil CL-01 (unidades SPAD - Hansatech).



**Figura 6.11.** Medidas de los parámetros de fluorescencia de clorofilas en plantas de tomate bajo condiciones de invernadero con el equipo portátil de fluorescencia de clorofilas (fluorímetro de pulso modulado FMS-2 portátil; Hansatech Instruments Ltd., UK).



**Figura 6.12.** Medidas in vivo del contenido de clorofilas en plantas de tomate bajo condiciones de invernadero con el medidor portátil CL-01 (unidades SPAD – Hansatech).

### 6.2.6. Parámetros de crecimiento

Tras las medidas de intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas, se llevaron a cabo las siguientes medidas de crecimiento tanto de altura, como de diámetro de tallo. Además, se realizó un conteo del número de flores en cada planta y se calculó el porcentaje de flores abiertas, después se procedió a cosechar las plantas. Tras la cosecha de las plantas, se llevaron a cabo las acciones descritas en el apartado 6.1.5. (peso fresco y seco de la parte aérea, y toma de muestras en seco y fresco).



**Figura 6.13.** Medidas de altura, diámetro en tres puntos del tallo y conteo de flores en plantas de tomate bajo condiciones de invernadero.



**Figura 6.14.** Cosecha final de las plantas de tomate bajo condiciones de invernadero.

### 6.2.7. Determinación de la concentración de nutrientes minerales en hojas de tomate

Para el estudio nutricional, se analizaron las muestras previamente secadas y molidas. La concentración de los nutrientes se analizó con espectrometría de plasma acoplado inductivamente (Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, Franklin, USA), de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 6.1.7. Mientras que el N total se midió con un analizador de C/N Thermo Finnigan (Milán, Italia).

### 6.2.8. Análisis metabólico de las hojas de tomate

Se llevó a cabo un estudio metabólico "*no dirigido*", donde los detalles del procedimiento de extracción para análisis de las muestras y el equipo empleado se pueden ver en el apartado 6.1.6.

### 6.2.9. Análisis estadístico

El diseño experimental fue unifactorial para este ensayo (aplicación foliar a los tratamientos) con un total de cuatro unidades experimentales ( $n=4$ ) basadas en cuatro unidades biológicas por cada una. El análisis estadístico incluyó un ANOVA con el programa SPSS v24 (Chicago, IL, USA). Cuando el ANOVA resultó significativo ( $P<0,05$ ), se aplicaba el test de separación de medias de Duncan para  $P<0,05$ . Por otro lado, con el mismo programa estadístico, se realizó una matriz de correlación de Pearson, para caracterizar la relación lineal entre las variables. Además, para establecer si había o no diferencias significativas entre el porcentaje de metabolitos comparados con el control, se hizo un test, aplicando la t-Student, en la que los datos fueron previamente transformados mediante el arcoseno de la raíz cuadrada del valor dividido entre cien. También se llevó a cabo un análisis de componentes principales (ACP) y un análisis de conglomerados (AC) de acuerdo con lo descrito en el apartado 6.1.9.



## 6.3. Cuarto ensayo

### 6.3.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

El experimento se realizó en plantas de tomate cultivar "Óptima". Para la realización de este ensayo se cultivaron dichas plantas, procedentes de un vivero comercial (Baby Plant, S.L), en cultivo hidropónico en una cámara de cultivo del CEBAS-CSIC (Espinardo, Murcia) con condiciones medioambientales controladas: fijando un fotoperiodo de 16 horas de luz con  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura de  $25^\circ\text{C}$  día/noche y humedad relativa (60%). Las plántulas fueron cultivadas en contenedores de 9 L de capacidad que contenían solución nutritiva Hoagland cuya composición era:  $0,54 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{KNO}_3$ ,  $0,84 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $0,14 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,25 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4$ ,  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  de Fe, y  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  de mezcla de micronutrientes (Hidromix S, Valagro). Esta solución nutritiva presentaba una  $\text{CE}=2 \text{ dS/m}$ , y el pH se ajustaba cada semana en un rango comprendido entre 5,5-6,5 con  $\text{NaOH 1M}$ . A dichos contenedores se les hacía pasar una corriente constante de aire para evitar que se produjeran condiciones de hipoxia durante el avance del ensayo. Transcurrido el período de aclimatación (7 días), se procedió a iniciar el ensayo, donde las plantas estuvieron 10 días en condiciones de sal.



**Figura 6.15.** Aclimatación y desarrollo de las plantas de tomate en cultivo hidropónico y crecidas en cámara de cultivo.

### 6.3.2. Tratamiento de salinidad

El ensayo contaba con un grupo de plantas cultivadas en solución nutritiva Hoagland sin salinidad (control;  $CE=2 \text{ dS cm}^{-1}$ ) y otro grupo de plantas cultivadas con dicha solución pero a la que se le adicionó NaCl a una concentración de 50 mM ( $CE \approx 8 \text{ dS cm}^{-1}$ ). La CE era controlada diariamente con el medidor de conductividad (LAQUAtwin EC-22, Kyoto, Japón).



**Figura 6.16.** Aplicación del tratamiento salino ( $CE=2 \text{ dS cm}^{-1}$ ) a las plantas de tomate en cultivo hidropónico y crecidas en cámara de cultivo.

### 6.3.3. Preparación de los aminoácidos y aplicación de AAs y mezclas durante el periodo de estrés por salinidad

De los 21 aminoácidos proteicos se seleccionaron: ácido Glutámico (Glu), Prolina (Pro), Arginina (Arg), Metionina (Met), y Triptófano (Trp) que se aplicaron vía foliar, de forma individual o en mezclas, a las plantas del tratamiento salino, teniendo en total los siguientes tratamientos independientes: i) Control (-sal), ii) salino (+sal), iii) Met +sal, iv) Arg +sal, v) Pro +sal, vi) Glu +sal, vii) Trp +sal, viii) Met+Arg +sal, ix) Met+Trp +sal, x) Glu+Pro +sal. Para la aplicación de los aminoácidos seleccionados, primero se prepararon soluciones madres individuales de cada uno de ellos (Glu, Pro, Arg, Met y Trp) al 5%. En segundo lugar, para la aplicación foliar de cada aminoácido: i) en la forma individual se decidió una dosis de  $10 \text{ mL L}^{-1}$  de la solución madre, y para ii) para las mezclas de dos aminoácidos, se prepararon una solución a partir de las dos soluciones madres teniendo en cuenta que la dosis final de cada uno de los aminoácidos fuera también de  $10 \text{ mL L}^{-1}$ . Antes de la aplicación, a todos los productos se les ajustó el pH a 5,5-6,0 y se les adicionó Tween-20 al 0,1%; un tensoactivo que mejora la adherencia de la solución pulverizada. La aplicación de estos productos se realizó una hora

antes de que se iniciara el tratamiento salino; para ello, se pulverizaron las plantas de tal manera que quedaran cubiertas completamente las hojas con los preparados. Para cada tratamiento había 4 contenedores con 3 plantas en cada contenedor. En total se utilizaron 120 plantas, y se consideró una unidad experimental cada contenedor con sus tres plantas.



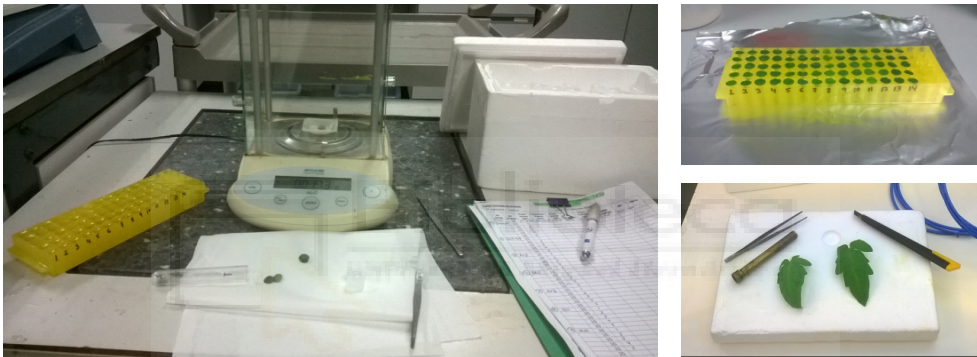
**Figura 6.17.** Preparación y aplicación foliar de los aminoácidos una hora antes del inicio del tratamiento salino a plantas de tomate en cultivo hidropónico y crecidas en cámara de cultivo.

#### 6.3.4. Parámetros de crecimiento

Al final del experimento (transcurridos 6 días desde la aplicación foliar), las plantas se cosecharon y se pesaron por separado hojas, tallo y raíz (g pf). Tras la cosecha de las plantas, se llevaron a cabo las acciones descritas en el apartado 6.1.5. (peso fresco y seco de la parte aérea, y toma de muestras en seco). Por su parte, para la cuantificación de contenido relativo de agua (CRA) de las plantas se tomaron discos foliares de cada planta de 1 cm de diámetro, se pesaron (g pf) y se colocaron en una gradilla con agua destilada durante 16 hora en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente. Trascurrido ese tiempo, se pesaron de nuevo (g pf) y se procedió a secarlos en estufa a 60°C durante 16 horas, y, entonces, se pesaron una vez más (g ps). Con los datos de los pesos se calculó el contenido de agua de la parte aérea.



**Figura 6.18** Cosecha final de las plantas de tomate, pesando por separado hojas, tallo y raíz.



**Figura 6.19** Cuantificación del contenido relativo de agua (CRA) de las plantas de tomate, donde se tomaron discos foliares de cada una de ellas.



### 6.3.5. Concentración de clorofilas en hojas de tomate

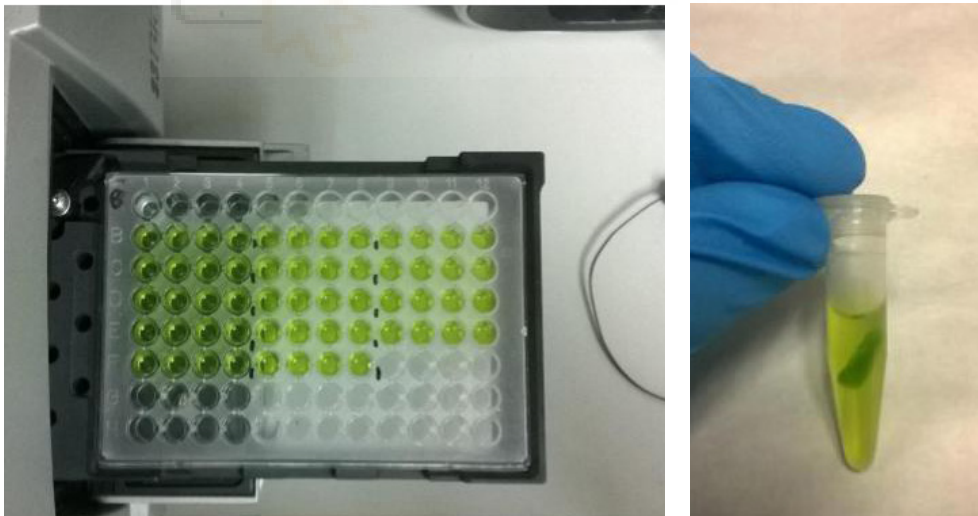
Para la determinación de la concentración de clorofilas totales en hoja se utilizó el método espectrofotométrico expuesto por Hansmann (1973), con algunas modificaciones. Se tomaron discos de 1 cm de diámetro de material vegetal foliar y se suspendieron en un volumen de 5 mL de acetona-agua al 90% (v/v) como disolvente extractor de los pigmentos. Se agitó y se dejó reposar en un lugar oscuro a 4°C durante 24h. Posteriormente, se procedió a medir la densidad óptica del sobrenadante a 665, 645 y 630 nm, verificando que no existe turbidez ni partículas en suspensión. Como blanco se utilizó el propio disolvente. Para la cuantificación se utilizó la ecuación planteada por Parsons y Strickland (1963):

$$Ca \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 11,6 \text{ D.O.665} - 1,31 \text{ D.O.645} - 0,14 \text{ D.O.630}$$

$$Cb \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 20,7 \text{ D.O.645} - 4,34 \text{ D.O.665} - 4,42 \text{ D.O.630}$$

$$Cc \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 55,0 \text{ D.O.630} - 4,64 \text{ D.O.665} - 16,3 \text{ D.O.645}$$

Donde Ca, Cb y Cc son las concentraciones de clorofila a, b y c, respectivamente, y D.O. es la densidad óptica medida. Finalmente, la concentración de clorofilas se expresó en  $\text{mg g}^{-1}$  pf de muestra.



**Figura 6.20.** Determinación de la concentración de clorofilas en plantas de tomate mediante método espectrofotométrico.

### 6.3.6. Parámetros bioquímicos

Al final del experimento, también se cuantificó la concentración de prolina, carbohidratos (azúcares solubles totales, azúcares reductores y almidón) y la concentración de compuestos amonio cuaternarios (CAQ) en las hojas. La prolina fue extraída del tejido foliar seco con ácido sulfosalicílico (3%) y se cuantificó de acuerdo con el protocolo descrito por Bates y col. (1973). Por su parte, los azúcares solubles totales y los reductores se extrajeron también del tejido foliar seco con etanol (80%) y se cuantificó de acuerdo a los protocolos descritos por Hodge y Hofreiter (1962), Nelson (1944) and Somogyi (1952). También se determinó la concentración de almidón foliar por el método descrito por Haissig y Dickson (1979). Por su parte, a partir del material seco extrajeron y cuantificaron los CAQ, de acuerdo con el protocolo de Grieve y Grattan (1983). Los resultados se expresaron de  $\text{mg g}^{-1}$  ps.

### 6.3.7. Análisis mineral

Se llevó a cabo un estudio nutricional de las muestras foliares secas y molidas. La concentración de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{NO}_3^-$  se midieron con un cloridómetro de titulación de iones de plata (Corning 926 Chloridometer; Sherwood, UK) y un HPLC Dionex DX-600, respectivamente, previa extracción con agua destilada. Por otro lado, la concentración de Na y Ca se analizó mediante espectrometría de plasma descrito en el apartado 6.1.7.

### 6.3.8. Análisis estadístico

Para este ensayo contamos como un diseño unifactorial (tratamiento con aminoácidos) y el análisis estadístico de los datos incluyó un análisis de la varianza (ANOVA) con el programa estadístico SPSS versión 24 (Chicago, IL, USA). Cuando las variables resultaron significativas ( $P < 0,05$ ), las medias de los tratamientos fueron separadas utilizando el test de rangos múltiples de Tukey. Los valores que se presentan para cada tratamiento son la media de 4 repeticiones experimentales (cada repetición es la media de tres plantas). También se realizó un análisis de componentes principales (ACP) y un análisis de conglomerados (AC) de acuerdo con lo descrito en el apartado 6.1.9.



## 7. PUBLICACIONES

### 7.1. Publicación 01

#### Título

Ionic, metabolic and hormonal characterization of the phenological phases of different tomato genotypes through the use of ICP, H-NMR, and U-HPLC-MS

#### Autores

Alfosea-Simón, M., Simón-Grao, S., Zavala-González, E.A., Navarro, I., Martínez-Nicolás, J.J., Alfosea-Simón, F.J., Simón, I., y García-Sánchez, F.

#### Revista

*Scientia Horticulturae*, 293, 110697

#### Categoría JCR

Plant Sciences

#### Categoría de cuartil

Q1

#### Factor de impacto

3,463 (2020)





Contents lists available at ScienceDirect

Scientia Horticulturae

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/scihorti](http://www.elsevier.com/locate/scihorti)

# Ionic, metabolic and hormonal characterization of the phenological phases of different tomato genotypes using omics tools

Marina Alfosea-Simón<sup>a</sup>, Silvia Simón-Grao<sup>a</sup>, Ernesto A. Zavala-Gonzalez<sup>b</sup>, Iván Navarro-Morillo<sup>b</sup>, Juan J. Martínez-Nicolás<sup>c</sup>, Francisco J. Alfosea-Simón<sup>a</sup>, Inmaculada Simón<sup>c</sup>, Francisco García-Sánchez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Edafología y Biología Aplicada del Seguro, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Murcia, Spain

<sup>b</sup> Investigadores asociados al departamento I+D Atlántica Agrícola, Spain

<sup>c</sup> Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Miguel Hernández University, Spain

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
 Biostimulants  
 Development phases  
 H-NMR  
 Hormones  
 Macronutrients  
 Micronutrients

## ABSTRACT

Biostimulants have become highly important in agriculture. For these products to be efficient, they need to be formulated, for a specific crop, according to the mineral nutrients and metabolites requirements in each phenological phase of the crops. In this study, the agronomical behavior of 10 tomato varieties was evaluated ('Cherry', 'Corazón de Buey', 'Green Zebra', 'Marglobe', 'Marmande VR', 'Montserrat', 'Muchamiel', 'Óptima', 'Roma VF' and 'Tres Cantos'), in order to select four varieties with the greatest agronomical differences between them to be analyzed by omics tools. So, the varieties 'Cherry', 'Green Zebra', 'Montserrat', and 'Tres Cantos' were selected for an ionic, metabolic, and hormone study to determine the predominant nutrients and metabolites in the different phenological phases, and to relate it with its agronomic characteristics. It was observed that the variability of the results could be mainly explained by the different phenological phases during the development of the crop, rather than by the variety. The major compounds were N (4.71 g 100 g<sup>-1</sup> dw), K (3.86 g 100 g<sup>-1</sup> dw), P (0.53 mg g<sup>-1</sup> dw), glutamate (5.21 mg g<sup>-1</sup> dw), glutamine (2.89 mg g<sup>-1</sup> dw), aspartate (1.54 mg g<sup>-1</sup> dw), tyrosine (2.36 mg g<sup>-1</sup> dw), phenylalanine (1.70 mg g<sup>-1</sup> dw), sucrose (14.4 mg g<sup>-1</sup> dw), malate (13.2 mg g<sup>-1</sup> dw), and isopentenyladenine (iP) (2.65 ng g<sup>-1</sup> dw). No correlation was found between any specific compound and an agronomic characteristic. But, it can be concluded that Biostimulant products must contain these compounds in order to stimulate growth and increase the production of tomatoes plants, as they comprise most of the metabolites and nutrients needed in some or all of the phenological phases.

## 1. Introduction

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most important crops worldwide. Its production has progressively increased throughout the years, reaching 180 million tons worldwide, with an average production of 36 t/ha. The European continent produces approximately 23 million tons, with the largest producers being Italy (23.0%) and Spain (21.9%) (FAO, 2020). This increase in production is due to the great demand for tomato fruits by consumers, as they form part of the idea of healthy foods, since they are rich in bioactive compounds associated with good health, such as carotenoids, lycopene, vitamins, sugars, and phenolic compounds. These compounds impede the multiplication of cancer cells, and could act as antioxidants against the development of diseases that are associated with cardiovascular problems, macular degeneration, and

other eye-related diseases (Gholami et al., 2021).

Given its great economic and nutritional importance, new varieties are constantly emerging in the market (Coyago-Cruz et al., 2019). These new varieties are characterized by their great uniformity, resistance to diseases, and a long post-harvest period; and at the same time, they differ in other qualities, such as their size, shape, color, volatile compounds, and other metabolites (Lee et al., 2019; Quinet et al., 2019; Ghani et al., 2020). However, despite these advantages, these new tomato varieties have difficulties in adapting to the growing conditions which are different from the places at which they were developed. Also, the new scenarios imposed by climate change prevent these varieties from reaching their maximum agronomical performance. High temperatures, salinity, drought, boron toxicity, etc., lead to a decrease in the performance and fruit quality of different tomato varieties (Krishna

\* Corresponding author.

E-mail address: [fgs@cebas.csic.es](mailto:fgs@cebas.csic.es) (F. García-Sánchez).

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110697>

Received 29 June 2021; Received in revised form 21 October 2021; Accepted 25 October 2021

Available online 10 November 2021

0304-4238/© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

et al., 2019). One of the strategies utilized for improving the performance of crops is the application of biostimulant products, which are defined by EU regulation 2019/1009 as “products which improve the absorption of nutrients, tolerance to abiotic and biotic stresses, and the quality of the crops”. These biostimulants can be formulated with different types of compounds, such as algae extracts, free amino acids, humic acids, and hydrolyzed proteins, among others (Alfósea-Simón et al., 2021; Iraní et al., 2021). These products, when applied efficiently, increase the plant’s performance both in optimum and adverse conditions, as flowering, fruit set, and fruit quality (Rouphael and Colla, 2020).

Knowledge on the metabolic (amino acids, organic acids, sugars, among others), mineral nutrients, and hormonal profiles in each one of its phenological phases (Batista-Silvia et al., 2018) could be useful for the formulation of new biostimulant products. However, as of today, not many studies have been conducted to obtain scientific knowledge on the composition and concentration of these compounds as a function of the phenological phase of the crops. This knowledge will allow the formulation of specific biostimulant products (BP) with those compounds that the plant needs (Alfósea-Simón et al., 2020). These new products will (when exogenously applied) supply those compounds that are most demanded by the plants, or those that are synthesized in low amounts due to their genetic characteristics, but which have important physiological functions. This will allow the plants to save energy, as they will not have to synthesize it, and/or will induce the physiological mechanisms that help them to adapt to the adverse environmental condition, such as osmotic adjustment, antioxidant capacity, induction of defense mechanisms, etc. (De Saeger et al., 2020). These new biostimulant formulations will facilitate the conversion of conventional agriculture to a model of agronomic production that is more environmentally friendly, through the reduction of conventional fertilizers and other products synthetically produced (Rouphael and Colla, 2020). Taking into account the above, the objective of this study was to characterize the phenological states (F2, vegetative growth and development; F3, flowering and fruit set; F4, fruit development; F5, maturation of the fruit) according to their mineral, metabolic and hormonal composition of four tomato varieties with contrasting agronomic characteristics to know which compounds are the most demanded by tomato crops in each of its phenological states and if these compound are related with the agronomical characteristics of the varieties. To achieve this objective, in the first place, an agronomic study was carried out (vegetative growth, production and quality of the fruit) with ten tomato varieties. From this study, using statistical analysis tools, four varieties with the most different agronomic characteristics were selected (‘Cherry’, ‘Green Zebra’, ‘Montserrat’ and ‘Tres Cantos’). In these selected varieties, ionic, metabolomic and hormonal analyzes were carried out in leaf samples collected at different phenological phases using different omic tools.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material and growing conditions

The plant materials utilized were tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) of the following varieties: i) ‘Green Zebra’, ii) ‘Corazón de Buey’, iii) ‘Tres Cantos’, iv) ‘Montserrat’, v) ‘Roma VF’, vi) ‘Optima’, vii) ‘Marglobe’, viii) ‘Cherry’ var. Mini Bell, ix) ‘Marmande VR’, and x) ‘Muchamiel’, obtained from seeds acquired at “Semillas Batlle S.A.” (Molins de Rei, Barcelona, Spain), and germinated by “Semilleros Hnos. Lobo” (Orihuela, Alicante, Spain). Once the plants reached a mean height of 10–20 cm (according to the variety), they were transplanted into coconut fiber bags (FICO, Almería, Spain). Each of the bags which was previously hydrated had a capacity of 40 L and measures 100 × 18 × 16 cm. The coconut fibers consisted of mesocarp residues of the coconut fruit (*Cocos nucifera*), 70% coconut chips, and 30% coconut coir. Twelve plants from each variety, that were homogeneous in height

and without any symptoms of deficiency or disease, were transplanted into the bags. Three plants from each variety were transplanted into each bag, and was considered as an experimental unit. The experimental design was a completely randomized block, with four blocks, and each block contained one coconut fiber bag per variety. Thus, a total of 90 plants and 30 coconut fiber bags were utilized in this study. The study was conducted during the months of May and August in a greenhouse located in the experimental fields “Tres Caminos”, belonging to the Center of Edaphology and Applied Biology of the Segura (CEBAS-CSIC; Murcia, Spain). To control the temperature, a cooling system and aluminum shading nets (30%) were utilized. The environmental conditions inside the greenhouse during the study were: day/night temperature 30/18 ± 3 °C, relative humidity 54/82 ± 5%, and a photoperiod of 15 h.

The plants were watered with Hoagland nutrient solution (50%) prepared with water from the Tajo-Segura River and fertilizers. This nutrient solution had an electrical conductivity of 2.89 dS m<sup>-1</sup> and a pH of 7.9, and the following mineral fertilizers were added: KNO<sub>3</sub> (27 g 100 L<sup>-1</sup>), Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (42 g 100 L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (7 g 100 L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub> (13 g 100 L<sup>-1</sup>), Fe-EDTA (1 g 100 L<sup>-1</sup>), as well as a commercial mixture of micronutrients (1 g 100 L<sup>-1</sup>; (Hidromix S, Valagro)). The nutrient solution was applied using a drip irrigation system, comprised of self-compensating drippers with a flow rate of 4 L h<sup>-1</sup>. The volume of water applied was not constant and it depended on the needs of the crops, according to the phenological phase and the climatic conditions. As the plants grew, the percentage of the Hoagland nutrient solution increased until it reached 100% in the composition.

### 2.2. Establishment of the different phases of development of the tomato plants

To conduct the agronomic, nutritional, physiological, and metabolic study of the 10 tomato varieties in different phenological phases of the crop, the growing period was divided into the following phases: Phase I: Establishment of the crop (five days after transplant, DAT), Phase II: vegetative development and growth phase (main stem; 21 DAT), Phase III: First flowering and fruit set (reproductive phase; 41 DAT), Phase IV: first phase of fruit development (fruit development; 61 DAT), and Phase V: start of harvest and full harvest (84 DAT).

In each one of the phases, four leaf samples (5 leaves per variety and block) were collected for mineral analysis. The leaves were washed with deionized water and dried in an oven at 60 °C for at least 48 h; another four samples per variety were frozen in liquid nitrogen and stored in a freezer at -80 °C for their posterior metabolomics and hormonal analysis.

### 2.3. Physical quality variables of the fruit and final production

The tomato fruits from each variety (see Image 1) were harvested two days per week when these reached their commercial size. For each plant, the fruits were counted and individually weighed with a precision scale (Sartorius, Acculab), and their equatorial (mm) and longitudinal (mm) diameters were measured with a digital gage (Digimatic, Mitutoyo CD-15D with precision of 0.1 mm). Also, a visual inspection was performed to check for physiological disorders such as BER (Bottom-end rot) and cracking. The fruits were classified into commercial and non-commercial categories, where the non-commercial categories comprised of fruits with visual damages in more than 20% of the total surface of the fruit.

### 2.4. Chemical quality variables of the tomato fruits

To evaluate the chemical quality variables of the fruits, 10 tomato fruits per plant and variety were selected from the last harvest, and their heights and diameters were recorded. The juice from these ten fruits was extracted and filtered to measure the following chemical parameters: i)

pH and electrical conductivity (EC; expressed as  $\text{mS cm}^{-1}$ ) with a pH/conductivity meter device (WTW pH/Cond 340i), which included a thermometer to compensate for the temperature; *ii*) total soluble solids (TSS), determined by refraction index and expressed in °Brix, with a digital refractometer (DRB 0–45 nD); *iii*) titratable acidity, measured by volume (AOAC, 1984); and *iv*) total phenols, measured with spectrophotometry, based on an oxidation–reduction colorimetric reaction with the Folin-Ciocalteu reagent (Singleton et al., 1999).

### 2.5. Growth variables

Once the last tomato fruit harvest was completed, the heights of plants were measured with a metric measuring tape, after which they were cut at the root, to separately measure the fresh weight of the leaves and the stem with a precision scale (Sartorius, Acculab). The fresh weight of the shoot was calculated as the sum of the fresh weight of the leaves and the fresh weight of the stem. Afterwards, both tissues were washed with deionized water and dried in an oven at 60 °C for at least 48 h. Then, they were weighed again to obtain the dry weight and were milled to obtain a fine powder for the posterior mineral analysis.

### 2.6. Metabolomic analysis of the tomato leaves

A non-targeted metabolic study of the leaf samples stored at  $-80\text{ °C}$  was performed from the varieties ‘Cherry’, ‘Green Zebra’, ‘Montserrat’ and ‘Tres Cantos’. The leaf samples were lyophilized and extracted following the protocol by Van der Sar et al. (2013), after which they were analyzed with an RMN Ascend 500 MHz AVANCE III HD H—NMR (Germany). The resulting spectra were evaluated with the ‘Chenomx NMR Suite’ version 8.3 program. A detailed description of the method can be found in Alfósea-Simón et al. (2021).

### 2.7. Determination of the concentration of mineral nutrients in tomato leaves

To determine the concentration of the leaf nutrients in every phenological phase of each crop variety, the leaf samples taken throughout the study were analyzed (see section 2.3.2), from the varieties ‘Cherry’, ‘Green Zebra’, ‘Montserrat’ and ‘Tres Cantos’. The concentration of the nutrients was analyzed with inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, Franklin, USA), according to the methodology described in Alfósea-Simón et al. (2021). While the total N was measured with a Thermo Finnigan C/N analyzer (Milan, Italy).

### 2.8. Determination of the hormone profile of tomato leaves

The leaves samples collected and stored at  $-80\text{ °C}$  (see section 2.3.2) throughout the experimental period were utilized to determine the hormone profile. This was done by quantifying the concentration of *trans*-Zeatin (tZ), isopentenyladenine (iP), abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA), and jasmonic acid (JA). These were analyzed according to the protocol by Albacete et al. (2008) and through the analysis of the data with the Xcalibur 2.2 software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

### 2.9. Statistical analysis

The experimental design was one-way (study of 10 varieties) for each one of the 4 phenological phases, with a total of three blocks. The statistical analysis included an analysis of variance (ANOVA), performed with the SPSS v24 statistical program (Chicago, IL, USA). When the factors were significant ( $p < 0.05$ ), the means were separated with Duncan’s multiple range test. Principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA) were also performed. Cluster analysis was performed with the standardized data for hierarchical associations,

employing Ward’s method for agglomeration and the squared Euclidean distance as the dissimilarity measure. The PCA results and the dendrograms were utilized to select the four most dissimilar varieties, which were utilized for the hormonal, nutritional, and metabolic study. In addition, a Variance Component Analysis was performed, which is designed to estimate the contribution of multiple factors to the variability of a dependent variable Y; in this case, the amount of variability of the factors ‘variety’ and ‘phenological phase’ was shown.

## 3. Results

### 3.1. Agronomic study of the ten varieties assayed

The ten tomato varieties studied showed significant differences among them in the variables of vegetative growth, and production and quality of fruits. The vegetative development results showed that the total dry biomass ranged between 57 and 176  $\text{g plant}^{-1}$ . The varieties with the greatest growth were ‘Green Zebra’ and ‘Montserrat’, with values of 155.2 and 175.8  $\text{g dry weight (dw)}$ , respectively (Table 1). The greatest vegetative growth of the ‘Montserrat’ variety was due to the high values of leaf and stem biomass, while ‘Green Zebra’ obtained high values in leaf biomass. The plants from the ‘Cherry’ variety stood out because of their height, as they reached values of 2.68  $\text{m plant}^{-1}$ , although this value was not significant with respect to ‘Corazón de Buey’, ‘Green Zebra’, ‘Montserrat’ and ‘Muchamiel’.

Fruit production ranged between 1.15–3.26  $\text{kg plant}^{-1}$ , with the highest production observed in the variety ‘Marglobe’, although this was not different with respect to ‘Marmande VR’, ‘Montserrat’, ‘Muchamiel’, and ‘Optima’ (Table 1). The greater production of these varieties with respect to the others was due to having a greater mean fruit weight. However, the number of fruits per plant was similar for all the varieties (27 fruits per plant), except for the ‘Cherry’ variety, which produced 237 fruits per plant. However, the mean weight of the fruits was very low (18.1  $\text{g fruit}^{-1}$ ) (Table 2).

As for the internal quality of the fruits, the total soluble sugars and the titratable acidity were 4.20–6.5°Brix and 3.31–8.53  $\text{g L}^{-1}$  respectively, and the varieties with the highest values were ‘Cherry’ and ‘Green Zebra’. The highest maturity indexes were found in ‘Corazón de Buey’, ‘Montserrat’, ‘Optima’ and ‘Roma VF’. The total phenol content oscillated between 0.38  $\text{mg mL}^{-1}$  (‘Cherry’) and 0.13  $\text{mg mL}^{-1}$  (‘Montserrat’). No significant differences were found in the electrical conductivity of the ten varieties, while the pH of the ‘Green Zebra’ variety were lower (3.92) than the rest of the varieties (4.34).

### 3.2. Principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA)

The PCA and CA classified the ten tomato varieties studied into three well-differentiated groups: 1) ‘Cherry’, 2) ‘Green Zebra’, and 3) two sub-groups 3.1 ‘Corazon de Buey’, ‘Montserrat’, ‘Marglobe’, ‘Optima’, ‘Marmande VR’ and ‘Muchamiel’; and 3.2: ‘Roma VF’ and ‘Tres Cantos’. From this data, we selected the varieties ‘Cherry’ (Group 1), ‘Green Zebra’ (Group 2), ‘Montserrat’ (Group 3.1) and ‘Tres Cantos’ (Group 3.2). Table 3 shows the analysis of the components of variance which reports that the variability of the data was due, to a greater extent, to the phenological phases rather than the varieties assayed, except for the leaf concentration of aspartic acid, where the variability of the data was 42% due to the phases, and 46% to the varieties

### 3.3. Aminogram of the varieties ‘Cherry’, ‘Green Zebra’, ‘Montserrat’ and ‘Tres Cantos’ in the different phenological phases

In the leaves from the four varieties selected, the H—NMR study detected and quantified the amino acids Alanine (Ala), Aspartic acid (Asp), Gamma-Aminobutyric acid (GABA), Glutamic acid (Glu), Glutamine (Gln), Isoleucine (Ile), Phenylalanine (Phe), Tyrosine (Tyr), and Valine (Val). Of these amino acids, the highest concentration was for

**Table 1**

Growth and production of the tomato plants of the different varieties assayed: plant height (m), leaves biomass (g dw), stem biomass (g dw), shoot biomass (SH; g dw), number of fruits per plant, total fruit weight per plant, and mean fruit weight.

Variety	SH (g dw plant <sup>-1</sup> )	Height (m plant <sup>-1</sup> )	Leaves (g dw plant <sup>-1</sup> )	Stem (g dw plant <sup>-1</sup> )	Fruit (number plant <sup>-1</sup> )	Total fruit weight (kg plant <sup>-1</sup> )
Cherry	94.8 bc	2.68 a	57.7 b	37.1 cd	237 a	1.15 f
Corazon de Buey	113.8 b	2.36 abc	66.6 b	47.3 b	27 b	2.27 bcde
Green Zebra	155.2 a	2.23 abc	110.7 a	44.5 b	21 b	1.46 ef
Marglobe	73.3 cd	1.36 d	52.1 bc	21.2 e	27 b	3.26 a
Marmande VR	102.6 b	1.93 c	69.0 b	33.6 d	29 b	2.71 abc
Montserrat	175.8 a	2.44 ab	106.7 a	69.1 a	25 b	2.62 abc
Muchamiel	111.1 b	2.45 abc	68.5 b	42.6 bc	25 b	3.03 ab
Optima	93.0 bc	2.13 bc	57.3 b	35.7 d	29 b	2.49 bcd
Roma VF	67.9 d	1.04 de	51.8 bc	16.1 e	35 b	1.62 def
Tres Cantos	57.1 d	0.85 e	38.7 c	18.4 e	24 b	1.85 cdef
ANOVA	***	***	***	***	***	***

For the ANOVA: \*\*\* indicates significant differences at  $p < 0.001$ . The different lower case letters indicate significant differences between the treatments at  $p < 0.05$  established by Duncan's multiple range test ( $n = 9$ ).

**Table 2**

Physical and chemical quality variables of the tomato juice of the different varieties: Fruit fresh weight, Caliber (equatorial diameter), height (longitudinal diameter), pH, Electrical Conductivity (EC;  $dS m^{-1}$ ), Total Soluble Solids (°Brix), Titratable Acidity (TA,  $g L^{-1}$ ), Maturity index (MI), and Total phenols ( $mg mL^{-1}$  juice); measured in harvested tomato fruits from the different varieties.

Variety	Fruit weight (g plant <sup>-1</sup> )	Caliber (mm)	Height (mm)	pH	EC (mS $cm^{-1}$ )	TSS°Brix	TA ( $g L^{-1}$ )	MI	Phenols ( $mg L^{-1}$ juice)
Cherry	5.0 f	20.1 e	18.1 d	4.22 ab	5.22	6.48 a	5.73 b	11.9 ab	380 a
Corazon de Buey	84.3 cd	56.6 c	60.0 a	4.49 a	5.41	5.62 bc	4.08 bc	13.8 a	170 ef
Green Zebra	70.0 d	55.9 c	42.6 c	3.92 b	4.65	5.88 ab	8.53 a	7.06 b	290 bc
Marglobe	123.0 a	67.2 ab	53.2 b	4.35 a	4.22	4.58 de	3.47 c	13.2 a	250 cd
Marmande VR	94.2 bc	64.9 b	43.3 c	4.31 a	4.45	4.83 cde	4.88 bc	9.93 ab	330 ab
Montserrat	105.2 b	69.1 ab	48.8 b	4.46 a	4.19	4.70 de	3.31 c	14.3 a	130 f
Muchamiel	128.0 a	71.6 a	53.2 b	4.35 a	4.47	4.23 e	4.43 bc	9.80 ab	210 de
Optima	89.0 bc	66.6 ab	42.6 c	4.36 a	4.60	4.45 de	3.41 c	15.2 a	220 cde
Roma VF	46.1 e	43.5 d	53.6 b	4.40 a	4.25	5.23 bcd	4.14 bc	12.7 a	180 ef
Tres Cantos	79.7 cd	59.3 c	54.6 b	4.17 ab	5.01	4.93 cde	4.45 bc	11.2 b	180 ef
ANOVA	***	***	***	***	ns	***	***	***	***

In the ANOVA: "ns" indicates non-significant differences for a 95% confidence interval; on its part, \*\*\* indicates significant differences at  $p < 0.001$ . The different lower case letters indicate significant differences between the treatments at  $p < 0.05$  established by Duncan's multiple range test ( $n = 4$ ).

**Table 3**

Analysis of variance components. For each of the variables analyzed, the amount of variability of each of the factors (Variety and Phenological Phase) is shown. The variables analyzed are shown as groups of 5 homogenous blocks (macronutrients, micronutrients, hormone, amino acids, organic acids, and sugars).

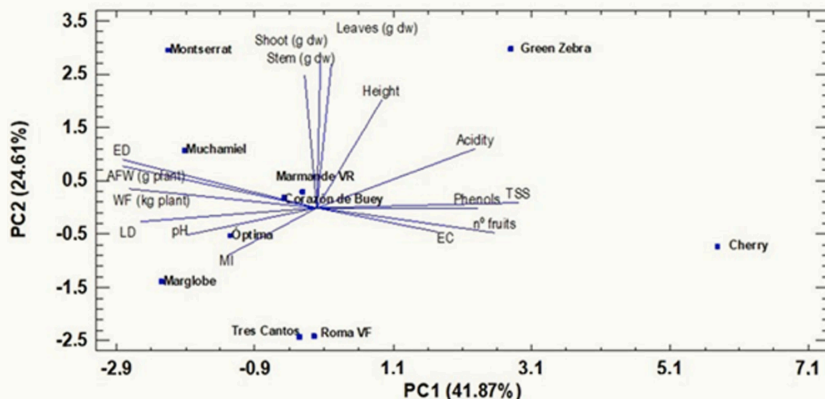
Macronutrients (percent)		Ca		Mg		Na		P							
Source	K														
Variety	0.00	1.34	0.00	30.41	3.97										
Phase	81.98	85.40	86.61	51.71	83.79										
Error	18.02	13.26	13.39	17.89	12.24										
Micronutrients (percent)		Cu		Fe		Mn		Zn							
Source	B														
Variety	0.00	3.34	0.00	10.99	0.00										
Phase	91.64	82.07	88.94	64.32	78.70										
Error	8.36	14.59	11.06	24.69	21.30										
Hormones (percent)		iP		ABA		JA		SA							
Source	tZ														
Variety	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00										
Phase	92.97	88.56	82.60	94.06	89.13										
Error	7.03	11.44	17.40	5.94	10.87										
Amino acids (percent)		GABA		Glu		Gln		Ile		Phe		Tyr		Val	
Source	Ala	Asp													
Variety	12.35	11.69	0.00	0.19	2.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.53	
Phase	67.62	42.19	92.70	76.08	87.86	81.51	97.50	91.10	82.90						
Error	20.03	46.12	7.30	21.80	12.14	18.49	2.50	8.90	15.56						
Organic acids and sugars (percent)		Malate		Formate		Fumarate		Fructose		Glucose		Sucrose			
Source	Citrate														
Variety	32.21	0.00	0.19	0.19	0.00	0.00	4.95	3.17	0.00						
Phase	54.23	85.77	78.39	87.27	82.50	85.92	85.92	92.01							
Error	13.56	14.23	21.43	12.73	12.55	10.91	7.99								

Glu, followed by the amino acids Gln, Tyr, Asp, GABA and Phe (Fig. 2); while the amino acids with the least concentration (below  $1 mg g^{-1}$ ) were Ala, Ile, and Val.

The aminogram data revealed that the phenological phase had a

stronger effect than the variety, with the following response models established during the phases (Fig. 2): i) GABA, Ile, Phe, and Val had constant values in phases F2, F3 and F4, increasing in phase F5; ii) Glu and Ala had constant values throughout all the phases, except for

### A. Principal components analysis (PCA)



### B. Cluster analysis (CA)

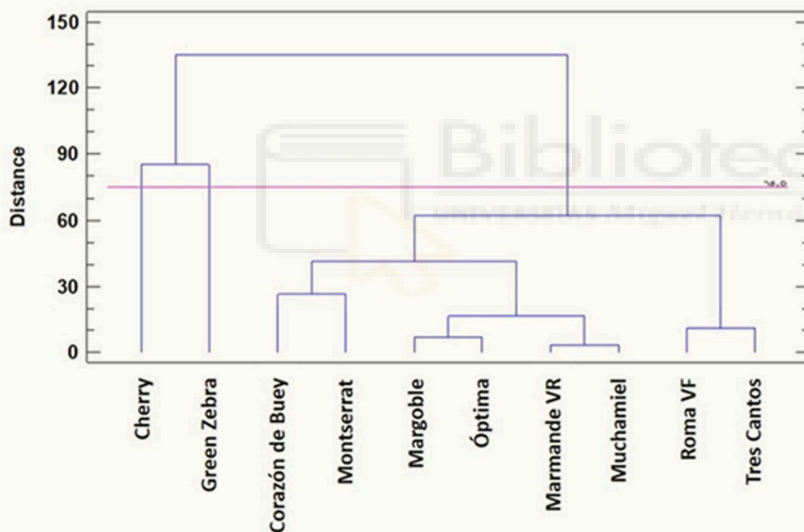


Fig. 1. (A) Principal components analysis (PC1 and PC2) and (B) cluster analysis (CA) performed with the growth and production parameters, and the physical and chemical parameters of the fruits from the ten tomato varieties assayed. PC1 (41.87%) explain fruit number per plant, fruit production (kg plant<sup>-1</sup>), fruit weight (g fruit<sup>-1</sup>), fruit caliber (mm), fruit longitudinal diameter (mm), and total soluble solids. PC2 (24.61%) explain fruit height, leaf biomass (g plant<sup>-1</sup> dw), stem biomass (g plant<sup>-1</sup> dw) and shoot (g plant<sup>-1</sup> dw).

phase F3 where the highest Glu-concentration was observed; iii) In the concentration of Tyr, the maximum concentration was found in F1 (2.35 mg g<sup>-1</sup> dw), after that, it progressively decreased from F1 to F3, and then increased to reach F4; iv) Gln-and Asp-increased from phase F2 to F3 where it reached the highest concentration (5.21 mg g<sup>-1</sup> dw), after that, it progressively decreased until F5.

Image 1. Tomato varieties utilized in the present study and grown in a greenhouse.

In the varieties, it is worth noting that in phase F5, the highest concentration of GABA was found in the ‘Cherry’ variety, while the lowest was found in ‘Tres Cantos’. For Ile, Val, and Gln, the greatest concentrations were found in ‘Montserrat’ in all the phases. ‘Green Zebra’ had the highest Phe-concentration in F5 and the highest concentration in Ala-for F3 and F4 phases. The lowest concentrations for Phe-and Ala-were found in ‘Cherry’ in phase F4. A clear trend was not observed for the rest of the amino acids with respect to the varieties.

#### 3.4. Organic acid and sugar profiles of the varieties ‘Cherry’, ‘Green Zebra’, ‘Montserrat’ and ‘Tres Cantos’ in the different phenological phases

The organic acids detected and identified by H—NMR were citrate, formic acid, fumarate and malic acid, and the sugars were fructose, glucose, and sucrose. In the first set of compounds, the highest concentration was found for malate, followed by citrate, fumarate, and formic acid. As for the sugars, the concentration increased in the following order: sucrose < glucose < fructose.

Relative to the phenological phases, the malate concentration showed a decrease from F2 to F5; although depending on the variety, an increase in concentration was also observed between these two phases. This increase was observed in F3 in ‘Cherry’ and ‘Tres Cantos’, and in F4 in ‘Green Zebra’. For the concentration of citrate, the varieties ‘Cherry’, ‘Montserrat’, and ‘Green Zebra’ obtained the highest values in F2 and F5 with respect to F3 and F4, while in ‘Tres Cantos’, a gradual decrease was



Amino Acids

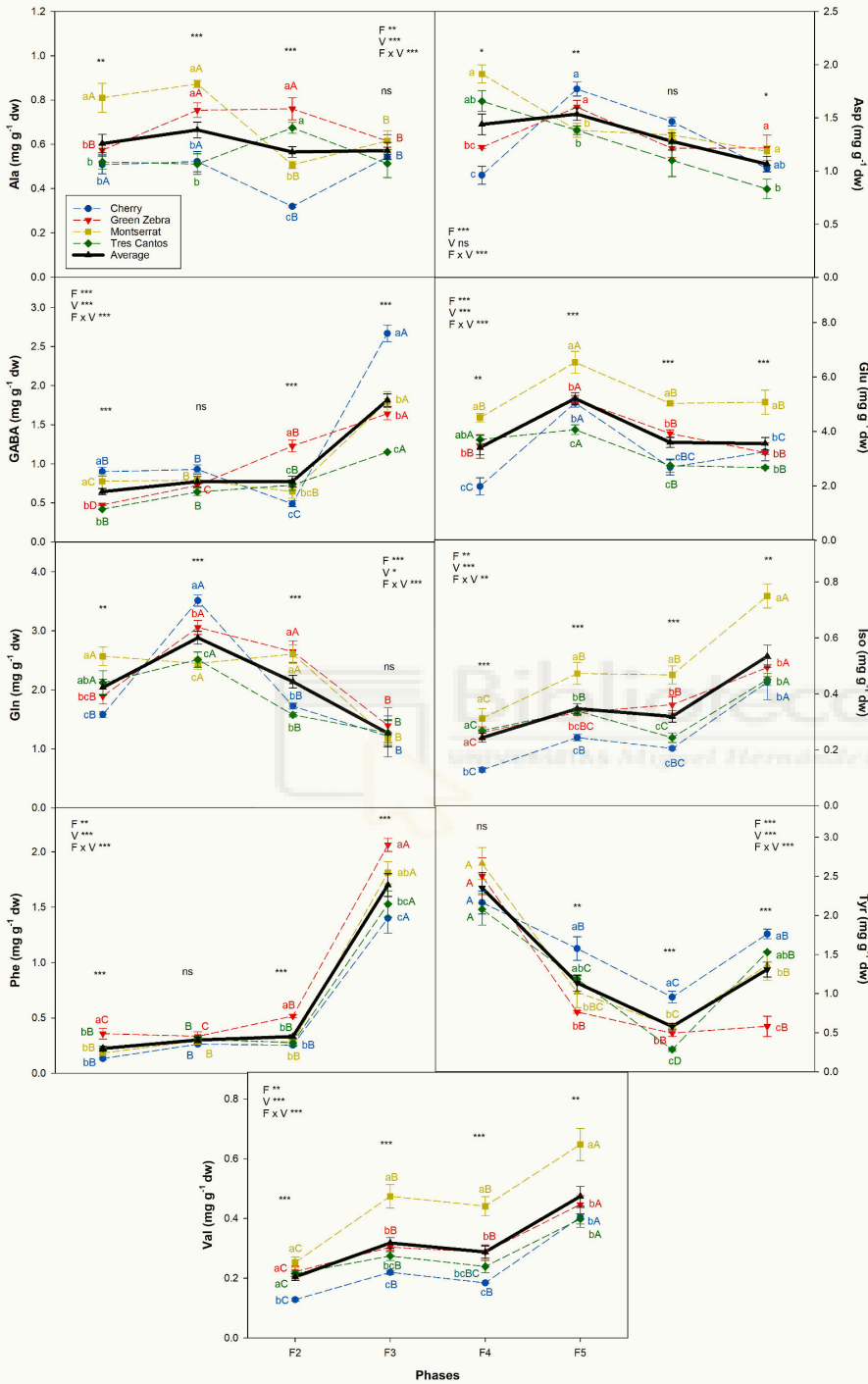


Fig. 2. Concentration of amino acids ( $\text{mg g}^{-1} \text{ dw}$ ) detected and quantified by H-NMR in four tomato varieties ('Cherry', 'Green Zebra', 'Montserrat' and 'Tres Cantos'). Plants were grown in a greenhouse and were evaluated during the four phases of crop development: F2 (development and vegetative growth), F3 (first flowering and fruit set), F4 (fruit development) and F5 (harvest). In the ANOVA, \*\*\*, \*\* and \* indicate significant differences at  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively. Duncan's multiple range test was used to separate the means. The different lowercase letters (a, b, c and d) indicate significant differences between varieties for each phenological phase ( $p < 0.05$ ). The different capital letters (A, B, C and D) indicate significant differences between the phenological phases of each of the varieties. Vertical bars indicate the standard error of the mean ( $n = 4$ ).

### Organic Acids and Sugars

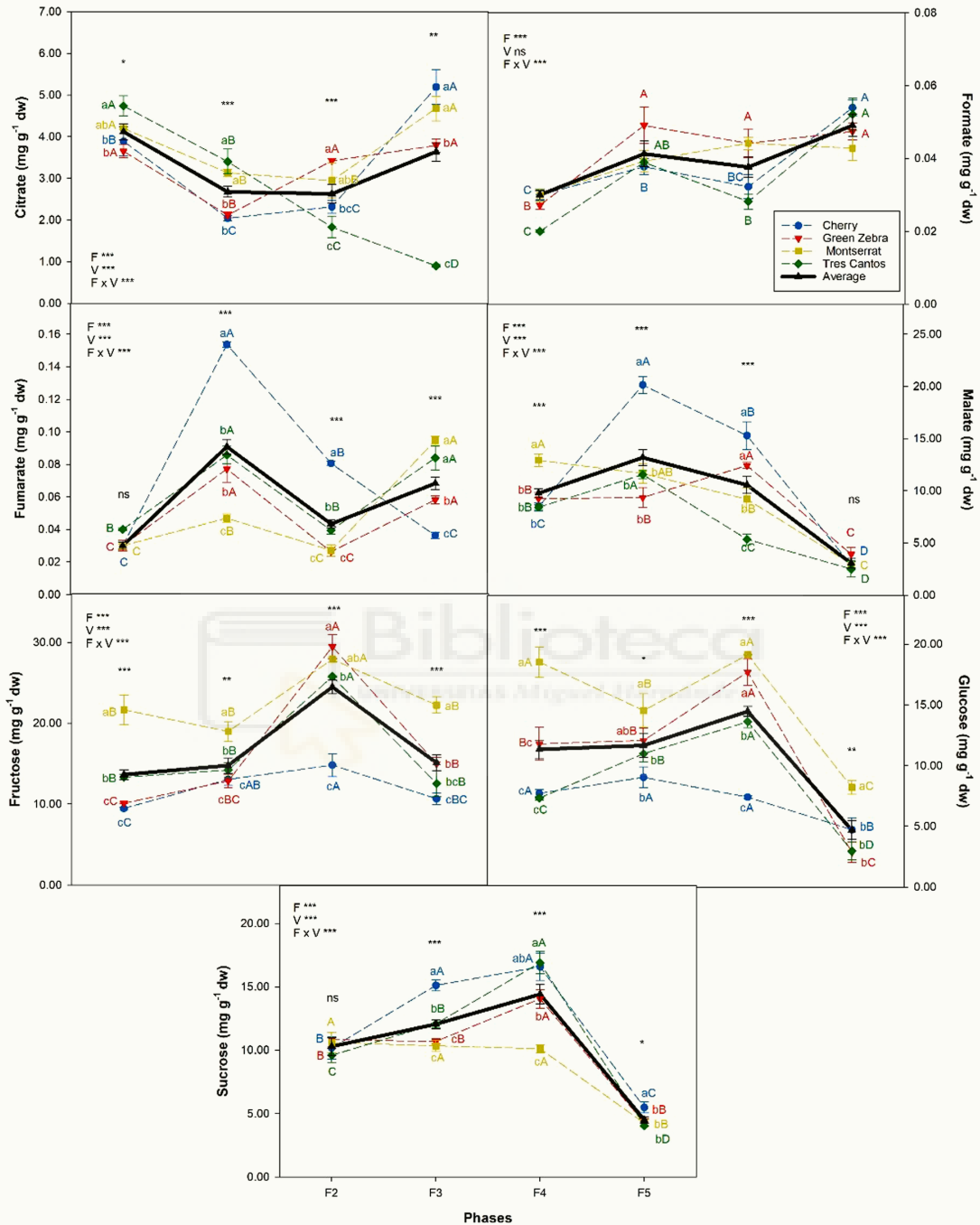


Fig. 3. Concentration of organic acids and sugars (mg g<sup>-1</sup> dw) detected and quantified by H-NMR in four tomato varieties ('Cherry', 'Green Zebra', 'Montserrat' and 'Tres Cantos'). Plants were grown in a greenhouse and were evaluated during the four phases of crop development: F2 (development and vegetative growth), F3 (first flowering and fruit set), F4 (fruit development) and F5 (harvest). In the ANOVA, \*\*\*, \*\*, and \* indicate significant differences at  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.05$ , respectively. Duncan's multiple range test was used to separate the means. The different lower case letters (a, b, c, and d) indicate significant differences between varieties for each phenological phase ( $p < 0.05$ ). The different upper case letters (A, B, C, and D) indicate significant differences between the phenological phases for each of the varieties. The vertical bars indicate the standard error of the mean ( $n = 4$ ).

observed, where the minimum value reached in F5 was 0.90 mg g<sup>-1</sup> dw. As for the concentration of fumarate, the mean values of all the varieties increased in all the phases in the following order: F2, F4, F5, and F3. However, this trend was not observed in the variety 'Cherry', as in the last phenological phase (F5), the concentration continued to decrease with respect to F4. The evolution of the formate concentration with the phenological phases, except for 'Montserrat', was similar for all the varieties, with an increase from F2 to F3, and from F4 to F5, while it

decreased from F3 to F4. In 'Montserrat', however, a progressive increase was observed with the phases until F4, when the value was stabilized until reaching F5.

As for the concentration of all the sugars quantified (fructose, glucose and sucrose) in the different varieties and phases of development, the same behavior was observed in all the sugars, where the highest concentration was found in F4, highlighting the high values of fructose and glucose in 'Montserrat'.

### Macronutrients

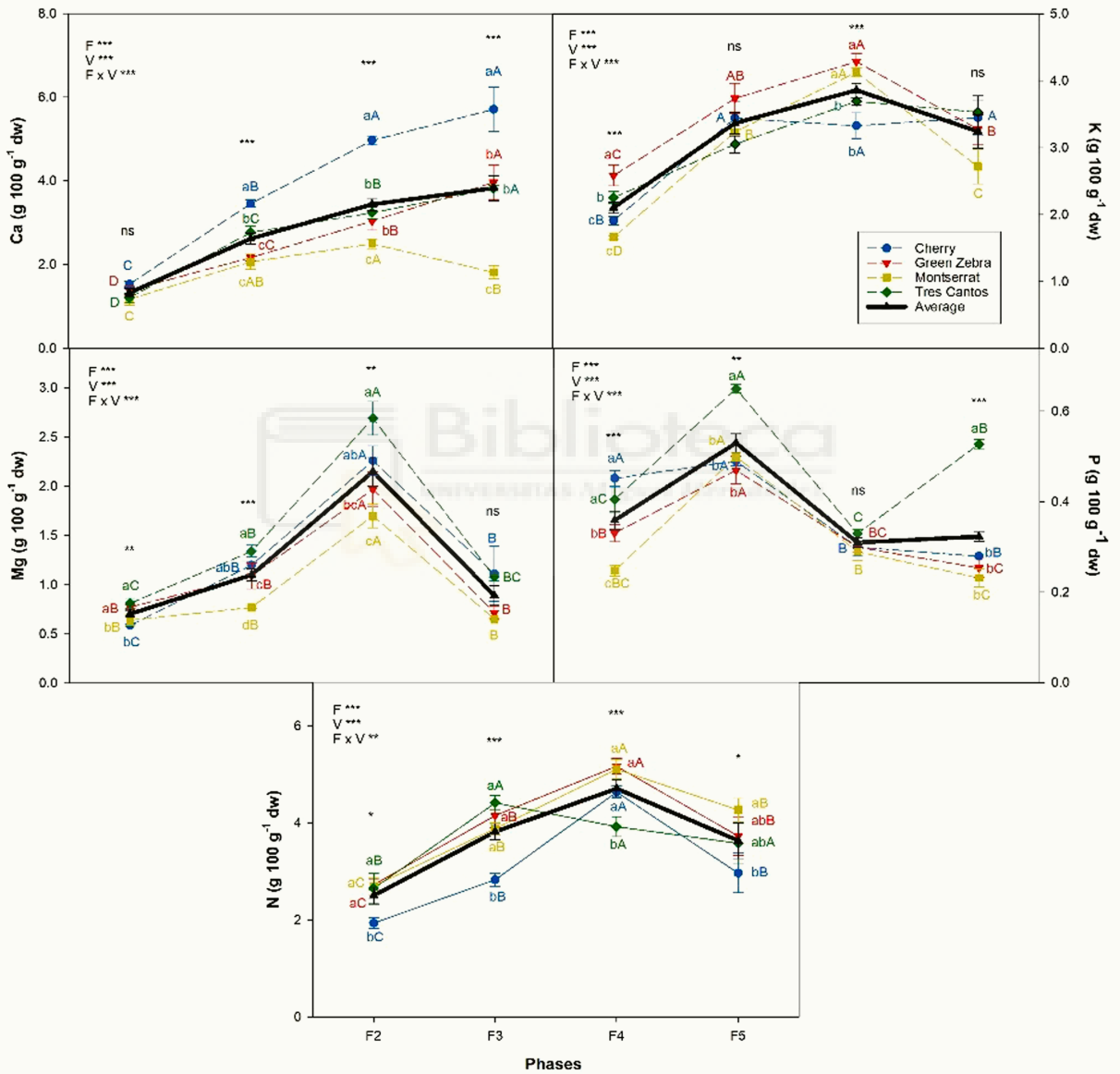


Fig. 4. Concentration of macronutrients (g 100 g<sup>-1</sup> dw) detected and quantified by ICP in four tomato varieties ('Cherry', 'Green Zebra', 'Montserrat' and 'Tres Cantos'). Plants were grown in a greenhouse and were evaluated during the four phases of crop development: F2 (development and vegetative growth), F3 (first flowering and fruit set), F4 (fruit development) and F5 (harvest). In the ANOVA, \*\*\*, \*\*, and \* indicate significant differences at  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.05$ , respectively. Duncan's multiple range test was used to separate the means. The different lower case letters (a, b, c, and d) indicate significant differences between varieties for each phenological phase ( $p < 0.05$ ). The different upper case letters (A, B, C, and D) indicate significant differences between the phenological phases for each of the varieties. The vertical bars indicate the standard error of the mean ( $n = 4$ ).



3.5. Ionic study of the varieties ‘Cherry’, ‘Green Zebra’, ‘Montserrat’, and ‘Tres Cantos’ in the different phenological phases

Figs. 4 and 5 show the changes in concentration of the macroelements (Ca, K, Mg, P, and N) and the microelements (B, Cu, Fe, Mn, and Zn) respectively, in the different phenological phases for the four varieties selected. The variability of the data was mainly due to the phenological phase, although differences between varieties were also

observed. In the case of the leaf concentration of Ca, K, Mg, P, and N, an increasing trend was found as the phases progressed, where the highest concentration reached in F4 for K, Mg, and N, was 3.86, 2.15 and 4.71 g 100<sup>-1</sup> dw, respectively, and in F5 for Ca, with a value of 4.0 g<sup>-1</sup> dw (Fig. 4). The highest concentration of P was found in F3 (0.53 mg g<sup>-1</sup> dw), with a value of 0.3 g 100 g<sup>-1</sup> dw maintained in the rest of the phases. As for the varieties, the highest concentrations were found for K in ‘Green Zebra’, Ca in ‘Cherry’, and P and Mg in ‘Tres Cantos’.

Micronutrients

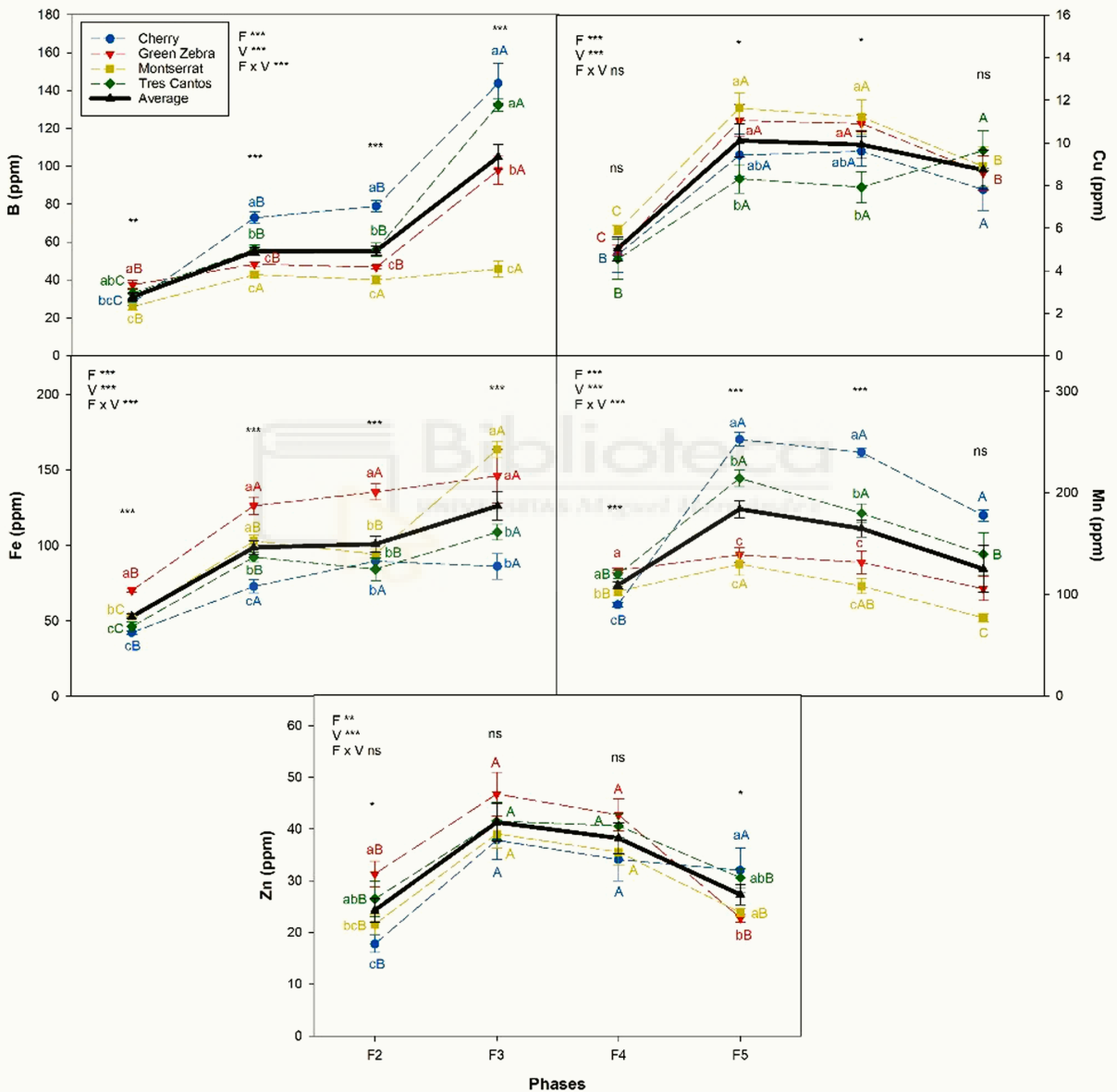


Fig. 5. Concentration of micronutrients (ppm) detected and quantified by ICP in four tomato varieties (‘Cherry’, ‘Green Zebra’, ‘Montserrat’ and ‘Tres Cantos’). The plants were grown in a greenhouse and were evaluated during the four phases of crop development: F2 (development and vegetative growth), F3 (first flowering and fruit set), F4 (fruit development) and F5 (harvest). In the ANOVA, \*\*\*, \*\*, and \* indicate significant differences at  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.05$ , respectively. Duncan’s multiple range test was used to separate the means. The different lower case letters (a, b, c, and d) indicate significant differences between varieties for each phenological phase ( $p < 0.05$ ). The different upper case letters (A, B, C, and D) indicate significant differences between the phenological phases for each of the varieties. The vertical bars indicate the standard error of the mean ( $n = 4$ ).

As for the micronutrients, two differentiated models could be observed: i) in the case of B and Fe, their concentrations in the leaves increased as the phenological phases progressed, where the maximum concentration was observed in F5 with values of 100 and 125 ppm, respectively, and ii) in the case of Mn, Zn, and Cu, the maximum concentrations reached in F2 were 108.9, 24.3 and 5.04 ppm, respectively; after that, the concentrations remained constant or decreased in the

successive phases. As for the varieties, the general trend observed was: the highest concentrations of Mn and B were observed in the variety 'Cherry', while the highest concentrations of Fe and Zn were observed in 'Green Zebra', and concentration of Cu was observed in 'Montserrat'.

### Hormones

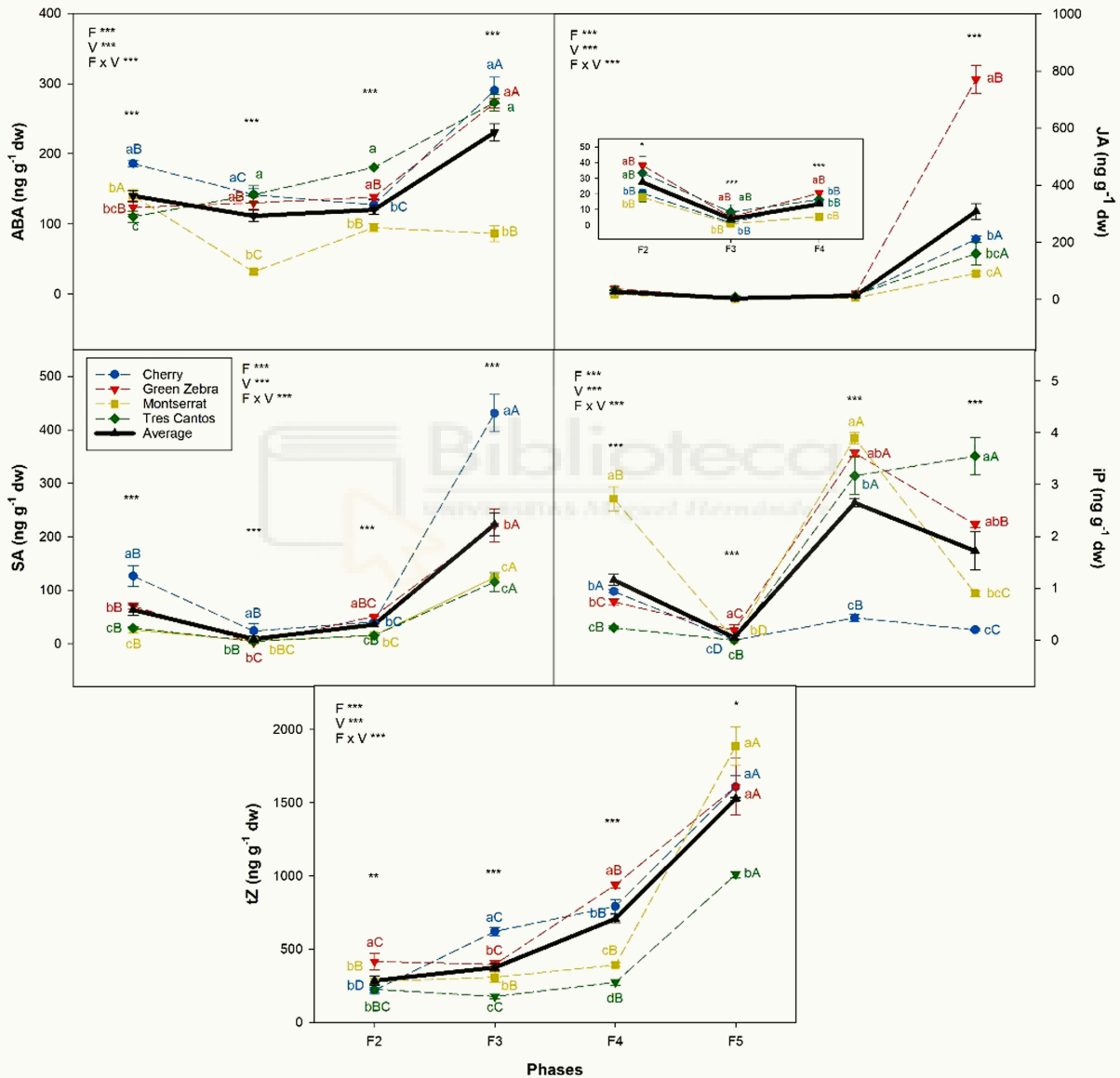


Fig. 6. Concentration of hormones ( $\text{ng g}^{-1} \text{dw}$ ; tZ=t-zenin, ABA=abscisic acid, SA=salicylic acid, JA jasmonic acid, iP= isopentenyladenine) detected and quantified by U-HPLC-MS in four tomato varieties ('Cherry', 'Green Zebra', 'Montserrat' and 'Tres Cantos'). Plants were grown in a greenhouse and were evaluated during the four phases of crop development: F2 (development and vegetative growth), F3 (first flowering and fruit set), F4 (fruit development) and F5 (harvest). In the ANOVA, \*\*\*, \*\*, and \* indicate significant differences at  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.05$ , respectively. Duncan's multiple range test was used to separate the means. The different lower case letters (a, b, c, and d) indicate significant differences between varieties for each phenological phase ( $p < 0.05$ ). The different upper case letters (A, B, C, and D) indicate significant differences between the phenological phases for each of the varieties. The vertical bars indicate the standard error of the mean ( $n = 4$ ).

### 3.6. Hormone profile of the varieties 'Cherry', 'Green Zebra', 'Montserrat' and 'Tres Cantos' in the different phenological phases

In the hormone study, the following hormones were detected and quantified: abscisic acid (ABA), jasmonic acid (JA), salicylic acid (SA), isopentenyladenine (iP), and t-zeatin (tZ). The hormone with the highest concentration was t-zeatin (250–1500 ng g<sup>-1</sup>), with isopentenyladenine observed to have the lowest concentration (1–3 ng g<sup>-1</sup>; Fig. 6). The response of the hormones during the assay was affected by the phenological phase to a greater extent, rather than by the variety, as shown in Table 3. The evolution of these hormones relative to the phenological phase can be described using three different models: i) t-zeatin progressively increased when shifting phenological phases until it reached the highest concentration of 1500 ng g<sup>-1</sup> in F5; ii) abscisic acid, salicylic acid, and jasmonic acid showed constant values during phases F2, F3, and F4, after that, the values increased in phase F5 (ABA 230.3 ng g<sup>-1</sup> dw; SA 223.0 ng g<sup>-1</sup> dw, JA 308.4 ng g<sup>-1</sup> dw, and iii) isopentenyladenine followed an inverted "Z" model, where the minimum peak was found in phase F3 (0.35 ng g<sup>-1</sup> dw), and the maximum reached in phase F4 (2.65 ng g<sup>-1</sup> dw).

As for the varieties, some differences in the concentrations of these hormones were observed. For the tZ hormone, 'Tres Cantos' obtained the lowest values as compared to the other varieties; for SA, the highest concentration was found in 'Cherry', and the lowest in 'Tres Cantos' and 'Montserrat'; for ABA, the variety 'Montserrat' had the lowest values, and its evolution throughout the phases did not follow the general behavior, as its lowest value was observed in F3 (31.8 ng g<sup>-1</sup> dw), and its highest concentration was not observed in F5; for JA, the highest concentration was observed in F5 in 'Green Zebra'; for iP, 'Cherry' did not show its highest peak in F4, but instead showed a linear behavior in its evolution with respect to the phases, 'Montserrat' showed the highest value in F2 as compared to the rest, and 'Tres Cantos' showed the highest value in F5.

## 4. Discussion

In this study, agronomic analysis of ten different tomato varieties was carried out which included the following varieties: i) traditional varieties from Alicante: 'Muchamiel', ii) traditional varieties not from Alicante: 'Corazón de Buey', 'Montserrat' and 'Tres Cantos', iii) RAF type: 'Marmande VR', iv) Hybrid: 'Optima', v) pear-type: 'Roma VF', vi) 'Cherry': Mini Bell, and vii) Other: 'Green Zebra' and 'Marglobe' (López-Malo, 2020), cultivated in a soilless system with fertigation, which allowed us to obtain a wide range of agronomical characteristics of this crop (vegetative growth, production, and fruit quality; Tables 1 and 2), as expected. Briefly summarizing the results presented above, the highest production was found in the variety 'Marglobe', with 3.26 kg plant<sup>-1</sup> and the lowest in 'Cherry', with 1.15 kg plant<sup>-1</sup>. In a previous publication that characterized the tomato genotypes, the 'Marglobe' variety was reported as the most productive with respect to the other genotypes (Yeshiwat et al., 2016). The most significant vegetative growth (leaf biomass, and stem biomass) was found in the variety 'Green Zebra', with 155 g plant<sup>-1</sup>, and the least in the variety 'Tres Cantos', with 57.1 g plant<sup>-1</sup>. The number of fruits per plant ranged from 28 for all the varieties to 237 for 'Cherry'; while the mean weight oscillated between 128 g fruit<sup>-1</sup> for 'Muchamiel' and 5 g fruit<sup>-1</sup> for 'Cherry'. The total soluble solids ranged from 6.8 ('Cherry') to 4.23 ('Muchamiel'). In general, 'Cherry' tomatoes had a 3.5°Brix of total soluble solids (Coyago-Cruz et al., 2019), but the variety utilized in our study, 'Mini Bell', is characterized by a high concentration of total soluble solids, which even exceeded the rest of the varieties. The maturity index oscillated between 13.8 in 'Corazon de Buey' and 7.06 in 'Green Zebra'. The characterization of a large number of phenotypes in specific climatic and growing conditions is vital for the development of genetic improvement programs, the selection of productive varieties that can face adverse climatic scenarios, or for the creation of harvest prediction models through

the use of statistical tools and artificial intelligence (Akinfasoye et al., 2013). In this case, we intend to use this information, together with the knowledge acquired in the ionic, metabolic and hormone studies, to select the active compounds that are most demanded by the plants in each one of their phenological phases in order to formulate new biostimulant products.

Using the agronomic data from the ten tomato varieties, we selected four tomato varieties that were the most agronomically different. For this, a statistical analysis was performed using the principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA) (Fig. 1). For PC1, the highest and most positive values were shown by 'Cherry' and 'Green Zebra', while the lowest values were shown by 'Montserrat', 'Marglobe' and 'Muchamiel'. For PC2, the highest and most positive values were shown by 'Green Zebra' and 'Montserrat', while the lowest were shown by 'Tres Cantos' and 'Roma VF'. The results of cluster analysis showed that the greatest distance of separation (upper horizontal blue line) was approximately 135. This line joins the branch that includes 'Cherry' and 'Green Zebra', and the other branch includes the rest, among which are 'Roma VF' and 'Tres Cantos'. Therefore, it was globally observed that 'Cherry' and 'Green Zebra' were different from the rest of the varieties, with 'Tres Cantos' and 'Montserrat' chosen from this latter group for the metabolomic, ionic, and hormonal study. 'Green Zebra' is a variety with a great vegetative development but with low production and low organoleptic quality. 'Cherry' is characterized as having a low production but a high fruit quality, as shown by the high TSS and phenol values; 'Montserrat' is a variety with great vegetative development and high production, with an excellent organoleptic quality (high MI due to its low acidity); and 'Tres Cantos' is a variety with low vegetative development, low production, and moderate organoleptic qualities. Melo et al. (2015) also indicated the great usefulness of performing principal component and cluster analyses to characterize and classify tomato genotypes into groups, considering their agronomic characteristics (production and harvest quality). In this case, the authors studied the varieties 'Ellus', 'BlackMauri', 'Green Zebra', 'Green Tomato', 'Pomodoro Marmande', 'Pomodoro Fiorentino', 'Pitanga', and 'Black Krim'. In addition, in our study, the results of the analysis of components of variance (Table 3) indicated that the variability of the data obtained in the omic study was due, to a greater extent, to the phenological phase as compared to the genotype. Therefore, when formulating and developing new biostimulant products, it must consider this factor, even if the varieties have different agronomic qualities. The role of each of the metabolites in the different development phases will be described below.

### 4.1. Profile of the amino acids according to phenological phases

To cover the plant requirement, as for the amino acids, the biostimulant products must be mainly formulated based on five amino acids, which are glutamate, glutamine, aspartate, tyrosine, and phenylalanine. The first three were found in high concentrations in all the phenological phases of the plants, although glutamine and aspartate were important especially in phases 3 and 4. Tyrosine and phenylalanine were more variable in the phases, being prominent in phases 2 and 5, respectively.

The first three amino acids, glutamate, glutamine, and aspartate, play key roles in physiological and metabolic processes in plants, as they intervene in the assimilation of ammonium, synchronizing it with metabolic routes related with plant nutrition, energy, photosynthesis, and responses to abiotic and biotic stresses, aside from their roles as nitrogen suppliers, and are also involved in the synthesis of the rest of the amino acids (Osuji and Madu, 2012; Han et al., 2021). Thus, the exogenous application of glutamate to the plants could increase their production, and facilitate their adaptation to adverse environmental conditions such as drought, salinity, etc. (Guo et al., 2017). The exogenous application of glutamine to onion plants increased their height, number and dry weight of the leaves, the length, diameter and weight of the bulb, as well as its agronomical performance and the quality of the

bulbs (Amin et al., 2011).

As for tyrosine, it is important for plants because it is involved in protein synthesis and it is the precursor of phenylpropanoid compounds (secondary metabolites), among which include coumarins, flavonoids, isoflavonoids, lignin, and stilbenes, which play important roles in the tolerance of plants to abiotic and biotic stresses. The exogenous application of tyrosine was tested in arugula plants by Al-Mohammad and Al-Taey (2019), who observed an increase in the production and quality of the crop, and the antioxidant capacity of the leaves. Phenylalanine is an aromatic amino acid that is synthesized by the shikimate pathway from aroenate. It is also associated with the metabolism of phenylpropanoids, which play important roles in the defense against pathogens, protection against abiotic stress, signal transduction, and communication with other organisms (Astaneh et al., 2018; Barros and Dixon, 2020).

#### 4.2. Profile of carbohydrates and organic acids in the phenological phases

Within the family of compounds associated with the pentose phosphate and tricarboxylic acid pathways, the H—NMR detected and quantified, in the different phenological phases, fructose, glucose, sucrose, malate, citric acid, fumarate, and formate. In all the phenological phases studied, we found out that the major sugar was fructose, with the concentrations of glucose and sucrose similar to each other, reaching their maximum concentrations in the F4 phase. However, Zhang et al. (2020) observed a different pattern in the accumulation of sugars in the leaves of other tomato varieties, such as '606' and '112', where the concentration followed a decreasing order: sucrose > glucose > fructose. These sugars are important in plants because they act as substrates in the metabolic routes associated with fixing CO<sub>2</sub>, and the transport of carbon and energy to the sink organs (Hennion et al., 2019). In our study, we observed that in most of the varieties, a drastic decrease took place in the concentration of sugars when shifting from phenological phase F4 to F5, as the fruits demanded a great quantity of sugars during their maturation phase (Agius et al., 2018).

The H—NMR analysis also detected the organic acids malate, citrate, fumarate, and formate. The first three compounds participate in the Krebs cycle, or tricarboxylic acid cycle, and the last one in the glycolic acid route (Igamberdiev and Eprintsev, 2016). For the organic acids from the Krebs cycle, the most abundant was malate followed by citrate, reaching their highest concentrations in F3 and F1, respectively. Malate, in many plants, is the most-accumulated acid and plays many functions in plant cells, one of which is its role as an osmolyte and an anion, which compensates the positive charge of potassium, being particularly important in the regulation of stomata (Maurino and Engqvist, 2015). These data coincide with the results observed in seedlings from the tomato varieties '606' and '112' (Zhang et al., 2020).

#### 4.3. Characterization of mineral nutrition in the phenological phases

The ICP analysis detected and quantified the macronutrients Ca, K, Mg, and P, and the micronutrients B, Cu, Fe, Mn, and Zn. Nitrogen was analyzed with a C/N analyzer. The concentrations of these nutrients were highly variable with respect to the phenological phases, and this should be considered when formulating and applying biostimulant products. In general, the nutritional requirement of tomato crops follow the order N=Ca>K > Mg < P < Fe=Mn < B = Zn < Cu. Considering the assessment of the phenological phases, the plants showed a great need for P in phase F3, as it is in this phase that flowering occurs, and this nutrient plays a fundamental role in this process (van de Wiel et al., 2016). Ali et al. (2020) observed that the foliar application of P improved the development of flower buds. Also, high concentrations of Cu, Mn and Zn were detected in this phase because they are involved in the growth and development of plants (Alejandro et al., 2020).

In phase F4, fruit development, the highest concentrations of K, Mg, and N were observed, as these nutrients are directly associated to fruit

set and the development of tomato fruits (Bodale et al., 2021). Also, N is highly important during all the growth phases, as it provides support for the plants, promotes vegetative development, and stimulates root growth (Ding et al., 2018).

In the fruit maturation phase, F5, the greatest nutritional requirements were Ca and B, all of which are essential nutrients in the development of vegetative tissue and tomato fruits as well (Sakya and Sulandjari, 2019; Sajid et al., 2020). In fact, a low quality Ca fertilization can lead to the appearance of the physiological disease known as BER (Vinh et al., 2018).

#### 4.4. Hormone profile

The U-HPLC-MS detected and quantified the hormones trans-Zeatin (tZ), isopentenyladenine (iP), abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA), and jasmonic acid (JA). The results obtained show that the highest concentrations were found in phase F5 (fruit development). This could be due to the fact that hormones tZ, ABA, JA, and SA are responsible for regulating the development and maturation of the fruits (Fig. 6; Khew et al., 2020). It is known that plant hormones play an important role in the growth, development and cellular differentiation of many crops (Wilkinson et al., 2012; Zhang and Huang, 2013), although not many studies have characterized the hormone profile in each of the phenological phases of tomato crops, and therefore this information could be useful in the formulation of new biostimulant products. Of the two cytokinins detected, isopentenyladenine (iP) and trans-zeatin (tZ), the first was found in a higher concentration. Cytokinins are plant hormones that play important roles in many physiological and developmental processes in plants, such as the regulation of the growth of shoots and roots, leaf senescence, development of chloroplasts, responses to stress, and resistance to pathogens (Giron et al., 2013).

#### 5. Conclusion

In this work, four tomato genotypes with very different agronomic characteristics such as 'Green Zebra', 'Cherry', 'Montserrat' and 'Tres Cantos' were analyzed to characterize their ionic, metabolic and hormonal profiles in their different phenological stages. These studies revealed that the greatest variability in the ionomics study occurred among the phenological phases and a less variability can be explained by the genotypes. Of the major compounds in the ionomics study, N stood out, followed by K and P. In the metabolomic study, amino acids, compounds of the pentose phosphate and tricarboxylic acids pathway, were detected and quantified, the majority being Glu, Gln, Asp, Tyr, Phe, sucrose and malate; while the main hormone was isopentenyladenine (iP). Therefore, biostimulant products to apply in tomato crops should contain these compounds for stimulating growth and production.

#### Credit author statement

**Marina Alfosea-Simón:** Investigation, Conceptualization, Software, Data curation, Writing. **Silvia Simón-Grao:** Methodology, Writing. **Ernesto A. Zavala-Gonzalez:** Data curation, Software. **Iván Navarro:** Data curation, Software. **Juan J. Martínez-Nicolás:** Data curation, Investigation. **Francisco J. Alfosea-Simón:** Methodology, Software. **Inmaculada Simón:** Conceptualization, Writing, Investigation, Resource. **Francisco García-Sánchez:** Term, Conceptualization, Writing, Supervision, Project administration

#### Declaration of Competing Interest

This statement is to confirm that the co-authors of the manuscript: "Ionomic, metabolic and hormonal characterization of the phenological phases of different tomato genotypes through the use of ICP, H—NMR, and U-HPLC-MS" Marina Alfosea-Simón, Silvia Simón-Grao, Ernesto A. Zavala-Gonzalez, Iván Navarro, Juan J. Martínez-Nicolás, Francisco J.



Alfósea-Simón, Inmaculada Simón, and Francisco García-Sánchez have no interests to declare.

## Acknowledgments

This research was funded by State R&D Program Oriented to the Challenges of the Society, Innovation and Science Ministerial (Spain Government), grant number RTC-2016-4568-2. We acknowledge the support of the publication fee by the CSIC Open Access Publication Support Initiative through its Unit of Information Resources for Research (URICI).

## References

- Agius, C., von Tucher, S., Poppenberger, B., Rozhon, W., 2018. Quantification of glutamate and aspartate by ultra-high-performance liquid chromatography. *Molecules* 23 (6), 1389. <https://doi.org/10.3390/molecules23061389>.
- Akinfasoye, J.A., Ogunniyan, D.J., Ajayi, E.O., 2013. Agronomic performance of rain-fed and irrigated commercial tomato hybrids. *Int. J. Veg. Sci.* 19 (1), 26–33. <https://doi.org/10.1080/19315260.2012.665430>.
- Albacete, A., Ghanem, M.E., Martínez-Andújar, C., Acosta, M., Sánchez-Bravo, J., Martínez, V., et al., 2008. Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *J. Exp. Bot.* 59 (15), 4119–4131. <https://doi-org-publicaciones.umh.es/10.1093/jxb/ern251>.
- Alejandro, S., Höller, S., Meier, B., Peiter, E., 2020. Manganese in plants: from acquisition to subcellular allocation. *Front. Plant Sci.* 11, 300. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00300>.
- Alfósea-Simón, M., Simón-Grao, S., Zavala-Gonzalez, E.A., Cámara-Zapata, J.M., Simón, I., Martínez-Nicolás, J.J., et al., 2020. Application of biostimulants containing amino acids to tomatoes could favor sustainable cultivation: implications for tyrosine, lysine, and methionine. *Sustainability* 12 (22), 9729. <https://doi.org/10.3390/su12229729>.
- Alfósea-Simón, M., Simón-Grao, S., Zavala-Gonzalez, E.A., Cámara-Zapata, J.M., Simón, I., Martínez-Nicolás, J.J., et al., 2021. Physiological, nutritional and metabolomic responses of tomato plants after the foliar application of amino acids aspartic acid, glutamic acid and alanine. *Front. Plant Sci.* 11, 581234. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.581234>.
- Ali, H., Ahniad, A., Hussain, S., 2020. The effect of exogenous phosphorus application on growth, yield, quality and net returns of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Appl. Ecol. Environ. Res* 18 (1), 769–781. [https://doi.org/10.15666/aer/1801\\_769781](https://doi.org/10.15666/aer/1801_769781).
- Al-Mohammad, M.H., Al-Taey, D.K., 2019. Effect of tyrosine and sulfur on growth, yield and antioxidant compounds in arugula leaves and seeds. *Res. Crops* 20 (1), 116–120. <https://doi.org/10.31830/2348-7542.2019.016>.
- Amin, A.A., Gharib, F.A., El-Awadi, M., Rashad, E.S.M., 2011. Physiological response of onion plants to foliar application of putrescine and glutamine. *Sci. Hort.* 129 (3), 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.03.052>.
- AOAC, 1984. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 14th ed. Washington, DC.
- Astaneh, R.K., Bolandnazar, S., Nahandi, F.Z., Oustan, S., 2018. Effect of selenium application on phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, phenol leakage and total phenolic content in garlic (*Allium sativum* L.) under NaCl stress. *Inf. Process. Agric.* 5 (3), 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.inpa.2018.04.004>.
- Barros, J., Dixon, R.A., 2020. Plant phenylalanine/tyrosine ammonia-lyases. *Trends Plant Sci.* 25 (1), 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.09.011>.
- Batista-Silva, W., Nascimento, V.L., Medeiros, D.B., Nunes-Nesi, A., Ribeiro, D.M., Zsögön, A., et al., 2018. Modifications in organic acid profiles during fruit development and ripening: correlation or causation? *Front. Plant Sci.* 9, 1689. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01689>.
- Bodale, I., Mihalache, G., Achítei, V., Teliban, G.C., Cazacu, A., Stoleru, V., 2021. Evaluation of the Nutrients Uptake by Tomato Plants in Different Phenological Stages Using an Electrical Conductivity Technique. *Agriculture* 11 (4), 292. <https://doi.org/10.3390/agriculture1104029>.
- Coyago-Cruz, E., Corell, M., Moriana, A., Mapelli-Brahm, P., Hernanz, D., Stinco, C.M., et al., 2019. Study of commercial quality parameters, sugars, phenolics, carotenoids and plastids in different tomato varieties. *Food Chem.* 277, 480–489. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.139>.
- De Saeger, J., Van Praet, S., Vereecke, D., Park, J., Jacques, S., Han, T., et al., 2020. Toward the molecular understanding of the action mechanism of *Ascophyllum nodosum* extracts on plants. *J. Appl. Phycol.* 32 (1), 573–597. <https://doi.org-publicaciones.umh.es/10.1007/s10811-019-01903-9>.
- Ding, L., Lu, Z., Gao, L., Guo, S., Shen, Q., 2018. Is nitrogen a key determinant of water transport and photosynthesis in higher plants upon drought stress? *Front. Plant Sci.* 9, 1143. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01143>.
- EU regulation 2019/1009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 5 de junio de 2020. <https://www.boe.es/doue/2019/170/L00001-00114.pdf>.
- FAO (Food and Agriculture Organization), 2020. Datos sobre alimentación en agricultura. <http://www.fao.org/taostat/en/#home>.
- Ghani, M.A., Abbas, M.M., Amja, M., Zia, K., Ali, B., Shaheen, T., et al., 2020. Production and characterisation of tomato derived from interspecific hybridisation between cultivated tomato and its wild relatives. *J. Hort. Sci. Biotech.* 95 (4), 506–520. <https://doi.org/10.1080/14620316.2019.1689182>.
- Gholami, F., Antonio, J., Evans, C., Cheraghi, K., Rahmani, L., Amirzad, F., 2021. Tomato powder is more effective than lycopene to alleviate exercise-induced lipid peroxidation in well-trained male athletes: randomized, double-blinded cross-over study. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 18 (1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12970-021-00415-7>.
- Giron, D., Frago, E., Glevarec, G., Pieterse, C.M., Dicke, M., 2013. Cytokins as key regulators in plant-microbe-insect interactions: connecting plant growth and defence. *Funct. Ecol.* 27 (3), 599–609. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12042>.
- Guo, Z., Yang, N., Zhu, C., Gan, L., 2017. Exogenously applied poly- $\gamma$ -glutamic acid alleviates salt stress in wheat seedlings by modulating ion balance and the antioxidant system. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (7), 6592–6598. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8295-4>.
- Han, M., Zhang, C., Suglo, P., Sun, S., Wang, M., Su, T., 2021. L-Aspartate: an essential metabolite for plant growth and stress acclimation. *Molecules* 26 (7), 1887. <https://doi.org/10.3390/molecules26071887>.
- Hennin, N., Durand, M., Vriët, C., Doidy, J., Mauroussat, L., Lemoine, R., Pourtau, N., 2019. Sugars en route to the roots. Transport, metabolism and storage within plant roots and towards microorganisms of the rhizosphere. *Physiol. Plant.* 165 (1), 44–57. <https://doi.org/10.1111/pp1.12751>.
- Igamberdiev, A.U., Eprintsev, A.T., 2016. Organic acids: the pools of fixed carbon involved in redox regulation and energy balance in higher plants. *Front. Plant Sci.* 7, 1042. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01042>.
- Irani, H., ValizadehKaji, B., Naeini, M.R., 2021. Biostimulant-induced drought tolerance in grapevine is associated with physiological and biochemical changes. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 8 (1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40538-020-00200-9>.
- Khew, C.Y., Mori, I.C., Matsuura, T., Hirayama, T., Harikrishna, J.A., Lau, E.T., et al., 2020. Hormonal and transcriptional analyses of fruit development and ripening in different varieties of black pepper (*Piper nigrum*). *J. Plant Res.* 133 (1), 73–94. <https://doi.org/10.1007/s10265-019-01156-0>.
- Krishna, R., Karkute, S.G., Ansari, W.A., Jaiswal, D.K., Verma, J.P., Singh, M., 2019. Transgenic tomatoes for abiotic stress tolerance: status and way ahead. *3 Biotech*, 9 (4), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1665-0>.
- Lee, H.J., Jayaprakasha, G.K., Avila, C.A., Crosby, K.M., Patil, B.S., 2019. Metabolomic studies of volatiles from tomatoes grown in net-house and open-field conditions. *Food. Chem.* 275, 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.091>.
- López-Malo, T., 2020. Cultivo y Conservación De Variedades Tradicionales De Tomate En La Provincia De Alicante. Trabajo fin De Grado Para Optar El Título De Grado En Biología. Universidad de Alicante. Facultad de ciencias.
- Maurino, V.G., Engqvist, M.K., 2015. 2-Hydroxy acids in plant metabolism. *Arabidopsis Book* 13:e0182. <https://doi.org/10.1199/tab.0182>.
- Melo, A.P.C.D., Fernandes, P.M., Venturoli, F., Silva-Neto, C.D.M., Rubio Neto, A., 2015. Morphoagronomic characterization of tomato plants and fruit: a multivariate approach. *Adv. Agric.* 2015 1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/572321>.
- Osuji, G.O., Madu, W.C., 2012. Using the RNA synthetic activity of glutamate hydrogenase to illuminate the natural role of the enzyme. *Adv. Biol. Chem.* 2, 379–389. <https://doi.org/10.4236/abc.2012.24047>.
- Quinet, M., Angosto, T., Yuste-Lisbona, F.J., Blanchard-Gros, R., Bigot, S., Martínez, J.P., et al., 2019. Tomato Fruit Development and Metabolism. *Front. Plant Sci.* 10, 1554. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01554>.
- Rouphael, Y., Colla, G., 2020. Editorial: biostimulants in Agriculture. *Front. Plant Sci.* 11, 40. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00040>.
- Sajid, M., Ullah, I., Rab, A., Shah, S.T., Basit, A., Bibi, F., Ahmad, M., 2020. 2. Foliar application of calcium improves growth, yield and quality of tomato cultivars. *PAB* 9 (1), 10–19. <https://doi.org/10.19045/bspb.2020.90002>.
- Sakya, A.T., Sulandjari, 2019. Foliar iron application on growth and yield of tomato. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 250, 012001. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/250/1/012001>.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
- Van der Sar, S., Kim, H.K., Meissner, A., Verpoorte, R., Choi, Y.H., 2013. Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy for plant metabolite profiling. *The Handbook of Plant Metabolomics*. W. Weckwerth and G. Kahl, pp. 57–76. <https://doi.org/10.1002/9783527669882.ch3>.
- van de Wiel, C.C., van der Linden, C.G., Scholten, O.E., 2016. Improving phosphorus use efficiency in agriculture: opportunities for breeding. *Euphytica* 207 (1), 1–22. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1572-3>.
- Vinh, T.D., Yoshida, Y., Ooyama, M., Goto, T., Yasuba, K.I., Tanaka, Y., 2018. Comparative analysis on blossom-end rot incidence in two tomato cultivars in relation to calcium nutrition and fruit growth. *Hort. J.* 87 (1), 97–105. <https://doi.org/10.2503/hortj.OKD-114>.
- Wilkinson, S., Kudoyarova, G.R., Veselov, D.S., Arkhipova, T.N., Davies, W.J., 2012. Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management. *J. Exp. Bot.* 63 (9), 3499–3509. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers148>.
- Yeshiwas, Y., Belew, D., Tolessa, K., 2016. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) yield and fruit quality attributes as affected by varieties and growth conditions. *World J. Agric. Sci.* 12 (6), 404–408. <https://doi.org/10.5829/idosi.wjas.2016.404.408>.
- Zhang, C., Huang, Z., 2013. Effects of endogenous abscisic acid, jasmonic acid, polyamines, and polyamine oxidase activity in tomato seedlings under drought stress. *Sci. Hort.* 159, 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.013>.
- Zhang, Z., Liu, Y., Cao, B., Chen, Z., Xu, K., 2020. The effectiveness of grafting to improve drought tolerance in tomato. *Plant Growth Regul.* 91 (1), 157–167. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00596-2>.

## 7.2. Publicación 02

### Título

Physiological, nutritional and metabolomic responses of tomato plants after the foliar application of amino acids aspartic acid, glutamic acid and alanine

### Autores

Alfosea-Simón, M., Simón-Grao, S., Zavala-González, E.A., Cámara-Zapata, J.M., Simón, I., Martínez-Nicolás, J.J., Lidón, V., y García-Sánchez, F.

### Revista

*Frontiers in Plant Science*, 11, 581234.

### Categoría JCR

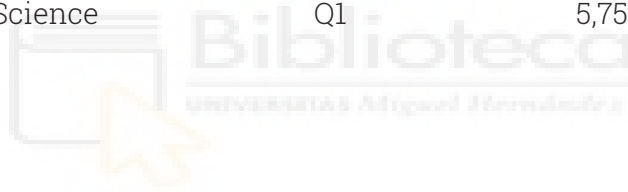
Plant Science

### Categoría de cuartil

Q1

### Factor de impacto

5,753 (2020)





# Physiological, Nutritional and Metabolomic Responses of Tomato Plants After the Foliar Application of Amino Acids Aspartic Acid, Glutamic Acid and Alanine

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Sakiko Okumoto,  
Texas A&M University, United States

### Reviewed by:

Guillaume Pilot,  
Virginia Tech, United States  
Luigi Lucini,  
Catholic University of the Sacred  
Heart, Italy  
Hiroshi Ezura,  
University of Tsukuba, Japan

### \*Correspondence:

Francisco García-Sánchez  
fgs@cebas.csic.es

### Specialty section:

This article was submitted to  
Plant Physiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Plant Science

Received: 08 July 2020

Accepted: 07 December 2020

Published: 07 January 2021

### Citation:

Alfosea-Simón M, Simón-Grao S,  
Zavala-Gonzalez EA,  
Cámara-Zapata JM, Simón I,  
Martínez-Nicolás JJ, Lidón V and  
García-Sánchez F (2021)  
Physiological, Nutritional  
and Metabolomic Responses  
of Tomato Plants After the Foliar  
Application of Amino Acids Aspartic  
Acid, Glutamic Acid and Alanine.  
Front. Plant Sci. 11:581234.  
doi: 10.3389/fpls.2020.581234

Marina Alfosea-Simón<sup>1</sup>, Silvia Simón-Grao<sup>1,2</sup>, Ernesto Alejandro Zavala-Gonzalez<sup>3</sup>,  
Jose Maria Cámara-Zapata<sup>1</sup>, Inmaculada Simón<sup>1</sup>, Juan José Martínez-Nicolás<sup>1</sup>,  
Vicente Lidón<sup>1</sup> and Francisco García-Sánchez<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández, Orihuela, Spain, <sup>2</sup> Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Murcia, Spain, <sup>3</sup> Investigador Asociado al Departamento I+D Atlántica Agrícola, Villena, Spain

Agriculture is facing a great number of different pressures due to the increase in population and the greater amount of food it demands, the environmental impact due to the excessive use of conventional fertilizers, and climate change, which subjects the crops to extreme environmental conditions. One of the solutions to these problems could be the use of biostimulant products that are rich in amino acids (AAs), which substitute and/or complement conventional fertilizers and help plants adapt to climate change. To formulate these products, it is first necessary to understand the role of the application of AAs (individually or as a mixture) in the physiological and metabolic processes of crops. For this, research was conducted to assess the effects of the application of different amino acids (Aspartic acid (Asp), Glutamic acid (Glu), L-Alanine (Ala) and their mixtures Asp + Glu and Asp + Glu + Ala on tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). To understand the effect of these treatments, morphological, physiological, ionic and metabolomic studies were performed. The results showed that the application of Asp + Glu increased the growth of the plants, while those plants that received Ala had a decreased dry biomass of the shoots. The greatest increase in the growth of the plants with Asp + Glu was related with the increase in the net CO<sub>2</sub> assimilation, the increase of proline, isoleucine and glucose with respect to the rest of the treatments. These data allow us to conclude that there is a synergistic effect between Aspartic acid and Glutamic acid, and the amino acid Alanine produces phytotoxicity when applied at 15 mM. The application of this amino acid altered the synthesis of proline and the pentose-phosphate route, and increased GABA and trigonelline.

**Keywords:** metabolites, nutrients, minerals, gas exchange parameters, <sup>1</sup>H-NMR, organic acids, sugars

## INTRODUCTION

The tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most-consumed and demanded crops worldwide due to its great nutritional and antioxidant properties. This high demand makes it one of the most important crops at the social and economic levels. In agreement with the statistics from the Food and Agriculture Organization [FAO] (2020), more than 180 million tons of tomato have been grown in the past year worldwide, of which 24 million come from Europe. Spain is the second-most important producer in Europe, with an approximate production of 5 million tons per year.

Due to the increase in the world's population since the industrial revolution, the performance of the crops has had to increase fast and exponentially to provide and answer to the demand for food; however, in the past few years, the production and quality of the harvest of various crops, among which we find tomatoes, have been greatly affected as a result of climate change. The high temperatures and periods of drought, which have become more intense and prolonged, have affected crop production (Wallace et al., 2003; Parry, 2019; Mutale-Joan et al., 2020). Aside from the challenge faced by agriculture for increasing production in an era of climate change, we also find another important challenge, such as the practice of sustainable agriculture that affects the environment the least. Thus, at present, new agronomic strategies are being designed and evaluated, which could help take on these challenges, starting with the acquisition of basic scientific knowledge about the physiological and metabolic processes of crops. As an alternative to conventional agronomic strategies, such as the application of synthetic inorganic fertilizers, which could have damaging effects on the environment, other more ecological alternatives are being adopted (Foley et al., 2011; Tilman et al., 2002; Mutale-Joan et al., 2020). Among these new agronomic strategies, we find the use of biostimulants (Lucini et al., 2015). It has been observed that the use of these products significantly improves the performance of crops, as they have beneficial effects on the physiological processes of plants, such as the absorption of water and nutrients, among others (Mutale-Joan et al., 2020).

Biostimulants are composed of bioactive compounds such as humic acids, hydrolyzed proteins, seaweed and microorganism extracts, among others (Rouphael et al., 2018). The hydrolyzed proteins and seaweed extracts are a rich source of amino acids, and these compounds tend to be added freely to enrich the biostimulant products, as they have very beneficial effects on the crops due to their role in the synthesis of proteins, vitamins, nucleotides and alkaloids, aside from having effects as elicitors (Khan et al., 2019). Some of the most important effects described in the past few years are: (i) they palliate the negative impact of certain environmental stresses such as drought (L-methionine in bitter melon, *Momordica charantia* L.; Akram et al., 2020), salinity (mixture of amino acids in tomato plants; Tantawy et al., 2009), Cd toxicity (Glutamate in rice; Jiang et al., 2020), (ii) they induce hormonal responses and improve the absorption of nitrogen (mixture of amino acids and polypeptides in tomato, corn and peas; Colla et al., 2014), (iii) they regulate the antioxidant metabolism

(Glutamate, Cysteine, Phenylalanine, Glycine in soy Teixeira et al., 2017).

Despite the fact that as of today no doubts exist about the positive effects of the application of amino acids, as mentioned above, little is known about the role played by each of these amino acids on the physiological and metabolic processes of plants. On many occasions, the biostimulant products are formulated from the chemical hydrolysis of raw materials rich in amino acids (residues from the agro-food industry), but there is a lack of knowledge on their amino acid profile or what specific function they play in crops. Also, the application of biostimulant products rich in amino acids can vary depending on the species, cultivar, climate, dose used, origin and application time (Paradiković et al., 2019). Therefore, to create highly efficient biostimulant products, it is indispensable to understand what role the different amino acids play on the physiological and metabolic processes of crops, and the possible antagonistic, neutral and synergistic effects between them.

Amino acids such as Glutamic acid, Aspartic acid and Alanine are three of the amino acids used in the formulation of biostimulant products (Colla et al., 2015). These are added in their free form or as part of the raw materials from hydrolyzed proteins. **Glutamic acid** is important in the metabolism of nitrogen, as it intervenes in the assimilation of nitrogen in plants and in the reactions of amino transferases (Lea and Ireland, 1999; Cao et al., 2010). This amino acid, aside from its intrinsic value as an amino acid itself, is the precursor of other amino acids such as Aspartic acid, Serine, Alanine, Lysine and Proline, among others. **Alanine** is synthesized from Glutamic acid, and its transamination with oxoglutarate produces glutamate and pyruvate, a reversible reaction, granting this amino acid a dual function between carbon and nitrogen metabolism (Kendziorek et al., 2012). Lastly, this amino acid is linked with the synthesis of chlorophylls and photosynthetic activity (Sánchez-Pale, 2017). **Aspartic acid** is obtained from a transamination reaction between glutamate and oxaloacetate in plants, and is metabolized to produce the amino acids lysine, threonine, methionine, and isoleucine, in a series of reactions known as the Aspartic acid metabolic pathway. The application of these three amino acids to plants helps them to endure adverse environmental conditions such as drought, salinity and heavy metal toxicity (Rai, 2002). However, up to the present, the effects of the individual application of these amino acids on the physiology and the primary metabolism of plants, or the antagonistic or synergistic effects that could result from the mixture of amino acids, are unknown. This knowledge could be essential when designing biostimulants that contain amino acids, or even when selecting the raw materials for which the profile of amino acids is better adapted to the requirements of a specific crop. For this, the objectives of the study were to understand the effects of the application of the amino acids Glutamic acid, Aspartic acid and Alanine, applied individually or as a mixture, on the physiological and metabolic processes, and the nutritional state of tomato plants of the 'Optima' variety; and to discover if these changes stimulate the vegetative growth of the plants. To characterize the metabolic state of the plants, the <sup>1</sup>H-NMR omics technique was utilized, as it



allows analyzing a great quantity of primary metabolites in a fast and simple manner.

## MATERIALS AND METHODS

### Growth Conditions and Plant Material

The experiment was performed on tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) of the 'Optima' variety, obtained from a commercial seedling nursery (Babyplant S.L., Santomera, Murcia, Spain), and planted in a tunnel greenhouse in an experimental field from the CEBAS-CSIC, located in the municipality of Santomera (18 Km from Murcia, Spain). The climatic conditions in the interior of the greenhouse were: temperature day/night  $32/19 \pm 3^\circ\text{C}$ , photosynthetically active radiation (PAR) of  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , relative humidity of  $52/80 \pm 5\%$  and a 15 h photoperiod.

The tomato seedlings, selected according to height and the number of completely developed true leaves, were transplanted to 3.5 L pots with a fine-grained "Universal" substrate, free of pathogens and weed seeds, composed of yellow and black peat, coconut fiber and perlite, in a ratio of 5:4:1 (Projar professional, 2018, Spain) The irrigation was applied through of dripper system of rate of  $4 \text{ L h}^{-1}$ .

With regards to fertigation management, Hoagland's nutrient solution, composed of  $\text{KNO}_3$  ( $27 \text{ g } 100 \text{ L}^{-1}$ ),  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  ( $42 \text{ g } 100 \text{ L}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $7 \text{ g } 100 \text{ L}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4$  ( $13 \text{ g } 100 \text{ L}^{-1}$ ), Fe-EDTA ( $1 \text{ g } 100 \text{ L}^{-1}$ ), and micronutrients ( $1 \text{ g } 100 \text{ L}^{-1}$ ; Hidromix S, Valagro) was used in the irrigation. During the first week after the transplantation, plants were irrigated with 50% Hoagland solution one minute per day. After this week, plants were irrigated with 100% Hoagland solution two times per day, 5 min during the morning and 5 min during the afternoon. The tap water utilized for the preparation of the nutrient solution came from Tajo-Segura water transfer, with an electrical conductivity (EC) of  $0.9 \text{ dS m}^{-1}$  and pH of 8.2. When drainage in every irrigation event was less than 15% irrigation time was increased.

### Amino Acids Utilized and Preparation

The AAs utilized for the assays were Glutamic acid (Glu), Aspartic acid (Asp) and Alanine (L-Ala) from Caldic Ibérica (Barcelona, Spain). The selection of these three AAs and its doses was made according to previous experiments within the framework of project RTC-2016-4568-2 carried out at the CEBAS-CSIC. The aim of this project was to study every one of the 22 amino acids in different doses and mixtures in tomato plants. For each individual amino acid, a stock solution was first prepared with a final concentration of 7%. For this, 7 g of each amino acid were added to 100 mL of ultrapure water; in the case of Glutamic acid and Aspartic acid, drops of 50% KOH were added to facilitate their dilution in water. After the preparation of the individual AAs (7%), the following treatments were prepared: 15 mM Aspartic acid (Asp), 15 mM Glutamic acid (Glu), 15 mM Alanine (Ala), 15 mM Aspartic acid + 15 mM Glutamic acid (Asp + Glu) and 15 mM Aspartic acid + 15 mM Glutamic acid + 15 mM Alanine (Asp + Glu + Ala). For each formulation, before their application, Tween-20 was added to a concentration of 0.1% (a surfactant compound that improves

the adherence of the formulation to the leaves), and the pH was adjusted to be 5.5 to 6.5. Therefore, the treatments applied were: (1) Control treatment (without AAs, in which only ultrapure water was pulverized on the tomato plants); and treatments with the foliar application of the amino acids: (2) Asp, (3) Glu, (4) L-Ala, (5) Asp + Glu, and (6) Asp + Glu + L-Ala. For each of the treatments, the concentrations of the equivalent nitrogen ( $\text{mg L}^{-1}$ ) were: Asp 0.22, Glu 0.20, L-Ala 0.33, Asp + Glu 0.42, and Asp + Glu + L-Ala 0.75.

### Application of the Treatments

The application of the treatments was performed foliarly, and was done after two weeks of acclimation of the tomato plants. Each treatment was pulverized on the aerial part of the plants, so that the greatest foliar area was covered with the preparation. Within the greenhouse, the plants were divided into four blocks, and within each block, the treatments were applied to four plants, which were considered as an experimental unit.

### Gas Exchange Parameters

After a week of treatment the following parameters were measured: the net  $\text{CO}_2$  assimilation rate ( $A_{\text{CO}_2}$ ), stomatal conductance ( $g_s$ ), the water use efficiency ( $\text{WUE} = A_{\text{CO}_2}/E_{\text{leaf}}$ , where  $E_{\text{leaf}}$  corresponds to the value of leaf transpiration obtained in each measurement), and the Ci/Ca ratio (where Ci corresponds to the substomatal  $\text{CO}_2$  and Ca corresponds to external  $\text{CO}_2$ ). These parameters were measured in two plants per treatment and block, in leaves that were completely developed and healthy, in the morning (8:30am - 11:00am, using a portable gas analyzer for the measurement of gas exchange parameters (PP System Ciras2, United Kingdom). During the measurements, the equipment was configured to maintain constant light (PAR:  $1200 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) and  $\text{CO}_2$  concentration (400 ppm) in the measurement chamber.

### Chlorophyll Fluorescence and Concentration Parameters

The chlorophyll fluorescence parameters were measured in the same plants utilized for the gas exchange measurements, utilizing a portable pulse-modulated fluorometer FMS-2 (Hansatech Instruments Ltd., United Kingdom). The chlorophyll fluorescence parameters measured were: the quantum efficiency of PSII, ( $\Phi\text{PSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$ ); the antennae efficiency of PSII,  $F_v'/F_m' = (F_m' - F_0')/F_m'$ ; and the photochemical quenching co-efficient,  $qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0')$ , where  $F_s$  is the steady-state fluorescence yield,  $F_m'$  is the maximal value when all reaction centers are closed after a pulse of saturating light ( $12,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  for 0.8 s), and  $F_0'$  is the minimal fluorescence in the light-adapted state that is obtained by turning off the actinic light temporarily and applying a pulse of far-red light (735 nm) to drain the electrons from PSII. The chlorophylls were also measured with a portable meter CL-01 (SPAD units- Hansatech).

### Growth Parameters

After the gas exchange and chlorophyll fluorescence measurements, the following measurements were taken: height and diameter of the stem at three different points in all

the plants. Also, the number of flowers of each plant and the percent of open flowers, after which the plants were harvested. In this sampling, the shoots of the plants were measured with a precision Sartorius scale (Acculab), after which they were dried in an oven at 60°C for at least 48 h (g dw shoot). From the shoots, eight leaflets were collected from each plant, which were washed with de-ionized water; four of them were dry-processed for the nutritional study, and the other four were processed fresh for the metabolomics study. The leaflets samples were taken from leaves that were completely developed, located mid-height of the plant.

## Determination of the Mineral Nutrients Concentration in Leaf Tissue

For the nutritional study, the previously dried and ground samples were analyzed. The concentration of Na, K, Mg, Ca, P, S, Fe, Cu, Mn, Zn and B was analyzed with inductively coupled plasma spectrometry (Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, Franklin, United States), after digestion with HNO<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5:3 by volume), utilizing a microwave (CERM Mars Xpress, North Carolina, United States) with a temperature ramp that reached 200°C in 20 min, and maintaining this temperature for 2 h. The total N and C was measured with a C/N elemental analyzer Thermo Finnigan (Milan, Italy).

## Metabolic Analysis of Leaf Tissue

A “non-targeted” metabolic analysis was conducted in the fresh leaf samples. These samples were ground with liquid nitrogen with a mortar and pestle and lyophilized. Afterwards, the samples were prepared for analysis according with the protocol by Van der Sar et al. (2013). For this analysis, a Nuclear Magnetic Resonance (NMR) system coupled to a 500 MHz Bruker spectrometer (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) equipped with a broadband 5 mm N<sub>2</sub> CryoProbe Prodigy BBO. All the tomato leaf extracts were measured at 300.1 ± 0.1 K without rotation and with 4 test scans before the 32 scans performed for the experiment.

The acquisition parameters were set in the following manner: the size of the FID = 64K, spectral band = 12.4345 ppm, receiver gain = 28.5, acquisition time = 2.18 s, relaxation delay = 2s, and line broadening = 0.50 Hz. The acquisition of data was performed through the NOESY pulse sequence of pre-saturation (Bruker 1D, noesypr1d) with water suppression through the irradiation of the water frequency during the recycling and mixing times. In the procession of the samples and for each spectrum separately, a reduction of noise is produced, based on the deconvolution of the multi-level signal. Afterwards, a correction is performed of the baseline, and to complete the process, an interpolation technique of the areas of the signal is utilized.

All of this provides us with a “fingerprint” of the sample, a general view of the metabolites that are most represented produced by the cells at time of harvest, expressing the chemical shifts ( $\delta$ ) in parts per million (ppm). The NMR equipment detects the signals and records them as frequency vs intensity graphic, known as the “acquisition spectrum”.

The resulting <sup>1</sup>H-NMR spectra were processed with the Chenomx NMR Suite program version 8.3 (Chenomx, Edmonton, Canada), in order to identify and quantify the metabolites of interest. All the samples were calibrated with the signal from the internal standard (IS), the deuterated Trimethylsilylpropionic acid sodium salt (TSP-d<sub>4</sub>) and the pH was set to a value of around 6. The software utilized includes a broad range of spectrum data which can be utilized to detect the metabolites that are over 5–10  $\mu$ M: among the metabolites that were found and/or quantified, the following are highlighted: Aspartate, Glutamate, Alanine, Glutamine, Isoleucine, Valine, Tyrosine, Proline, Phenylalanine, Citrate, Formate, Fumarate, Malate, Fructose, Glucose, Sucrose, GABA, and Trigonelline (Duynhoven et al., 2013; Becerra-Martínez et al., 2017).

## Statistical Analysis

In this assay, the experimental design was one-factor (foliar application of the formulations) with a total of four experimental units ( $n = 4$ ), which consisted of 4 biological units each. The statistical analysis included a one-way ANOVA with the SPSS program v24. When the ANOVA was significant ( $p < 0.05$ ), Duncan’s HSD test for the separation of means was applied for  $p < 0.05$ . On the other hand, with the same statistics software, a Pearson’s correlation matrix was performed, which measured the degree of linear relationship between the variables. Also, to establish the existence or not of significant differences between the percent of metabolites compared with the control, a Student’s *t*-test was performed, for which the data were previously transformed through the arcsine of the root square of the value divided by one hundred.

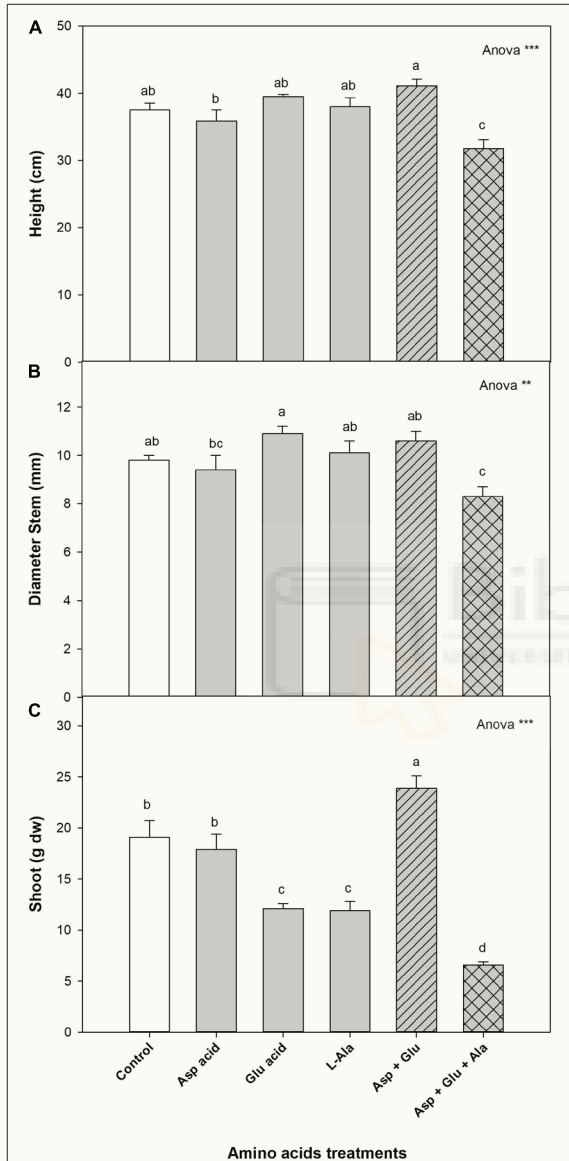
A principal component analysis (PCA) and a cluster analysis (CA) were also performed. The cluster analysis was applied to the standardized data for hierarchical associations employing Ward’s method for agglomeration and the squared Euclidean distance as the dissimilarity measure.

## RESULTS

### Vegetative Growth Parameters

The vegetative growth parameters were significantly affected by the treatments applied. Without the exogenous application of the AAs (control), the growth values were: a height of 37.5 cm, a stem diameter of 9.8 mm, and a dry weight of 19.1 g, respectively. The plants from the Asp + Glu treatment had a shoot dry weight that was significantly greater than the rest of the treatments, increasing by 25% with respect to the control plants. The plants with the least growth were those that were treated with the mixture of Asp + Glu + Ala, with a decrease in growth of 76%. The dry weight of the shoot decreased with the treatments in the following order: Asp + Glu > Control = Asp > Glu = Ala > Asp + Glu + Ala. As for the height, the plants treated with the Asp + Glu mixture were the tallest, but significant differences were only observed with the Asp and Asp + Glu + Ala treatments. The plants

with the thickest stems were those that were treated with Glu, but significant differences were only observed with Asp and Asp + Glu + Ala (Figure 1).



**FIGURE 1 |** Growth parameters: height (cm) (A), diameter stem (mm) (B) and shoot (g dw) (C), measured in the 'Optima' variety of tomato after a week from the exogenous application of the treatment with AAs: Control (without AAs), Aspartic acid (Asp ac.), Glutamic acid (Glu ac.), L-Alanine (L-Ala), combination Asp + Glu and combination Asp + Glu + Ala. In the ANOVA: \*\* and \*\*\* indicate significant differences at  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively. The different lower case letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the means established by Duncan's test ( $n = 4$ ).

## Physiological Study

For the parameters of gas exchange, it was observed that the plants without the exogenous application of AAs had the following values:  $A_{CO_2}$   $14.4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $g_s$   $231.9 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $C_i/C_a$  0.65, and WUE  $6.09 \mu\text{mol mmol}^{-1}$  (Figure 2). In all the parameters assayed, significant differences were observed with the treatments. The plants with the greatest net  $CO_2$  assimilation rate were those from the Asp + Glu treatment, although without significant differences found with respect to the Glu-treated plants. The lowest values were found in plants from the Asp + Glu + Ala treatments (although not significant with respect to the control and L-Ala). With respect to the  $g_s$  and  $C_i/C_a$  parameters, the control plants and those treated with Asp had values that were significantly lower than those from the rest of the treatments, while for WUE, the lowest values were found in plants treated with Glu, L-Ala and Asp + Glu + Ala.

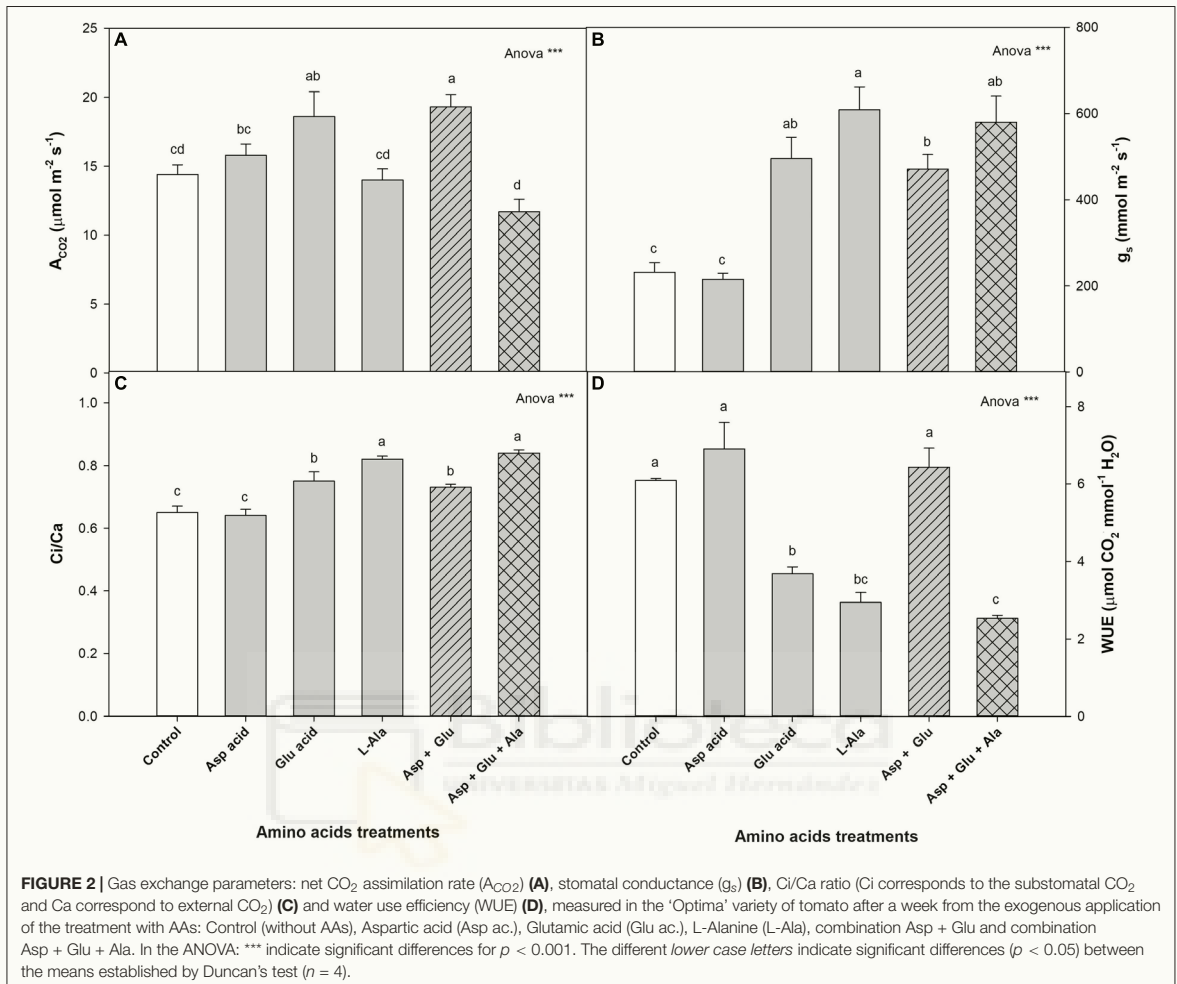
The exogenous application of AAs did not affect neither the quantum efficiency of PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) nor the photochemical quenching co-efficient (qP). However, significant differences were observed between the treatments for the antennae efficiency parameter, in that the plants from the Asp treatment had the highest value, being significant with respect to those found in the Glu and Ala treatments.

As for the concentration of chlorophylls, for the completely developed leaves (DL) as well as the buds (LB), significant differences were observed among the treatments (Figure 3). The control plants had chlorophyll values for DL and LB of 33.9 and 47.0 (SPAD values), respectively. The plants that were treated with Asp acid had the highest values of DL and LB, being significant for all the treatment in DL, and as compared to the control plants, and the Ala and Asp + Glu + Ala treatments for LB.

## Ionic Study

For the plants that were not foliarly treated with AAs, the concentration of the macronutrients Ca, K, Mg, Na and P were 2.66, 2.95, 0.72, 0.19, 0.31, and  $3.97 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1} \text{ dw}$ , respectively (Table 1). The concentration of Ca and Mg did not change due to the application of the AAs treatments with respect to the control treatment. However, significant differences were observed for K, P and N. These differences were due to the concentration of these nutrients increasing in the Ala and Asp + Glu + Ala treatments with respect to the other treatments with AAs and the control.

The micronutrients results showed that for the control plants, the concentrations of B, Cu, Fe, Mn, and Zn were 47.8, 8.7, 171.2, 71.7, and 23.1 ppm, respectively (Table 1). In this case, there were significant differences in the concentrations of Cu, Fe, Mn and Zn. For Cu, these differences were due to the two-fold increase in concentration of the plants treated with Asp + Glu + Ala as compared to the rest of the treatments. The concentration of Fe oscillated between 171.2 ppm (control) and 104.85 (Glu and Asp + Glu), of Mn between 93.3 (Asp) and 67.5 (L-Ala), and of Zn between 36.8 (L-Ala and Asp + Glu + Ala) and



23.1 (Control), with significant differences observed between the maximum and minimum values.

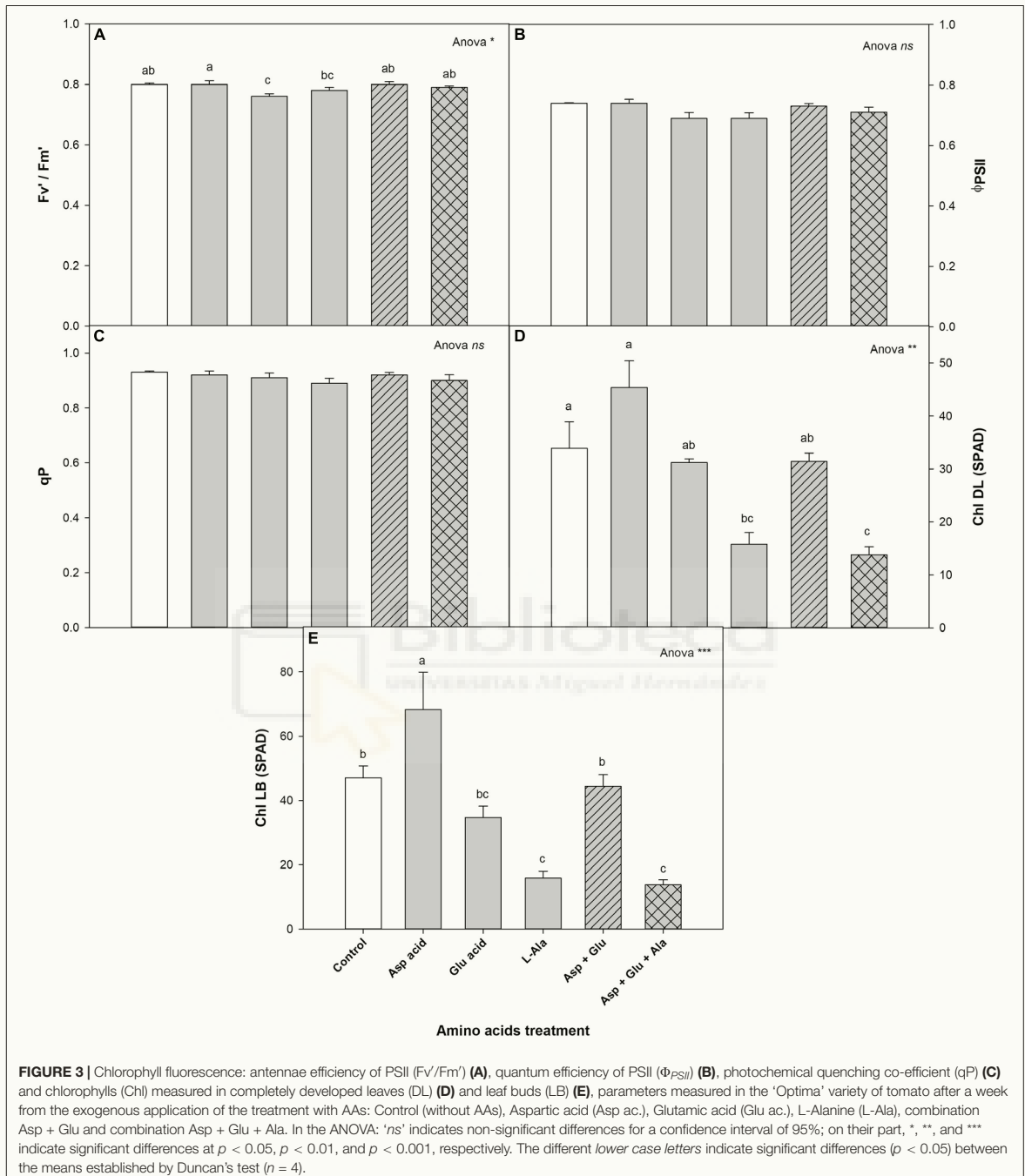
## Metabolomic Study

### Amino Acids

The AAs detected with <sup>1</sup>H-NMR in tomato plants were Aspartate, Glutamate, Alanine, Tyrosine, Valine, Glutamine, Isoleucine, Phenylalanine and Proline. Of these AAs, in the control plants, the ones that added up to 98% of the total AAs detected were, in decreasing order, Glutamate (38%), Proline (30%), Glutamine (20%) and Aspartate (10%) (Table 2, Supplementary Figure 1). Of all the AAs measured, significant differences were observed with the treatments assayed, for Glutamate, Proline, Alanine, Tyrosine and Isoleucine. In the case of glutamate, it was observed that the application of L-Ala, Asp + Glu and Asp + Glu + Ala decreased its concentration with respect to the control, with the lowest values observed in plants treated with Asp + Glu + Ala. In the case of Proline, the treatments which included L-Ala

and the Asp + Glu + Ala mixture) decreased its concentration, moving from 6.83 mg g<sup>-1</sup> dw from the control plants to 2.5 mg g<sup>-1</sup> dw, while the treatments Asp, Glu and their mixture (Asp + Glu) increased it, reaching the highest concentration in the mixture of 10.02 mg g<sup>-1</sup> dw. The concentration of Alanine increased in the plants treated with this AA foliarly (L-Ala and Asp + Glu + Ala), and the Asp + Glu mixture, with the highest concentration measured in the plants treated with L-Ala. The concentration of Tyrosine decreased with the application of L-Ala and Asp + Glu + Ala. Likewise, the concentration of Isoleucine decreased with the application of Asp + Glu, in relation to the control plants (Table 2).

As for the relative distribution of the AAs, it was observed that in general, the treatments followed a model that was similar to the control plants, as previously commented, with some differences. The application of Asp, Glu and their mixture resulted in the % proline being higher than that of glutamate; and in the Asp + Glu



mixture, the % of L-Ala overcame that of Glutamine (Supplementary Figure 1). On the other hand, the percentage of glutamine was higher than that of proline in the L-Ala and Asp + Glu + Ala treatments.

### Organic Acids

The organic acids quantified with  $^1\text{H-NMR}$  were malate, citrate, fumarate and formate (Figure 4, Supplementary Figure 2). Among these, the most common was malate, whose



**TABLE 1** | Concentration of macro ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1} \text{ dw}$ ) and micronutrients (ppm) quantified in leaves from the 'Optima' variety of tomato after a week from the exogenous application of the treatment with AAs: Control (without AAs), Aspartic acid (Asp ac.), Glutamic acid (Glu ac.), L-Alanine (L-Ala), combination Asp + Glu and combination Asp + Glu + Ala.

Macronutrients ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1} \text{ dw}$ )					
Treatments	Ca	K	Mg	P	N
Control (without AAs)	2.66 ± 0.06	2.95 ± 0.04 cd	0.72 ± 0.03	0.31 ± 0.02bc	3.97 ± 0.15b
Asp Ac.	2.73 ± 0.19	2.85 ± 0.19 cd	0.67 ± 0.07	0.39 ± 0.04b	4.49 ± 0.43b
Glu Ac.	2.62 ± 0.20	2.72 ± 0.01d	0.71 ± 0.03	0.28 ± 0.01c	3.88 ± 0.27b
L-Ala	2.92 ± 0.23	4.50 ± 0.12b	0.66 ± 0.05	0.63 ± 0.04a	6.08 ± 0.24a
Asp + Glu	2.66 ± 0.21	3.33 ± 0.22c	0.71 ± 0.04	0.40 ± 0.04b	4.77 ± 0.17b
Asp + Glu + Ala	2.05 ± 0.16	5.42 ± 0.25a	0.64 ± 0.08	0.70 ± 0.02a	6.47 ± 0.30a
ANOVA	ns	***	ns	***	***
Micronutrients (ppm)					
Treatments	B	Cu	Fe	Mn	Zn
Control (without AAs)	47.8 ± 1.3	8.7 ± 1.3b	171.2 ± 22.2a	71.7 ± 0.9bc	23.1 ± 0.7c
Asp Ac.	45.4 ± 1.2	11.8 ± 0.6b	121.9 ± 12.5bc	93.3 ± 2.3a	29.3 ± 1.7b
Glu Ac.	43.7 ± 0.7	9.3 ± 0.9b	104.7 ± 2.9c	84.8 ± 1.9ab	29.8 ± 1.9b
L-Ala	38.8 ± 2.8	11.3 ± 1.0b	125.5 ± 8.3bc	67.5 ± 2.6c	37.1 ± 2.7a
Asp + Glu	40.9 ± 4.7	8.9 ± 0.9b	105.0 ± 9.5c	76.6 ± 6.7bc	30.2 ± 3.1b
Asp + Glu + Ala	45.5 ± 5.2	22.7 ± 2.5a	154.2 ± 14.2ab	83.4 ± 6.5ab	36.4 ± 1.6a
ANOVA	ns	***	**	**	**

In the ANOVA: 'ns' indicates non-significant differences for a confidence interval of 95%; on their part, \*\* and \*\*\* indicate significant differences at  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively. The different lower case letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the means established by Duncan's test ( $n = 4$ ).

**TABLE 2** | Concentration of amino acids ( $\text{mg } \text{g}^{-1} \text{ dw}$ ) quantified by NMR in leaves from the 'Optima' variety of tomato after a week from the exogenous application of the treatment with AAs: Control (without AAs), Aspartic acid (Asp ac.), Glutamic acid (Glu ac.), L-Alanine (L-Ala), combination Asp + Glu and combination Asp + Glu + Ala.

Amino Acids ( $\text{mg } \text{g}^{-1} \text{ dw}$ )									
Treatments	Glutamate	Proline	Glutamine	Aspartate	Alanine	Phenylalanine	Valine	Tyrosine	Isoleucine
Control (without AAs)	7.85 ± 0.68a	6.83 ± 0.26c	4.68 ± 0.46	2.50 ± 0.26	0.60 ± 0.05cd	0.26 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.19 ± 0.03a	0.15 ± 0.03b
Asp Ac.	6.58 ± 0.42abc	8.63 ± 0.37b	4.89 ± 0.58	2.43 ± 0.23	0.56 ± 0.01cd	0.22 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.18 ± 0.04a	0.14 ± 0.03b
Glu Ac.	6.75 ± 0.70ab	8.13 ± 0.71b	4.02 ± 0.57	2.36 ± 0.23	0.48 ± 0.02d	0.30 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.15 ± 0.04ab	0.21 ± 0.04b
L-Ala	5.05 ± 0.19cd	2.47 ± 0.17d	3.15 ± 0.48	2.31 ± 0.16	1.44 ± 0.07a	0.18 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.06 ± 0.01b	0.20 ± 0.04b
Asp + Glu	5.54 ± 0.26bcd	10.02 ± 0.22a	2.82 ± 0.47	3.55 ± 0.42	0.66 ± 0.01c	0.27 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.13 ± 0.03ab	0.34 ± 0.04a
Asp + Glu + Ala	4.31 ± 0.43d	2.59 ± 0.04d	3.33 ± 0.40	2.53 ± 0.25	0.93 ± 0.03b	0.25 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.07 ± 0.01c	0.21 ± 0.04b
ANOVA	**	***	ns	ns	***	ns	ns	*	*

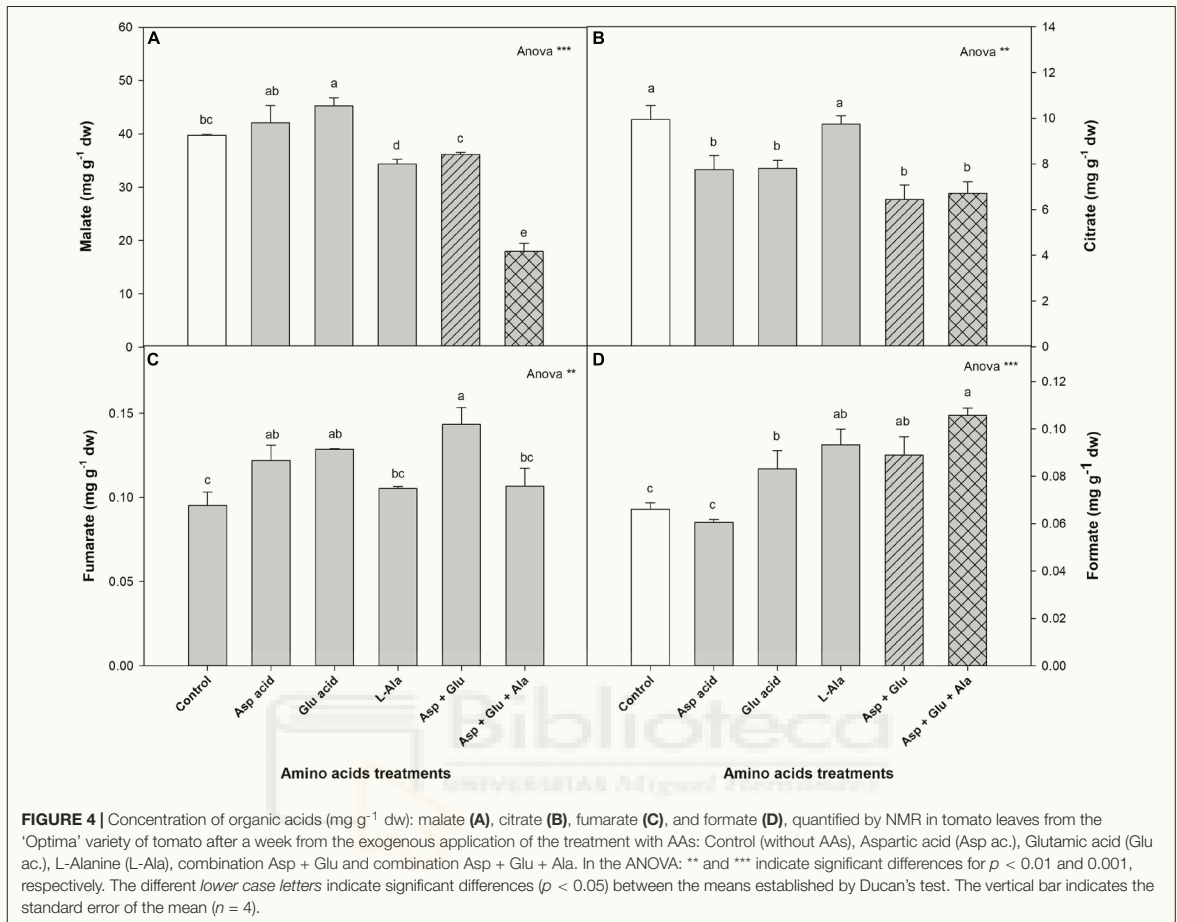
In the ANOVA: 'ns' indicates non-significant differences for a confidence interval of 95%; on their part, \*, \*\*, and \*\*\* indicate significant differences at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.001$ , respectively. The different lower case letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the means established by Duncan's test ( $n = 4$ ).

concentration comprised 80% of the total acids quantified, followed by citrate with 12%, with fumarate and formate being minor constituents. Thus, the concentration of malate increased with the application of Glu, and decreased in the plants from the L-Ala, Asp + Glu and Asp + Glu + Ala treatments, with respect to the control plants, reaching a concentration that was lower in the last treatment (Figure 4). The concentration of citrate decreased in all the treatments except for L-Ala, where no significant differences were found with respect to the control. The concentration of fumarate increased with the application of all the amino acids, with the highest value reached with the Asp + Glu mixture. The same trend was observed in the shoot concentration of formate, which increased in all the

AAs treatments except for Asp. The greatest concentration was found for the Asp + Glu + Ala mixture, without significant differences observed with Asp + Glu and L-Ala. Despite the changes produced by the application of the AAs, the relative distribution of these in each treatment followed the same model as the one described previously for the control plants (Supplementary Figure 2).

### Sugars

The sugars quantified with  $^1\text{H-NMR}$  in the leaves of the tomato plants were fructose, sucrose and glucose. Of these, the most commonly quantified was fructose (44.5%), followed by sucrose (31.5%) and glucose (24.0%) (Figure 5,



**Supplementary Figure 3).** For all of them, it was observed that all the treatments affected their concentration. For fructose, the concentration increased with the application of Glu, while it decreased with the application of L-Ala and Asp + Glu + Ala, as compared to the control plants. For sucrose, the only significant difference observed between the treatments was the increase in its concentration in plants from the Asp treatment, as compared to the application of Asp + Glu + Ala. The concentration of glucose decreased with the application of Asp, Glu, L-Ala and Asp + Glu + Ala, with the L-Ala treatment having the lowest value. The relative distribution of these three sugars did not change in the AAs treatments with respect to the control treatment, as commented previously, except for the application of L-Ala, which resulted in a greater percentage of sucrose as compared to the percentage of fructose (**Supplementary Figure 3**).

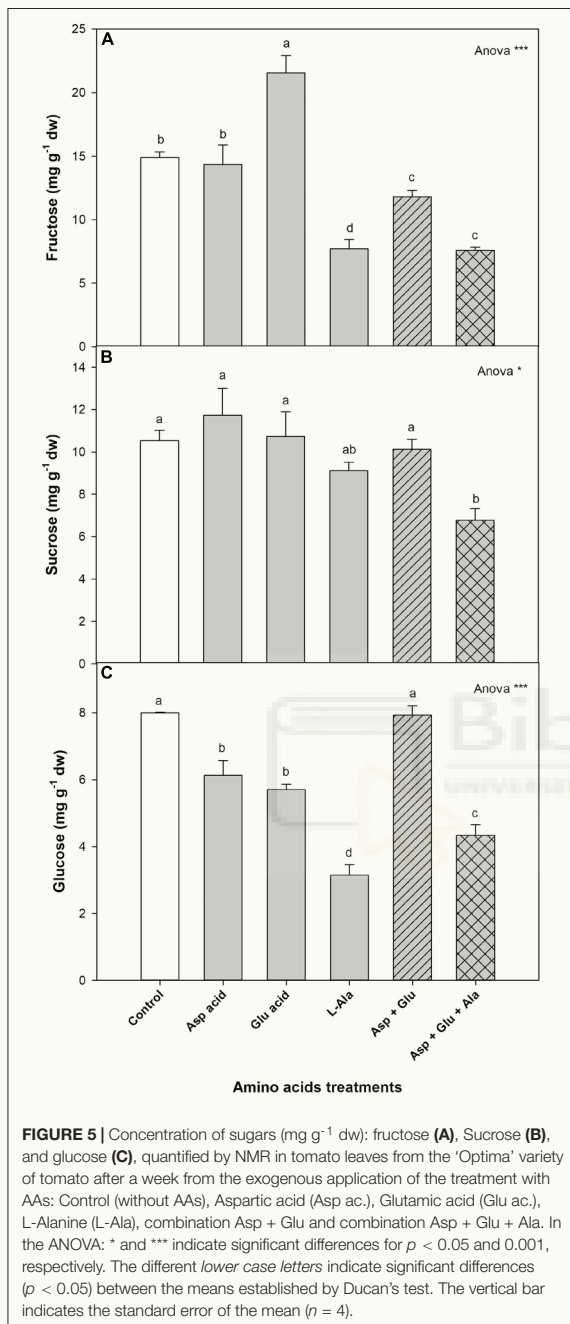
#### Other Metabolites

The <sup>1</sup>H-NMR analysis also detected and quantified 4-Aminobutyrate (GABA) and Trigonelline (**Figure 6**). In

normal conditions, without the application of AAs, the tomato plants have values of 0.92 mg g<sup>-1</sup> dw for GABA and 0.71 mg g<sup>-1</sup> dw for Trigonelline. In both cases, it was observed that the ANOVA was significant for the treatments. The application of the Asp + Glu + Ala mixture increased the concentration of GABA with respect to the rest of the treatments, increasing from 1.15 mg g<sup>-1</sup> dw for the control treatment to 1.82 mg g<sup>-1</sup> dw for this treatment. The concentration of Trigonelline decreased with the application of L-Ala and Asp + Glu + Ala, with the concentration being the lowest in the latter treatment.

#### Principal Components Analysis (PCA) and Cluster Analysis

For a better and simpler visual interpretation of all the data, a principal component analysis and a cluster analysis were conducted (**Figure 7**). The first four components explained 93.75% of the variability, and the first three, represented by PC1, PC2 and PC3, explained 84%. The PC1 component explained 53.35% of the variability observed, thus showing that the variability was fundamentally due to WUE, qP, K, Mg, P,



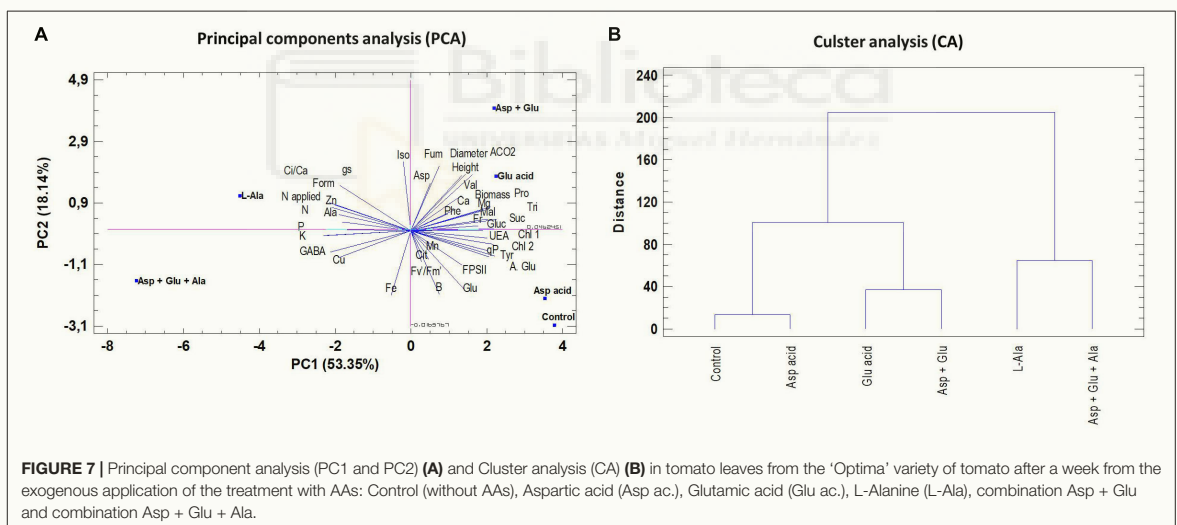
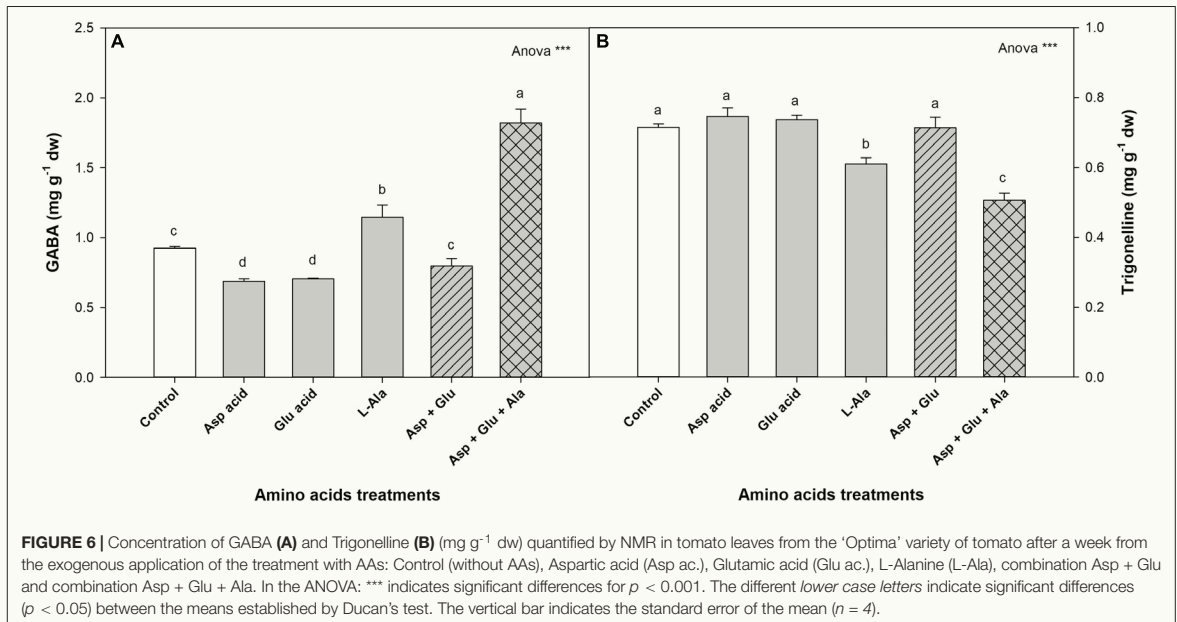
N, Glutamic acid, Proline, Tyrosine, Sucrose, GABA, Formate, and Trigonelline. The cluster analysis showed that L-Ala, and Asp + Glu + Ala treatments were more different to the rest of treatments.

## DISCUSSION

Amino acids in plants are involved in primary and secondary metabolism, and participate in a wide range of cellular enzymatic reactions as constituents of different enzymes such as aminotransferases, dehydrogenases, lyases and decarboxylases. Therefore, they can have an influence on diverse phenological and physiological processes such as vegetative development of the plants, seed germination, fruit maturation, signaling and activation of defense systems against abiotic and biotic stresses, osmotic adjustment, deactivation of reactive oxygen species, and as a reserve source of nitrogen, among others (Teixeira et al., 2017). These important functions of the AAs in plants lead to the application of biostimulant products containing AAs, either added in their free form or added as botanical and seaweed extracts and hydrolyzed proteins, becoming a common practice in agriculture (Khan et al., 2019). Nevertheless, in order for the biostimulant products to become more efficient in the improvement of the agronomic performance of the crops, and so that they can be specifically formulated depending on the crop varieties, it is necessary to understand the function of each amino acid in each crop, to identify antagonistic, synergistic or neutral effects among the amino acid mixtures, and to determine the doses and the best time of application.

In our experiment, it was observed that the foliar application of AAs can alter the vegetative growth of the plants. However, this effect was dependent on the AAs utilized for the preparation of the products applied. According to the shoot dry weight data (Figure 1), the best treatment found from all those applied was the Asp + Glu mixture. And, taking account that the application of these two AAs individually did not affect this parameter or even decreased it, as in the Glu treatment, relative to the control plants, it was concluded that there was a synergistic effect between these two AAs. The opposite behavior was found for the plants to which L-Ala was applied individually or as part of a mixture. In this case, it became apparent that L-Ala was harmful to tomato plants when applied at a concentration of 15 mM. In addition, when mixed with Asp + Glu, its negative effect was enhanced, as observed in the decrease in dry weight of the shoot as well as the appearance of damage to the leaves (Figure 1). Some synergic effects between AAs has been previously reported. In an experiment conducted with this same tomato variety under saline conditions (Alfosea-Simón et al., 2020), it was observed that the Pro + Glu and Met + Trp mixtures were more efficient in palliating the effects of salinity as compared to the individual application of these AAs. Despite the positive effects of the application of Glutamic or Aspartic acids being observed on several occasions, such as in Kimchi plants grown in low temperatures (Lee et al., 2017) or rice under an excess of Cd (Rizwan et al., 2017), the positive effects of these two AAs applied simultaneously had never been previously described. On the other hand, plants from Asp + Glu + Ala applications received three times more amino acid content compared to those from individual Asp, Glu and Ala spraying, and 1.8 times more relative to Asp + Glu treatment. Thus, the excess of amino acid content in the spraying Asp + Glu + Ala solution could have damaged the plants. In several cases, for instance, in Arabidopsis plants, it has been shown that amino

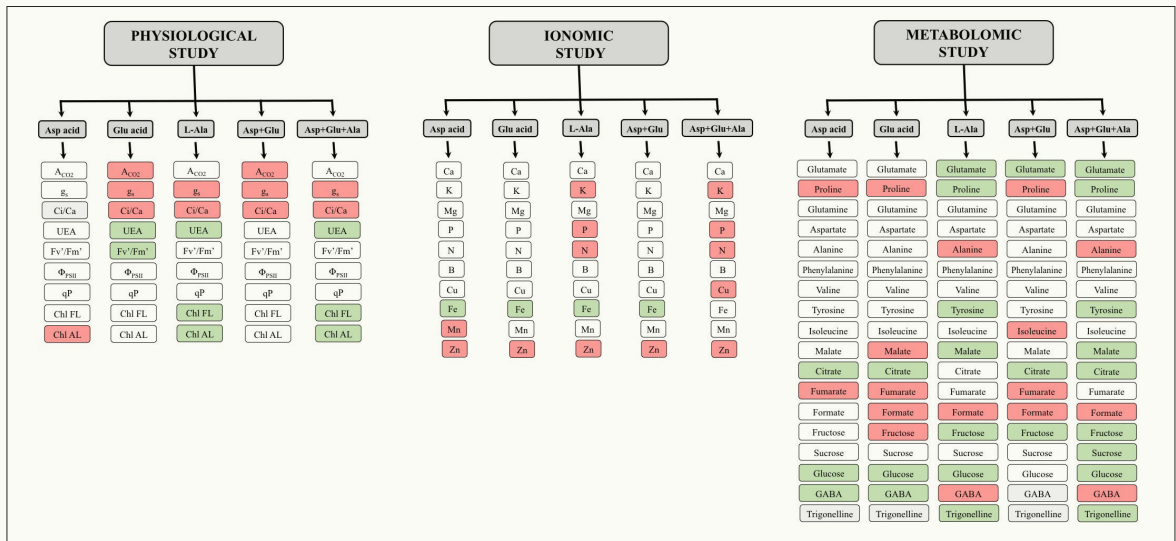




acids as low as  $100 \mu\text{M}$  applied via root caused damage in the root growth (Ravelo-Ortega et al., 2021). Thus, low concentrations of amino acids in some plant species can have un-expected effects.

One of the reasons why the plants treated with Asp + Glu had a greater growth can be found in the results from the physiological study. In this study (Figure 8), it was observed that one of the common responses of the plants when treated with any AAs treatment was the increase in stomatal conductance ( $g_s$ ). However, this generalized response was not observed in the  $A_{CO_2}$ . The only plants that had an increase in the  $CO_2$  assimilation rate, in parallel to the opening of stomata, were

those from the Asp + Glu treatment. Thus, the simultaneous effect of Asp + Glu could have enhanced the biochemical reactions of photosynthesis. This has already been reported by Lee et al. (2017) with the foliar application of Glutamic acid, with positive effects observed on the photosynthetic rate and stomatal conductance. In an experiment carried out in rice plants under conditions of cadmium stress, it was determined that the foliar application of Asp also improved the photosynthetic rate and stomatal conductance (Rizwan et al., 2017). In our experiment in tomato plants, the simultaneous application of Asp + Glu was necessary to enhance  $A_{CO_2}$ . In addition, in these



**FIGURE 8 |** Summary of the relative results with respect to the control obtained after the foliar application of the AA treatments: Control (without AAs), Aspartic acid (Asp ac.), Glutamic acid (Glu ac.), L-Alanine (L-Ala), combination Asp + Glu and combination Asp + Glu + Ala. The red or green color indicate a significant increase or reduction, respectively, of the concentration of the metabolite in plants from the AA treatments compared with the control treatment. The white color indicates that no significant differences were found between the control and the corresponding AA treatment.

plants, A<sub>CO2</sub> and g<sub>s</sub> had similar increases (as a percentage), relative to control plants. Thus, the WUE was maintained similar to the control plants, resulting in the maintenance of a good balance between the CO<sub>2</sub> captured and water lost by the plants. On the other hand, the application of L-Ala seems to have altered the non-stomatal factors of photosynthesis (biochemical factors), as indicated by the decrease in the assimilation rate of CO<sub>2</sub> in plants treated with L-Ala and Asp + Glu + Ala in parallel to the decrease in the Ci/Ca ratio (Farquhar and Sharkey, 1982). In plant cell culture studies, evidence has been shown about the harmful effects of L-Alanine. Chen et al. (2006) in cell cultures of *V. labrusca* and *V. vinifera* observed that the application of L-Ala to the growth media caused the death of cells due to the activation of Phenylalanine ammonium lyase, 4-hydroxylase cinnamic acid, the expression of the stilbene synthase gene, and the accumulation of stilbenes. Nevertheless, the applications of L-Ala to crops has barely been studied, except in the *Plumbago indica* crop, where the application of Alanine (5mM) combined with chitosan (150 mg L<sup>-1</sup>) improved its production (Jaisi and Panichayupakaranant, 2020).

The ionomics study indicated that the AAs applied to the tomato plants of the variety ‘Optima’ did not induce changes in the absorption of nutrients relative to control plants, as the concentrations of macronutrients and micronutrients in plants from any of the treatments were within the normal range for this crop (Watanabe et al., 2016). However, some foliar treatments with amino acids are able to increase or decrease the absorption of diverse macronutrients and micronutrients as indicated by Sainju et al. (2003). The data from our experiment showed that the plants treated with L-Ala (L-Ala and Asp + Glu + Ala) had an altered nutritional status as in these plants it was increased the

K, P and N concentration. This could be due to a concentration effect, as the dry weight of the shoot decreased. However, as this effect was not observed in the concentration of Ca and Mg, it should not be discarded that the L-Ala amino acid could have influenced the absorption and transport of the nutrients in plants. Nevertheless, the increase in K, P and N with respect to Ca and Mg could have created nutritional imbalances which may have caused a decrease in the growth of the shoots. Another possible reason for the highest leaf N concentration observed in the Asp + Glu + Ala treated plants could be due to the high N concentration (0.75 mg N L<sup>-1</sup>) of the solution sprayed relative to the rest of treatments.

In the metabolomics study, it was observed that the most significant change observed after the application of the AAs Aspartic acid, Glutamic acid and their Asp + Glu mixture, occurred in the concentration of Proline. The Asp and Glu treatments, and their Asp + Glu mixture increased the concentration of this amino acid, and this increase was greater with the Asp + Glu mixture. Proline is an AA with multiple functions. It has the ability to act as an osmoprotector, and plays a role in osmotic adjustment, deactivation of free oxygen radicals, regulation of the absorption of nutrients, and can also induce the CO<sub>2</sub> assimilation rate (Pervaiz et al., 2019). These functions are especially important when the plants suffer adverse environmental conditions. In the Mediterranean area, the typical greenhouse conditions can make temperature be a limiting factor in tomato cultivation. Therefore, the increase of proline in these plants could have exerted a protective role that favored the increase in the CO<sub>2</sub> assimilation rate and the plant’s growth. In addition, glutamate, aside from being a precursor of proline, is also related to the production of glutathione

and arginine. These two compounds are involved in oxidative metabolism, directly as glutathione or indirectly as arginine, as they activate PAL activity (Ben-Rejeb et al., 2014; Zheng et al., 2011). On the contrary, the application of L-Ala and Asp + Glu + Ala decreased the concentration of proline, and this response coincided with a decrease of  $A_{CO_2}$  and decreased shoot growth. These results suggest that Asp + Glu improved the physiological and morphological parameters of the plants through the synthesis of proline, while Ala altered the metabolism of the plants by reducing the concentration of proline, and therefore reducing their growth.

In plants, the AAs Glutamate and Aspartate are precursors of up to eleven AAs. The reaction of Glutamate + Oxaloacetate produces Aspartate +  $\alpha$ -ketoglutarate. This reaction is reversible, so that in the biosynthesis pathways, the AAs from glutamate (such as Alanine, Valine, Leucine, Glutamine, Proline and Arginine) are connected with those from Aspartate (such as Asparagine, Methionine, Threonine, Isoleucine and Lysine) (Forde and Lea, 2007). The application of Glutamate and Aspartate and their mixture did not increase the foliar concentration of these AAs, but were metabolized to increase the concentration of proline. Instead, the application of L-Ala individually or in a mixture increased the concentration of L-Ala in leaves. This AA was not metabolized, so that the increase in concentration could have caused damages to the cells, as observed in Chen et al. (2006) in cell cultures. Another of the alterations produced by the application of L-Ala was the decrease in Tyrosine. This AA is the precursor of secondary metabolites derived from the p-Coumaroyl-CoA pathway, which produces compounds such as coumarins, flavonoids, isoflavonoids, stilbenes, auronos, cutin, suberin, sporopollenin, catechins, proanthocyanidins, lignans, lignins, phenylpropenes, acylated polyamines and many other alkaloid derivatives. These compounds are related with the antioxidant protection capacity of the cells and with the mechanisms of protection of plants against plagues and diseases.

In the metabolomics study it was also observed that some compounds from the pentose phosphate pathway, such as fructose, sucrose, glucose and formate, as well as the tricarboxylic acid pathway (citrate, malate and fumarate), were affected. For the individual application of Asp, Glu and L-Ala and their mixture Asp + Glu, different responses were observed in the pentose phosphate pathway and the tricarboxylic acid one, which demonstrate that the mix of amino acids has a different effect than the AA applied individually. The mixtures that contained L-Ala produced a decrease in the concentration of fructose, sucrose and glucose, malate and citrate. This could suggest that the L-Ala applied at a concentration of 15mM produces alterations in the metabolism of C such as in  $A_{CO_2}$ , which could have caused a decrease in the growth of the shoot. Therefore, the causes of L-Ala toxicity in tomato plants should be studied further, using as the report from Chen et al. (2006) a reference, where it was observed that AAs can activate the enzymes Phenylalanine ammonium lyase, 4-hydroxylase cinnamic acid, the expression of the stilbene synthase gene, and the accumulation of stilbenes. In the case of Asp, Glu, and their mixture, it was observed that while the mixture maintained the

concentration of glucose at similar values as those of the control, the individual application decreased its concentration. This could indicate that the simultaneous application of Asp + Glu improved the capture and assimilation of  $CO_2$  in the plants, improving the growth of these plants, where proline could have played an important role in increasing the performance of the photosynthetic system. For the tricarboxylic acid pathway, it was observed that the application of this Asp + Glu treatment induced a reduction in the concentration of citrate, and an increase in the concentration of fumarate, which could have modulated the  $A_{CO_2}$  and  $g_s$  regulation in plants under this treatment. Some studies have revealed a negative correlation between the concentrations of fumarate and gas exchange through the opening of stomata (Nunes-Nesi et al., 2007; Araújo et al., 2012).

Another of the responses that differentiated the treatments that contained L-Ala with those that did not have this AA, was observed in the concentrations of GABA and Trigonelline. The GABA increased while the Trigonelline decreased with respect to the control, and this response was greater when L-Ala was applied with the Asp + Glu mixture. GABA is a non-protein amino acid with multiple functions in plants, playing an important role in metabolic processes such as signaling, interconnection between Carbon and Nitrogen metabolisms and the tolerance to different stresses such as low light intensity, salinity, and lack of nitrogen, drought or temperature (Ramos-Ruiz et al., 2019). The increase in GABA observed in plants treated with L-Ala could be the result of some type of stress produced by this amino acid, unchaining a protection response related with GABA. In these plants, this response was not enough to counter the stress created, and therefore, led to a decrease in growth. The concentration of Trigonelline also increases in the plant as a response to different stresses, mainly salinity, drought or UV light (Cho et al., 1999; Cho et al., 2003; Willmon et al., 2017). However, the application of L-Ala in this experiment decreased its concentration. It is important to point out that the increased in GABA and the decrease of Trigonelline are found in plants suffering some abiotic stress, so that these metabolites could be used as biomarkers to detect the possible negative effects of these AAs in tomato plants. However, more research is needed to verify this hypothesis.

The different changes observed in the metabolic processes of the plants utilized in the present research could be due that the AAs, aside from having physiological functions, may also be involved in the metabolism of plants in signaling processes (Häusler et al., 2014). It has been described that plants have glutamate receptors (GLRs) that could be activated not only by glutamate, but also by other AAs such as Serine, Alanine, Methionine, Tryptophan, Phenylalanine, Leucine, Asparagine, Threonine, Cysteine, Glycine, Tyrosine, and Peptides (Vincill et al., 2012; Forde and Roberts, 2014). The activation of these receptors could unchain a series of signaling mechanisms in processes related to the absorption of nitrogen by the roots (Miller et al., 2008), growth and architecture of the roots (Weiland et al., 2016), antioxidant metabolism (Hildebrandt et al., 2015; Weiland et al., 2016), regulation of

transcription factors (Santi et al., 2017), regulation of stomas and photosynthesis, and plant defense (Weiland et al., 2016), as well as balances between C and N metabolism (Kang and Turano, 2003; Price et al., 2012).

## CONCLUSION

In this experiment, it was observed that the application of AA to tomato plants could be beneficial for increasing their vegetative development, but this application should be first optimized. To increase the efficiency of biostimulant products in agriculture, much research is needed that may reveal: i) the effects of the AAs on physiological and metabolic processes of plants, either applied individually or as a mixture; in this experiment it was observed that the combined application of the AAs (in this case Asp and Glu) had better effects than their individual application, and ii) what dose needs to be applied; in this experiment, it was observed that the application of 15 mM of Alanine is toxic to tomato plants, and it is not reversed by the simultaneous application of the Asp + Glu + Ala mixture. The application of AAs to plants resulted in changes in their ionic, physiological and metabolomic profiles; however, as these compounds have many different functions in plants, a systems biology approach that integrates metabolomics, proteomic, genomic and hormonal studies to delve into these changes, is necessary.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

FG-S and EZ-G conceived and designed the research. MA-S, SS-G, IS, and VL conducted the experiments and collected the data in the field and in the lab. JC-Z and JM-N analyzed the data and did tables and figures. FG-S and MA-S wrote

the manuscript. SS-G and EZ-G commented and revised the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

This research was funded by State R&D Program Oriented to the Challenges of the Society, Innovation and Science Ministerial (Spain Government), grant number RTC-2016-4568-2.

## ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge support of the publication fee by the CSIC Open Access Publication Support Initiative through its Unit of Information Resources for Research (URICI).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.581234/full#supplementary-material>

**Supplementary Figure 1 |** Profile of the concentration of AAs (%) quantified with Nmr in tomato plant leaves from the 'Optima' variety after a week from the exogenous application of the treatment with AAs: Control (without AAs), Aspartic acid (Asp ac.), Glutamic acid (Glu ac.), L-Alanine (L-Ala), combination Asp + Glu and combination Asp + Glu + Ala. \* indicates significant differences at  $p < 0.05$  between the means established by Student's *t*-test ( $n = 4$ ).

**Supplementary Figure 2 |** Profile of the concentration of organic acids (%) quantified by RMN in tomato leaves from the 'Optima' variety of tomato after a week from the exogenous application of the treatment with AAs: Control (without AAs), Aspartic acid (Asp ac.), Glutamic acid (Glu ac.), L-Alanine (L-Ala), combination Asp + Glu and combination Asp + Glu + Ala. \* indicates significant differences at  $p < 0.05$  between the means established by Student's *t*-test ( $n = 4$ ).

**Supplementary Figure 3 |** Profile of the concentration of sugars (%) quantified by Nmr in tomato leaves from the 'Optima' variety of tomato after a week from the exogenous application of the treatment with AAs: Control (without AAs), Aspartic acid (Asp ac.), Glutamic acid (Glu ac.), L-Alanine (L-Ala), combination Asp + Glu and combination Asp + Glu + Ala. \* indicates significant differences at  $p < 0.05$  between the means established by Student's *t*-test ( $n = 4$ ).

## REFERENCES

- Akram, N. A., Umm, E. H., Ashraf, M., Ashraf, M., and Sadiq, M. (2020). Exogenous application of L-methionine mitigates the drought-induced oddities in biochemical and anatomical responses of bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Sci. Hortic.* 267:109333. doi: 10.1016/j.scienta.2020.109333
- Alfosea-Simón, M., Zavala-Gonzalez, E. A., Camara-Zapata, J. M., Martínez-Nicolás, J. J., Simón, I., and Simón-Grao, S. (2020). Effect of foliar application of amino acids on the salinity tolerance of tomato plants cultivated under hydroponic system. *Sci. Hortic.* 272:109509. doi: 10.1016/j.scienta.2020.109509
- Araújo, W., Nunes-Nesi, A., Nikoloski, Z., Sweetlove, L., and Fierm, A. (2012). Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues. *Plant Cell Environ.* 35, 1–21. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02332.x
- Becerra-Martínez, E., Florentino-Ramos, E., Pérez-Hernández, N., Zepeda-Vallejo, L. G., Villa-Ruano, N., Velázquez-Ponce, M., et al. (2017). 1H NMR-based metabolomic fingerprinting to determine metabolite levels in serrano peppers (*Capsicum annum* L.) grown in two different regions. *Food Res. Int.* 102, 163–170. doi: 10.1016/j.foodres.2017.10.005
- Ben-Rejeb, K., Abdely, C., and Savouré, A. (2014). How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiol. Biochem.* 80, 278–284. doi: 10.1016/j.plaphy.2014.04.007
- Cao, M., Song, C., Jin, Y., Liu, L., Liu, J., Xie, H., et al. (2010). Synthesis of poly( $\gamma$ -glutamic acid) and heterologous expression of *pgsBCA* genes. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 67, 111–116. doi: 10.1016/j.molcatb.2010.07.014
- Chen, J., Hall, D. E., Murata, J., and De Luca, V. (2006). L-Alanine induces programmed cell death in *V. labrusca* cell suspension cultures. *Plant Sci.* 171, 734–744. doi: 10.1016/j.plantsci.2006.07.003
- Cho, Y., Lightfoot, D., and Wood, A. J. (1999). Trigonelline concentrations in salt stressed leaves of cultivated *Glycine max*. *Phytochemistry* 52, 1235–1238.

- Cho, Y., Njiti, V. N., Chen, X., Lightfoot, D. A., and Wood, A. J. (2003). Trigonelline concentration in field-grown soybean in response to irrigation. *Biol. Plant.* 46, 405–410. doi: 10.1023/A:1024390522259
- Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., et al. (2015). Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196, 28–38. doi: 10.1016/j.scienta.2015.08.037
- Colla, G., Roupael, Y., Canaguier, R., Svecova, E., and Cardarelli, M. (2014). Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Front. Plant Sci.* 5, 1–6. doi: 10.3389/fpls.2014.00448
- Duynhoven, J. V., Van As, H., Belton, P. S., and Webb, G. A. (2013). *Magnetic Resonance in Food Science: Food for Thought*, 1st Edn. Cambridge: RSC Publishing.
- Farquhar, G. D., and Sharkey, T. D. (1982). Stomatal conductance and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33, 317–345. doi: 10.1146/annurev.pp.33.060182.001533
- Foley, J. A., Ramankutty, N., Brauman, K. A., Cassidy, E. S., Gerber, J. S., Johnston, M., et al. (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478:337. doi: 10.1038/nature10452
- Food and Agriculture Organization [FAO] (2020). *Datos Sobre Alimentación en Agricultura – FAOSTAT*. Rome: FAO.
- Forde, B. G., and Lea, P. J. (2007). Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *J. Exp. Bot.* 58, 2339–2358. doi: 10.1093/jxb/erm121
- Forde, B. G., and Roberts, M. R. (2014). Glutamate receptor-like channels in plants: a role as amino acid sensors in plant defence? *F1000Prime Rep.* 6:37. doi: 10.12703/P6-37
- Häusler, R. E., Ludewig, F., and Krueger, S. (2014). Amino acids – A life between metabolism and signalling. *Plant Sci.* 229, 225–237. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.09.011
- Hildebrandt, T. M., Nunes Nesi, A., Araújo, W. L., and Braun, H. P. (2015). Amino Acid Catabolism in Plants. *Mol. Plant* 8, 1563–1579. doi: 10.1016/j.molp.2015.09.005
- Jaisi, A., and Panichayupakaranant, P. (2020). Enhanced plumbagin production in *Plumbago indica* root culture by simultaneous and sequential dual elicitations using chitosan with  $\gamma$ -alanine and methyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Bioresour. Bioprocess* 7:10. doi: 10.1186/s40643-020-0298-9
- Jiang, M., Jiang, J., Li, S., Li, M., Tan, Y., Song, S., et al. (2020). Glutamate alleviates cadmium toxicity in rice via suppressing cadmium uptake and translocation. *J. Hazard. Mater.* 384:121319. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.121319
- Kang, J., and Turano, F. J. (2003). The putative glutamate receptor 1.1 (*AtGLR1.1*) functions as a regulator of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 6872–6877. doi: 10.1073/pnas.1030961100
- Kendziorok, M., Paszkowski, A., and Zagdanska, B. (2012). Differential regulation of alanine aminotransferase homologues by abiotic stresses in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Plant Cell Rep.* 31, 1105–1117. doi: 10.1007/s00299-012-1231-2
- Khan, S., Yu, H., Li, Q., Gao, Y., Sallam, B. N., Wang, H., et al. (2019). Exogenous application of amino acids improves the growth and yield of lettuce by enhancing photosynthetic assimilation and nutrient availability. *Agronomy* 9:5. doi: 10.3390/agronomy9050266
- Lea, P. J., and Ireland, R. J. (1999). “Nitrogen Metabolism in Higher Plants,” in *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology*, ed. B. K. Singh (New York, NY: Marcel Dekker), 1–4.
- Lee, H. J., Kim, J. S., Lee, S. G., Kim, S. K., Mun, B., and Choi, C. S. (2017). Glutamic acid foliar application enhances antioxidant enzyme activities in kimchi cabbages leaves treated with low air temperature. *Hortic. Sci. Technol.* 35, 700–706.
- Lucini, L., Roupael, Y., Cardarelli, M., Canaguier, R., Kumar, P., and Colla, G. (2015). The effect of a plant-derived biostimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions. *Sci. Hortic.* 182, 124–133. doi: 10.1016/j.scienta.2014.11.022
- Miller, A. J., Fan, X., Shen, Q., and Smith, S. J. (2008). Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. *J. Exp. Bot.* 59, 111–119. doi: 10.1093/jxb/erm208
- Mutale-Joan, C., Redouane, B., Najib, E., Yassine, K., Lyamlouli, K., Laila, S., et al. (2020). Screening of microalgae liquid extracts for their bio stimulant properties on plant growth, nutrient uptake and metabolite profile of *Solanum lycopersicum* L. *Sci. Rep.* 10:1. doi: 10.1038/s41598-020-59840-4
- Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Gibon, Y., Sulpice, R., Lytovchnko, A., Fisahn, J., et al. (2007). Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant J.* 50, 1093–1106. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03115.x
- Paradišević, N., Teklić, T., Zeljković, S., Lisjak, M., and Špoljarević, M. (2019). Biostimulants research in some horticultural plant species—A review. *Food Energy Secur.* 8:2. doi: 10.1002/fes3.162
- Parry, M. L. (2019). *Climate Change and World Agriculture*. Abingdon: Routledge.
- Pervaiz, A., Iqbal, A., Khalid, A., Manzoor, A., Noreen, S., Ayaz, A., et al. (2019). Proline induced modulation in physiological responses in wheat plants. *J. Agric. Environ. Sci.* 8, 112–119. doi: 10.15640/jaes.v8n1a11
- Price, M. B., Jeleško, J., and Okumoto, S. (2012). Glutamate receptor homologs in plants: functions and evolutionary origins. *Front. Plant Sci.* 3:235. doi: 10.3389/fpls.2012.00235
- Rai, V. K. (2002). Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biologia Plant.* 45, 481–487. doi: 10.1023/A:1022308229759
- Ramos-Ruiz, R., Martínez, F., and Knauf-Beiter, G. (2019). The effects of GABA in plants. *Cogent Food Agric.* 5:1670553. doi: 10.1080/23311932.2019.1670553
- Ravelo-Ortega, G., López-Bucio, J. S., Ruiz-Herrera, L. F., Pelagio-Flores, R., Ayala-Rodríguez, J. A., Reyes de la Cruz, H., et al. (2021). The growth of *Arabidopsis* primary root is repressed by several and diverse amino acids through auxin-dependent and independent mechanisms and MPK6 kinase activity. *Plant Sci.* 302:110717. doi: 10.1016/j.plantsci.2020.110717
- Rizwan, M., Ali, S., Akbar, M. Z., Shakoor, M. B., Mahmood, A., Ishaque, W., et al. (2017). Foliar application of aspartic acid lowers cadmium uptake and Cd-induced oxidative stress in rice under Cd stress. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24, 21938–21947. doi: 10.1007/s11356-017-9860-1
- Roupael, Y., Spíchal, L., Panzarová, K., Casa, R., and Colla, G. (2018). High-Throughput plant phenotyping for developing novel biostimulants: from lab to field or From Field to lab? *Front. Plant Sci.* 9:1197. doi: 10.3389/fpls.2018.01197
- Sánchez-Pale, J. R. (2017). *Evaluación del efecto de humics- 95 y aminofol, en el desarrollo y crecimiento de Impatiens walleriana* Hook. F. VAR. LILLICOP. Doctoral Thesis. Toluca: Universidad Autónoma del Estado de México, 14.
- Sainju, U. M., Dris, R., and Singh, B. (2003). Mineral nutrition of tomato. *J. Food Agric. Environ.* 1, 176–183.
- Santi, C., Molesini, B., Gluzzo, F., Pii, Y., Vitulo, N., and Pandolfini, T. (2017). Genome-wide transcriptional changes and lipid profile modifications induced by medicago truncatula N5 overexpression at an early stage of the symbiotic interaction with *sinorhizobium meliloti*. *Genes* 8:396. doi: 10.3390/genes8120396
- Tantawy, A. S., Abdel-Mawgoud, A. M. R., El-Nemr, M. A., and Chamoun, Y. G. (2009). Alleviation of salinity effects on tomato plants by application of amino acids and growth regulators. *Eur. J. Sci. Res.* 30, 484–494.
- Teixeira, W. F., Fagan, E. B., Soares, L. H., Umburanas, R. C., Reichardt, K., and Neto, D. D. (2017). Foliar and seed application of amino acids affects the antioxidant metabolism of the soybean crop. *Front. Plant Sci.* 8:327. doi: 10.3389/fpls.2017.00327
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., and Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418:671. doi: 10.1016/j.jclepro.2020.121656
- Van der Sar, S., Kim, H. K., Meissner, A., Verpoorte, R., and Choi, Y. H. (2013). “Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy for plant metabolite profiling,” in *The Handbook of Plant Metabolomics*, eds W. Weckwerth and G. Kahl, 57–76. doi: 10.1002/9783527669882.ch3
- Vincill, E. D., Bieck, A. M., and Spalding, E. P. (2012). Ca<sup>2+</sup> conduction by an amino acid-gated ion channel related to glutamate receptors. *Plant Physiol.* 159, 40–46. doi: 10.1104/pp.112.197509
- Wallace, J. S., Acreman, M. C., and Sullivan, C. A. (2003). The sharing of water between society and ecosystems: from conflict to catchment-based co-management. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B: Biol. Sci.* 358, 2011–2026. doi: 10.1098/rstb.2003.1383



- Watanabe, T., Maejima, E., Yoshiruma, T., Urayama, M., Yamauchi, A., Owadano, M., et al. (2016). The ionomic study of vegetable crops. *PLoS One* 11:e0160273. doi: 10.1371/journal.pone.0160273
- Weiland, M., Mancuso, S., and Baluska, F. (2016). Signalling via glutamate and GLRs in *Arabidopsis thaliana*. *Funct. Plant Biol.* 43, 1–25. doi: 10.1071/FP15109
- Willmon, D., Devireddy, A. R., Inupakutikal, M., Puppala, N., and Chol, Y. (2017). Stress Responses of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Genotypes as Measured by Trigonelline Content after Exposure to UV-B Radiation. *Am. J. Plant Sci.* 8, 998–1010. doi: 10.4236/ajps.2017.85066
- Zheng, Y., Sheng, J., Zhao, R., Zhang, R., Lv, S., Liu, L., et al. (2011). Preharvest l-arginine treatment induced postharvest disease resistance to botrytis cinerea in tomato fruits. *J. Agric. Food Chem.* 59, 6543–6549. doi: 10.1021/jf2000053

**Conflict of Interest:** EZ-G was employed by the company Atlantica Agrícola.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Alfosea-Simón, Simón-Grao, Zavala-Gonzalez, Cámara-Zapata, Simón, Martínez-Nicolás, Lidón and García-Sánchez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



### 7.3. Publicación 03

#### Título

Application of biostimulants containing amino acids to tomatoes could favor sustainable cultivation: Implications for tyrosine, lysine, and methionine

#### Autores

Alfosea-Simón, M., Simón-Grao, S., Zavala-González, E.A., Cámara-Zapata, J.M., Simón, I., Martínez-Nicolás, J.J., Lidón, V., Rodríguez-Ortega, W.M., y García-Sánchez, F.

#### Revista



*Sustainability*, 12 (22), 9729

Categoría JCR	Categoría de cuartil	Factor de impacto
Environmental Science	Q2	3,251 (2020)



Article

# Application of Biostimulants Containing Amino Acids to Tomatoes Could Favor Sustainable Cultivation: Implications for Tyrosine, Lysine, and Methionine

Marina Alfosea-Simón <sup>1</sup>, Silvia Simón-Grao <sup>1,2</sup>, Ernesto A. Zavala-Gonzalez <sup>3</sup>,  
 Jose María Cámara-Zapata <sup>1</sup> , Inmaculada Simón <sup>1</sup>, Juan José Martínez-Nicolás <sup>4</sup>,  
 Vicente Lidón <sup>4</sup>, Wilbert M. Rodríguez-Ortega <sup>5</sup> and Francisco García-Sánchez <sup>2,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Applied Physics, Universidad Miguel Hernández, 03300 Orihuela, Spain; alfosea.simon@gmail.com (M.A.-S.); ssimon@cebas.csic.es (S.S.-G.); jm.camara@umh.es (J.M.C.-Z.); inma.simon@umh.es (I.S.)

<sup>2</sup> Department of Plant Nutrition, Center of Edaphology and Applied Biology of Segura, 30100 Murcia, Spain

<sup>3</sup> Atlántica Agrícola I+D Department, 03400 Villena, Spain; ezavala@atlanticaagricola.com

<sup>4</sup> Department of Plan Production, Universidad Miguel Hernández, 03300 Orihuela, Spain; juanjose.martinez@umh.es (J.J.M.-N.); vicente.lidon@umh.es (V.L.)

<sup>5</sup> Independent Researcher, Miami, FL 33222, USA; wilbert12mx@yahoo.com.mx

\* Correspondence: fgs@cebas.csic.es

Received: 28 October 2020; Accepted: 19 November 2020; Published: 21 November 2020



**Abstract:** Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most important crops worldwide as per its production and the surface cultivated. The use of biostimulant products plays a fundamental role in mitigating the negative effects of climate change and reducing the use of conventional fertilizers. Many of these products are formulated with amino acids (AAs). This study was conducted to elucidate the effects of the foliar application of tyrosine (Tyr) (15 mM), lysine (Lys) (15 mM), methionine (Met) (15 mM), and a Tyr + Lys + Met (15 mM + 15 mM + 15 mM) mixture on the physiological and metabolic processes, vegetative growth, and nutritional state of Optima variety tomato plants. The results showed that application of the AAs, individually and combined, was beneficial for the growth of the aerial part, net assimilation of CO<sub>2</sub>, and water use efficiency (WUE). Application of Tyr resulted in the best WUE. The metabolomics study revealed that AA treatments increased the concentration of proline, fructose, and glucose, whose role was to stimulate glycolysis and the Krebs cycle. Thus, the plants could have greater reduction power and energy, as well as more carbon molecules for their growth processes.

**Keywords:** metabolites; mineral nutrients; gas exchange parameters; NMR; organic acids; sugars

## 1. Introduction

The tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most important crops worldwide on the economic and social level [1]. Its fruit is of great interest to today's society, as it is a source of compounds with great human health benefits [2]. According to the statistical data of the Food and Agriculture Organization (FAO) (2020) [3], Spain is the second-largest producer of tomatoes in Europe, with approximately 56 thousand hectares cultivated and a yield of 85 t/ha.

In the last few years, agricultural production has been threatened by climate change, which brings with it high temperatures and periods of drought that are long-lasting and more intense. Along with this, the world population has increased considerably. This is said to be the general trend in the coming



years; therefore, it is necessary to increase the production and yield of many crops to feed the world's population in environmental conditions that are increasingly more unfavorable for cultivation [4,5]. This must be accomplished together with a greater awareness and respect for sustainability and the environment, specifically referring to uncontrolled irrigation and use of harmful fertilizers [5,6]. Thus, researchers and agriculture companies are planning studies to gain new scientific knowledge for developing sustainable crop growing strategies that are respectful of the environment. Some of these strategies are based on the application of biostimulant products [7], whose use has been observed to significantly increase crop yields due to the stimulation and improvement in physiological and metabolic processes of plants under conditions of soil and climate stress [8].

Biostimulant plant products, according to the UE 2009/1009 regulation [9], are defined as "products that stimulate the nutrition processes of plants independently of the nutrient content of the product, with the sole objective of improving the efficiency of the use of nutrients of plant crops, their tolerance to abiotic stress, their quality properties, or to increase the availability of nutrients that are immobilized in the soil or rhizosphere." These products can be formulated with different chemical families, among which we find (i) humic acids, (ii) hydrolyzed proteins, (iii) algae extracts, (iv) chitosan and biopolymers, (v) inorganic compounds, (vi) beneficial fungi, and (vii) beneficial bacteria [10]. However, in the last few years, a great quantity of free amino acids has been added to biostimulant products, as they have numerous effects on crops, such as (i) increasing the availability of nutrients and quality of plants, (ii) softening the negative effects of certain environmental stresses, (iii) acting as hormone precursors, (iv) acting as signaling factors for different physiological processes, such as glutamate receptors (GRL), (v) regulating the absorption of nitrogen, (vi) favoring the development of roots, and (vii) regulating antioxidant metabolism [8,11,12].

Although the positive impact of amino acid application is well known, there is little information on the role that each amino acid (AA) plays in physiological and metabolic processes. There is also a lack of information on their proper use, as AA effects depend on a combination of factors, such as the crop, the dose utilized, weather, manner and timing of application, and so on [13,14]. Therefore, to formulate custom biostimulant combinations that are specific and efficient, the first step is to know and understand the role that each AA plays in the physiological and metabolic processes of crops, and to identify the antagonistic, neutral, or synergistic effects that may occur when various amino acids are combined into a single formulation. Some studies have assayed the application of commercial biostimulants on tomato plants; for example, 'Fitomare'<sup>®</sup> increased drought tolerance [15], 'CycloFlow'<sup>®</sup> resulted in the best yield of plants grown under high temperatures [16], the combination of 'Tecamin Flower'<sup>®</sup> and 'Tecamin Brix'<sup>®</sup> utilized under saline conditions improved the yield and the quality of tomato fruits [17], and 'Megafol'<sup>®</sup> and 'Viva'<sup>®</sup> showed a positive response in plants whose nutrition was conventional [18]. However, all of these products were formulated with great quantities of compounds, and this hinders the understanding of the mechanisms responsible for improving the plant's tolerance to abiotic stresses.

Among the amino acids that are commonly utilized for formulate biostimulant products, we find tyrosine, lysine, and methionine, which are added either as free amino acids or as parts of hydrolyzed proteins. Tyrosine (Tyr) is an aromatic amino acid needed for the synthesis of proteins and metabolites with diverse physiological functions, such as antioxidants, pollinator attractants (betalain), and inducers of secondary metabolism defense compounds (rosmarinic acid, dhurrin, and benzyloisoquinoline alkaloids). This amino acid is synthesized downstream in the shikimate pathway, which is also a precursor for other aromatic AAs. The levels of Tyr in crops change depending on their stage of development, their types of tissues, and the species and variety [19]. Lysine is an amino acid involved in diverse responses against abiotic and biotic stresses through the sacharopine pathway (SACPATH) [20]. It is synthesized in the metabolic route of aspartate, which produces threonine, methionine, and isoleucine [21]. Methionine regulates the development of plants, and it is a precursor for metabolic responses in an ecosystem that help plants adapt to diverse environmental conditions [22,23]. Methionine also regulates the assimilation of polyamines, secondary metabolites,

and ethylene, aside from favoring resistance to abiotic stresses through the S-adenosyl methionine (SAM) pathway [23,24]. Rai [25] showed that exogenous application of this amino acid could help plants tolerate or resist various abiotic stresses. Nevertheless, limited scientific information has been found on the specific effect that individual application of these compounds has on the physiological and metabolic processes of plants, and even less information is available on the simultaneous application of these AAs as a mixture. Knowing all of these aspects could be very useful when formulating the newest generation of biostimulants, either through the addition of free amino acids or through the selection of raw materials that contain AAs in the ratio and concentration desired. Therefore, the main objective of the present study was to understand the effects that exogenous application of the amino acids tyrosine, lysine, and methionine, either individually or as a mixture, has on the physiological, metabolic, and nutritional processes of tomato plants of the 'Optima' variety, and to determine if these changes have an effect on the growth of the plants.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Growing Conditions and Plant Material

The study took place in a multi-tunnel greenhouse at the experimental field of the CEBAS "La Matanza", located in the municipality of Santomera (Murcia). To monitor the temperature, a cooling system and aluminum shade cloths (30%) were utilized, which maintain the optimum environmental conditions for the crops. The environmental characteristics of the greenhouse during the experiment were as follows: photosynthetically active radiation (PAR) of  $1000 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , day/night temperatures of  $32/19 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ , relative humidity (RH) day/night of  $52/80 \pm 5\%$ , and a natural photoperiod of 15 h.

For this study, tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) var. 'Optima' were utilized, obtained from the nursery Babyplant S.L. (Santomera, Murcia, Spain). The seedlings were transplanted to 3.5 L pots containing a "Universal" substrate (Projar professional, 2018, Quart de Poblet, Spain), after which they were placed in the greenhouse described above. The substrate was composed of 50% yellow and black peat, 40% coconut fiber, and 10% perlite. Once the plants were transplanted, water was applied at pH 8.3 and an electric conductivity (EC) of  $0.9 \text{ dS m}^{-1}$  in an irrigation system composed of lines containing  $4 \text{ L h}^{-1}$  self-compensating drippers. The volume of water applied was sufficient for drainage to be observed after each irrigation event. Two weeks after irrigating with only water, the plants were irrigated with 50% Hoagland nutrient solution for one minute a day, composed of  $\text{KNO}_3$  (27 g  $100 \text{ L}^{-1}$ ),  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (42 g  $100 \text{ L}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (7 g  $100 \text{ L}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4$  (13 g  $100 \text{ L}^{-1}$ ), Fe-EDTA (1 g  $100 \text{ L}^{-1}$ ), and micronutrients (1 g  $100 \text{ L}^{-1}$ ; Hidromix S, Valagro). After two weeks, the fertilization was increased to 100% Hoagland solution, twice a day, five minutes in the morning and five minutes in the afternoon. Additionally, there was 15% drainage after each irrigation. One week after irrigating with the 100% solution, the different AA treatments were applied.

### 2.2. Amino Acid Preparation

In this study, the amino acids tyrosine (Tyr), lysine (Lys), and methionine (Met) were assayed and were acquired from Calid Iberica (Barcelona, Spain). For the preparation of each AA (each was prepared independently), a stock solution for each was prepared by weighing 7 g and diluting with 100 mL of milliQ water. Once the stock solutions were prepared, the treatment solutions were prepared for foliar application, including (i) control treatment (milliQ water), (ii) treatment with Tyr (15 mM), (iii) treatment with Lys (15 mM), (iv) treatment with Met (15 mM), and (v) treatment with Tyr + Lys + Met (15 mM + 15 mM + 15 mM; a mix of the three AAs). The pH of each solution was adjusted to 5.5–7.5, and Tween-20 was added at a final concentration of 0.1%. Tween-20 is a wetting agent that improves and facilitates the adherence of solutions to the leaves of plants.

### 2.3. Application of the Treatments

Diverse treatments were applied so that most of the foliar area was covered by the formulations. This was done one week after starting the irrigation with 100% Hoagland nutrient solution. The day after application, the plants were sprayed with distilled water to ensure greater absorption of the product, as the leaf cuticle swells and its permeability increases. Treatments were applied to 12 plants (four experimental units with three plants per experimental unit).

### 2.4. Parameters Evaluated

#### 2.4.1. Gas Exchange Parameters

Gas exchange parameters were measured in fully expanded and developed leaves between 8:30 and 11:00 a.m. in two plants per experimental unit one week after foliar application. For this, a portable photosynthesis analyzer was utilized (PP System Ciras2, Hitchin, UK), whose measurement conditions were adjusted to a PAR = 1200  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and 400 ppm of  $\text{CO}_2$  in the measurement chamber. This equipment measured the net assimilation rate of  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{CO}_2}$ ) and stomatal conductance ( $g_s$ ), and it calculated the water use efficiency ( $\text{WUE} = A_{\text{CO}_2}/E_{\text{leaf}}$ , where  $E_{\text{leaf}}$  corresponds to the value of leaf transpiration obtained in each measurement) [26].

#### 2.4.2. Chlorophyll Fluorescence and Concentration Parameters

An FMS-2 portable modulated pulse fluorimeter (Hansatech Instruments Ltd., Pentney, UK) was utilized. Measurements were taken with the same plants used to determine the gas exchange parameters. The measurement conditions are described in Simón-Grao et al. [26]. The CL-01 portable measurement device (SPAD units, Hansatech) was utilized to measure the chlorophyll concentration, expressed as SPAD units.

#### 2.4.3. Growth Parameters

Height was recorded after measuring the chlorophyll fluorescence and gas exchange parameters before the final harvest, and the diameter of the plants was measured at three different heights. In the final sampling, the shoots (leaves and stem) were weighed with a Sartorius precision scale (Acculab). Afterwards, four leaflets were taken, weighted, and washed with deionized water. They were then dried in an oven at 60 °C for at least 48 h. This material was used to determine the concentration of mineral nutrients. Leaflets were also collected, frozen with liquid nitrogen, and stored at −80 °C for posterior metabolic analysis. Leaflet samples for the ionomic and metabolomic study were chosen randomly at a middle height of the plant, ensuring that these were fully developed.

#### 2.4.4. Measuring the Concentration of Mineral Nutrients in Leaf Tissues

The concentrations of Na, K, Mg, Ca, P, S, Fe, Cu, Mn, Zn, and B were determined from oven-dried leaf samples. These were ground to a fine powder and digested with  $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$  (5:3 v/v) using a microwave (CERM Mars Xpress, Matthews, NC, USA) with a temperature ramp that reached 200 °C. These were posteriorly analyzed using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, Franklin, TN, USA) [23]. Total C and N were analyzed with a Thermo Finnigan C/N elemental analyzer (Milan, Italy).

#### 2.4.5. Metabolomic Analysis of Leaf Tissues

A “non-directed” metabolomic analysis was performed with leaflet samples frozen in liquid nitrogen. These samples were lyophilized and ground to obtain a fine powder. The extraction protocol utilized to prepare the samples for nuclear magnetic resonance (NMR) was the same as that utilized by Van der Sar et al. [27], and the equipment utilized for the analysis was a 500 MHz Bruker spectrometer (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) with a 5 mm broadband Prodigy BBO  $\text{N}_2$  cryoprobe.

The NMR equipment provided a frequency graph of the detected signals. The resulting spectra were sent to the Chenomx NMR suite version 8.3 processor (Chenomx, Edmonton, Alberta, Canada) to quantify the metabolites, where the samples were standardized with Trimethylsilylpropionic acid sodium salt (TSP) internal standard, and the pH was maintained at around 6. This processor contains a large database that is used to detect metabolites found at concentrations greater than parts-per-million. Among the metabolites found and/or quantified, the following are underlined: aspartate, glutamate, alanine, glutamine, isoleucine, valine, tyrosine, proline, phenylalanine, citrate, formate, fumarate, malate, fructose, glucose, sucrose, 4-Aminobutyrate (GABA), and trigonelline [28,29].

### 2.5. Statistical Analysis

This study utilized a single-factor experimental design, in which the application of different AA treatments was studied. Statistical analysis consisted of one-way analysis of variance (ANOVA) (treatments) performed with the statistical package SPSS version 24. The values presented for each treatment were from a total of four biological units ( $n = 4$ ). When ANOVA was significant ( $p < 0.05$ ), Duncan's multiple range test was utilized to separate the means. Pearson's correlation coefficient was utilized with the same statistical package, which determined the linear relationship between the diverse variables. Student's  $t$  test was utilized to verify the existence of significant differences detected between the metabolites and the control. For this, the data were transformed through the square root of the value divided by 100. Likewise, a principal component analysis (PCA) and a cluster analysis (CA) were performed.

## 3. Results

### 3.1. Vegetative Growth Parameters

The vegetative growth parameters that were significantly affected by the treatments were the stem diameter and the dry weight of the shoot (Sh; Table 1). The control plants obtained values of 13 g plant<sup>-1</sup> and 11 mm plant<sup>-1</sup> for the shoot biomass and diameter of the stem, respectively. Exogenous foliar application of Tyr, Lys, Met, and Tyr + Lys + Met showed shoot (Sh) dry weight (dw) values greater than those of the control plants (between 19 and 21 g dry weight (dw)). Control plants had a greater stem diameter, although significant differences were only found for the Tyr and Tyr + Lys + Met treatments. As for the height, significant differences between the different treatments were not found (Table 1).

**Table 1.** Shoot (Sh) growth parameters measured in tomato plants of var. Optima one week after exogenous application of the amino acid (AA) treatments: Control (without AAs), L-Tyrosine (L-Tyr), L-Lysine (L-Lys), L-Methionine (L-Met), and the Tyr + Lys + Met combination.

Treatments	Height (cm)	Stem Diameter (mm)	Sh (g dw)
Control (w/o AAs)	39.3 ± 0.5	10.8 ± 0.1 a	13.3 ± 0.4 b
L-Tyr	41.0 ± 1.2	10.0 ± 0.2 b	21.2 ± 1.8 a
L-Lys	39.0 ± 1.4	10.1 ± 0.2 ab	19.0 ± 0.5 a
L-Met	41.5 ± 1.3	10.2 ± 0.2 ab	19.0 ± 0.4 a
Tyr + Lys + Met	41.6 ± 2.0	9.3 ± 0.3 c	18.8 ± 0.7 a
ANOVA	<i>ns</i>	**	***

In the analysis of variance (ANOVA), '*ns*' indicates non-significant differences with a confidence interval of 95%; \*\* and \*\*\* indicate significant differences at  $p < 0.01$  and  $0.001$ , respectively. Different lowercase letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the means, as established by Duncan's test ( $n = 4$ ).

### 3.2. Physiological Study

For the gas exchange parameter, significant differences were observed between the treatments. The control plants obtained values of  $A_{CO_2} = 16.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $g_s = 1196.3 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , and  $WUE = 2.38 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$  (Table 2). These values increased for  $A_{CO_2}$  and WUE and decreased for  $g_s$  with the AA treatments. Individual AA treatments increased  $A_{CO_2}$  up to 23% as compared to the control, while the Tyr + Lys + Met treatment increased  $A_{CO_2}$  up to 16% without significant difference from the control. As for the  $g_s$  parameter, the control plants obtained the highest values as compared to plants treated with the AAs. Among the latter, the plants treated with Tyr obtained the lowest values, followed by Met, Lys, and Tyr + Lys + Met. As for WUE, the lowest values were found in the control treatment, followed by Lys, Met, and Tyr + Lys + Met, and Tyr obtained the lowest values among AA-treated plants.

**Table 2.** Gas exchange and chlorophyll fluorescence parameter measurements in the Optima var. tomato plants one week after exogenous application of AA treatments: Control (without AAs), L-Tyrosine (L-Tyr), L-Lysine (L-Lys), L-Methionine (L-Met), and the Tyr + Lys + Met combination. Additionally shown are chlorophyll (Chl) values measured in completely developed leaves (DL) as well as leaf buds (LB).

Gas Exchange Parameters					
Treatments	$A_{CO_2}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$g_s$ ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	WUE ( $\mu\text{mol CO}_2$ $\text{mmol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ )		
Control (w/o AAs)	16.8 ± 1.5 b	1196.3 ± 105.7 a	2.38 ± 0.35 c		
L-Tyr	22.0 ± 1.3 a	162.8 ± 18.4 c	10.08 ± 0.70 a		
L-Lys	22.0 ± 1.4 a	498.7 ± 51.9 b	5.18 ± 0.15 b		
L-Met	21.6 ± 0.8 a	250.4 ± 21.7 c	5.79 ± 0.21 b		
Tyr + Lys + Met	19.6 ± 0.3 ab	507.6 ± 46.5 b	5.45 ± 0.24 b		
ANOVA	*	***	***		
Chl Fluorescence Parameters					
Treatments	Fv'/Fm'	$\Phi_{PSII}$	qP	Chl HD (SPAD)	Chl HB (SPAD)
Control (w/o AAs)	0.76 ± 0.011	0.70 ± 0.014	0.93 ± 0.005	24.8 ± 2.5 ab	20.1 ± 1.8 c
L-Tyr	0.80 ± 0.001	0.75 ± 0.003	0.94 ± 0.005	26.4 ± 2.4 ab	45.1 ± 2.8 ab
L-Lys	0.79 ± 0.013	0.74 ± 0.014	0.93 ± 0.003	30.7 ± 1.7 a	46.8 ± 3.6 a
L-Met	0.76 ± 0.030	0.71 ± 0.029	0.92 ± 0.006	30.8 ± 2.8 a	38.2 ± 3.7 ab
Tyr + Lys + Met	0.78 ± 0.013	0.73 ± 0.009	0.93 ± 0.008	20.2 ± 2.0 b	36.5 ± 2.2 b
ANOVA	ns	ns	ns	*	***

In the ANOVA, 'ns' indicates non-significant differences with a confidence interval of 95%; \* and \*\*\* indicate significant differences at  $p < 0.05$  and 0.001, respectively. Different lowercase letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the means, as established by Duncan's test ( $n = 4$ ).

As for chlorophyll fluorescence, ANOVA did not reveal significant differences between the different treatments (Table 2). The chlorophyll content measurements were significantly different in the fully developed leaves (DL) and the buds (LB). In this case, the control plants had chlorophyll values of 24.8 and 20.1 SPAD units for DL and LB, respectively (Table 2). The plants treated with Met had the highest chlorophyll (Chl) DL values, with 30.8 SPAD units (although only significant with the Tyr + Lys + Met treatment). On the other hand, plants treated with Lys had the highest LB values as compared with the other treatments (although this was only significant with the control and Tyr + Lys + Met treatments).

### 3.3. Ionic Study

The nutritional states of the plants one week after foliar application of the AAs were significantly different between the Ca, K, Mg, Na, P, B, Cu, Fe, and Mn treatments (Table 3). The control plants had the highest foliar concentrations, reaching values of 4.22, 4.25, 1.03, 0.34, and 0.46 g 100 g<sup>-1</sup> dw for Ca, K, Mg, Na, and P, respectively. AA treatments, independently of their nature, produced significant decreases in the foliar concentration, although a significant difference between AA treatments was found only for Na. Thus, the plants treated with Met and Lys obtained values that were lower than those treated with Tyr + Lys + Met.

**Table 3.** Concentration of macro (g 100 g<sup>-1</sup> dw) and micronutrients (ppm) quantified in leaves from the tomato plant of var. Optima one week after exogenous application of AA treatments: Control (without AAs), L-Tyrosine (L-Tyr), L-Lysine (L-Lys), L-Methionine (L-Met), and the Tyr + Lys + Met combination.

Macronutrients (g 100 g <sup>-1</sup> dw)						
Treatments	Ca	K	Mg	Na	P	N
Control (sin AAs)	4.22 ± 0.22 a	4.25 ± 0.14 a	1.03 ± 0.07 a	0.34 ± 0.02 a	0.46 ± 0.03 a	5.04 ± 0.21
L-Tyr	2.24 ± 0.07 b	3.00 ± 0.13 b	0.61 ± 0.04 b	0.14 ± 0.01 bc	0.28 ± 0.02 b	4.63 ± 0.14
L-Lys	2.45 ± 0.12 b	3.25 ± 0.04 b	0.72 ± 0.03 b	0.13 ± 0.01 c	0.33 ± 0.02 b	4.82 ± 0.32
L-Met	2.48 ± 0.06 b	3.22 ± 0.17 b	0.65 ± 0.04 b	0.14 ± 0.00 c	0.30 ± 0.03 b	4.75 ± 0.20
Tyr + Lys + Met	2.29 ± 0.16 b	3.12 ± 0.16 b	0.69 ± 0.05 b	0.18 ± 0.01 b	0.32 ± 0.02 b	4.33 ± 0.07
ANOVA	***	***	***	***	***	ns
Micronutrients (ppm)						
Treatments	B	Cu	Fe	Mn	Zn	
Control (sin AAs)	49.1 ± 3.7 a	9.1 ± 0.4 a	172.6 ± 11.7 b	78.3 ± 5.3 a	28.0 ± 1.0	
L-Tyr	37.8 ± 1.3 bc	5.0 ± 0.2 b	144.5 ± 10.9 b	56.8 ± 1.9 b	26.1 ± 1.1	
L-Lys	39.6 ± 2.5 b	5.0 ± 0.5 b	210.8 ± 8.5 a	65.4 ± 1.7 b	31.4 ± 2.5	
L-Met	31.6 ± 1.4 c	5.3 ± 0.3 b	149.7 ± 9.6 b	53.5 ± 4.8 b	28.4 ± 2.0	
Tyr + Lys + Met	40.2 ± 1.4 b	4.5 ± 0.3 b	157.7 ± 8.0 b	59.1 ± 3.5 b	24.5 ± 1.3	
ANOVA	***	***	**	**	Ns	

In the ANOVA, 'ns' indicates non-significant differences with a confidence interval of 95%; \*\* and \*\*\* indicate significant differences at  $p < 0.01$  and  $0.001$ , respectively. The different lowercase letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the means, as established by Duncan's test ( $n = 4$ ).

As for the micronutrients analyzed, the control plants obtained values of 49.1, 9.1, 172.6, 78.3, and 28.0 ppm for B, Cu, Mn, and Zn, respectively. As for B and Cu, the same was found for the micronutrients, in that the greatest concentration was found for plants not treated with AAs. In the case of Fe concentration, the greatest was found in the plants treated with Lys (210.8 g 100 g<sup>-1</sup> dw), while for the remaining treatments, the concentration ranged between 145 and 158 ppm (Table 3). Zn was the only microelement that was not significantly different between treatments.

### 3.4. Metabolomic Study

#### 3.4.1. Amino Acids

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) was utilized to detect the following AAs: glutamate, proline, glutamine, aspartate, alanine, phenylalanine, valine, tyrosine, and isoleucine. These amino acids can be divided into two groups according to their concentration. The first is composed of glutamate, proline, glutamine, and aspartate, whose concentrations were higher than 2 mg g<sup>-1</sup> dw, with glutamate having the highest concentration of 7.7 mg g<sup>-1</sup> dw. These amino acids represented 81% of the total; of this, 37% was glutamate, 25% proline, and 19% glutamine (Table 4, Figure S1). The second group was composed of alanine, phenylalanine, valine, tyrosine, and isoleucine, with concentrations lower than 1 mg g<sup>-1</sup> dw.

**Table 4.** Concentration of the amino acids ( $\text{mg g}^{-1}$  dw) quantified with NMR in leaves of the tomato plant of var. Optima one week after exogenous application of the AA treatments: Control (without AAs), L-Tyrosine (L-Tyr), L-Lysine (L-Lys), L-Methionine (L-Met), and the Tyr + Lys + Met combination.

Treatments	Amino Acids ( $\text{mg g}^{-1}$ dw)								
	Glutamate	Proline	Glutamine	Aspartate	Alanine	Phenylalanine	Valine	Tyrosine	Isoleucine
Control (w/o AAs)	7.71 ± 0.80	5.08 ± 0.41 b	4.01 ± 0.33 a	2.53 ± 0.19 b	0.52 ± 0.04	0.27 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.15 ± 0.01 c	0.17 ± 0.01 b
L-Tyr	7.36 ± 0.68	9.08 ± 0.81 a	1.82 ± 0.15 c	2.51 ± 0.23 b	0.47 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.00	0.92 ± 0.08 a	0.28 ± 0.00 a
L-Lys	7.79 ± 0.82	9.76 ± 1.05 a	1.45 ± 0.06 c	2.54 ± 0.14 b	0.60 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.01 c	0.26 ± 0.02 a
L-Met	7.38 ± 0.34	8.90 ± 0.79 a	1.84 ± 0.14 c	3.23 ± 0.18 a	0.64 ± 0.04	0.24 ± 0.02	0.25 ± 0.03	0.20 ± 0.02 c	0.28 ± 0.03 a
Tyr + Lys + Met	7.44 ± 0.77	8.98 ± 0.50 a	2.99 ± 0.03 b	2.24 ± 0.07 b	0.58 ± 0.04	0.20 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.68 ± 0.03 b	0.25 ± 0.02 a
ANOVA	<i>ns</i>	**	***	*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	***	*

In the ANOVA, '*ns*' indicates non-significant differences with a confidence interval of 95%; \*, \*\*, and \*\*\* indicate significant differences at  $p < 0.05$ , 0.01, and 0.001, respectively. The different lowercase letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the means, as established by Duncan's test ( $n = 4$ ).

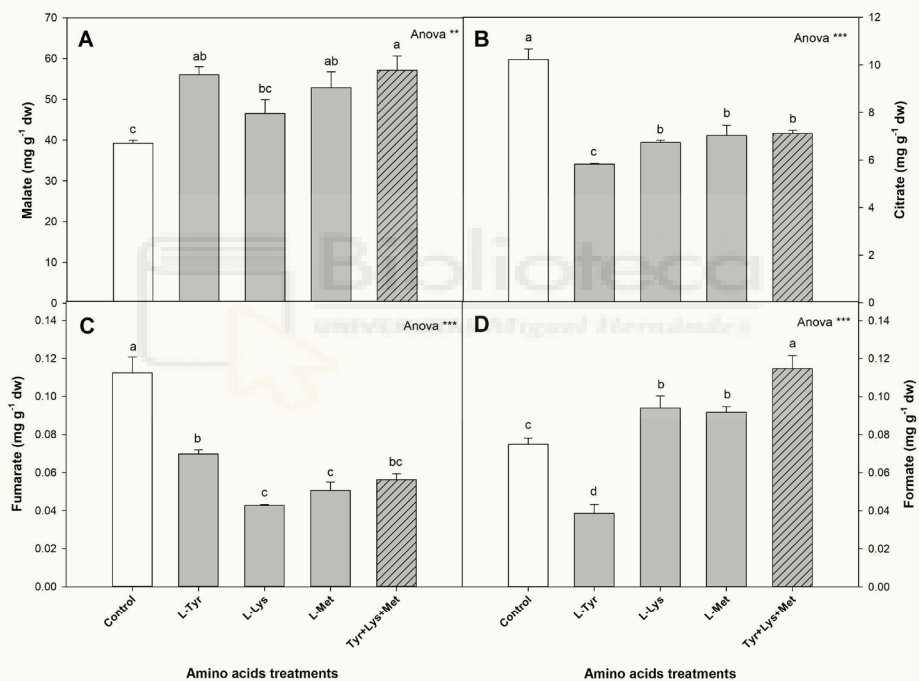




Foliar application of AAs changed the plant profile in the leaves with respect to those not treated with AAs. Applications of Tyr, Lys, Met, and their combination increased the concentration of proline from 5 to 9.18 mg g<sup>-1</sup> dw, with no differences observed between AA treatments. The concentration of glutamine decreased with the application of the four AA treatments with respect to the control treatment. This decrease was similar to the individual treatments with Tyr, Lys, and Met, and was lower than for the application of the Tyr + Lys + Met combination. The concentration of aspartate only increased with applications of Tyr and the Tyr + Lys + Met mix, and the concentration of isoleucine increased with the application of all four AA treatments.

### 3.4.2. Organic Acids

The organic acids identified and quantified with H-NMR in the tomato plant leaves were malate, citrate, fumarate, and formate (Figure 1), whose concentrations decreased from malate (39.2 mg g<sup>-1</sup> dw) to formate (0.07 mg g<sup>-1</sup> dw), so that the concentrations of malate and citrate represented 79% and 21%, respectively, of the total organic acids quantified (Figure S2).



**Figure 1.** Concentration of organic acids (mg g<sup>-1</sup> dw): malate (A), citrate (B), fumarate (C), and formate (D), quantified with nuclear magnetic resonance (NMR) in leaves of the tomato plant of var. Optima one week after exogenous application of the AA treatments: Control (without AAs), L-Tyrosine (L-Tyr), L-Lysine (L-Lys), L-Methionine (L-Met), and the Tyr + Lys + Met combination. In the ANOVA, \*\* and \*\*\* indicate significant differences at  $p < 0.01$  and 0.001, respectively. The different lowercase letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the means, as established by Duncan's test. The vertical bar indicates the standard error of the mean ( $n = 4$ ).

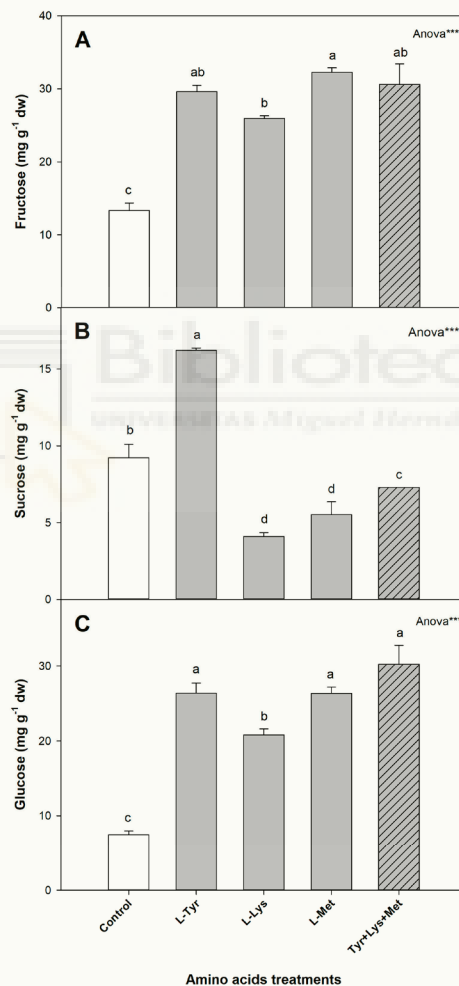
AA treatments changed the concentrations of organic acids in the leaves with respect to the control treatment. All AA treatments increased the concentration of malate significantly as compared to the control, with the Tyr + Lys + Met treatment reaching the highest value of 57.2 mg g<sup>-1</sup> dw. No significant differences were found between the control plants and those treated with lysine. As for citrate and fumarate, all AA-treated plants, independently from single AAs or their mixture, showed lower values as compared to the control. Significant differences were also observed between the AA treatments.



Thus, the plants treated with the Tyr + Lys + Met mixture had the lowest concentration of citrate as compared to the rest of the treatments, and the plants treated with Lys had the greatest concentration of fumarate (Figure 1). An increase in formate concentration was observed in the following order: Tyr < Lys = Met < Tyr + Lys + Met. However, despite the changes in plants after application of the diverse treatments, all AA concentrations relatively followed the same distribution pattern with respect to the control plants (Figure S2).

### 3.4.3. Sugars

NMR analysis identified and quantified the sugars fructose, glucose, and sucrose, with the highest being fructose (44%), followed by sucrose (31%) and glucose (25%) (Figures 2 and S3). The application of AA treatments affected the concentrations of these sugars.

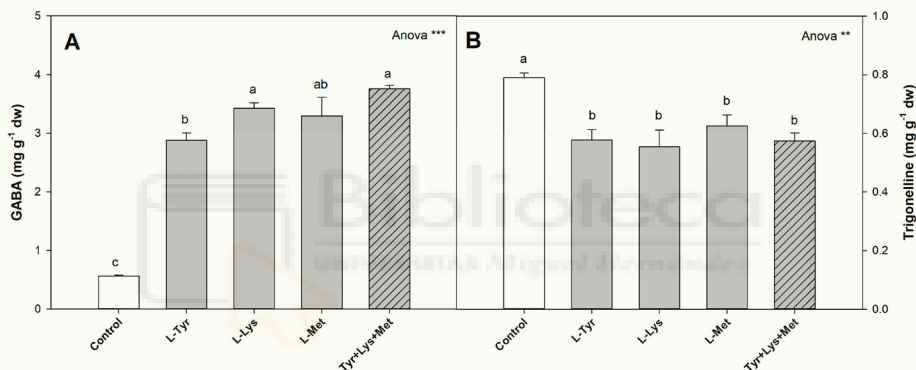


**Figure 2.** Concentration of sugars ( $\text{mg g}^{-1} \text{ dw}$ ): fructose (A), sucrose (B), and glucose (C), quantified with NMR in leaves of the tomato plant of var. Optima one week after exogenous application of the AA treatments: Control (without AAs), L-Tyrosine (L-Tyr), L-Lysine (L-Lys), L-Methionine (L-Met), and the Tyr + Lys + Met combination. In the ANOVA, \*\*\* indicates significant differences at  $p < 0.001$ . The different lowercase letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the means, as established by Duncan's test. The vertical bar indicates the standard error of the mean ( $n = 4$ ).

For fructose, the AA treatments increased the concentration significantly with respect to the control. Among the AA treatments, the greatest value was found for Met and the lowest for Lys. For sucrose, two different responses were observed: an increase with the application of Tyr, reaching a value of  $16.2 \text{ mg g}^{-1} \text{ dw}$ , and a decrease with the application of Lys, Met, and the AA mixture, with the lowest concentration obtained for Lys ( $4.1 \text{ mg g}^{-1} \text{ dw}$ ). The concentration of glucose increased significantly in all AA treatments with respect to the control treatment. Between the AA treatments, the lowest value was found for Lys.

#### 3.4.4. Other Metabolites

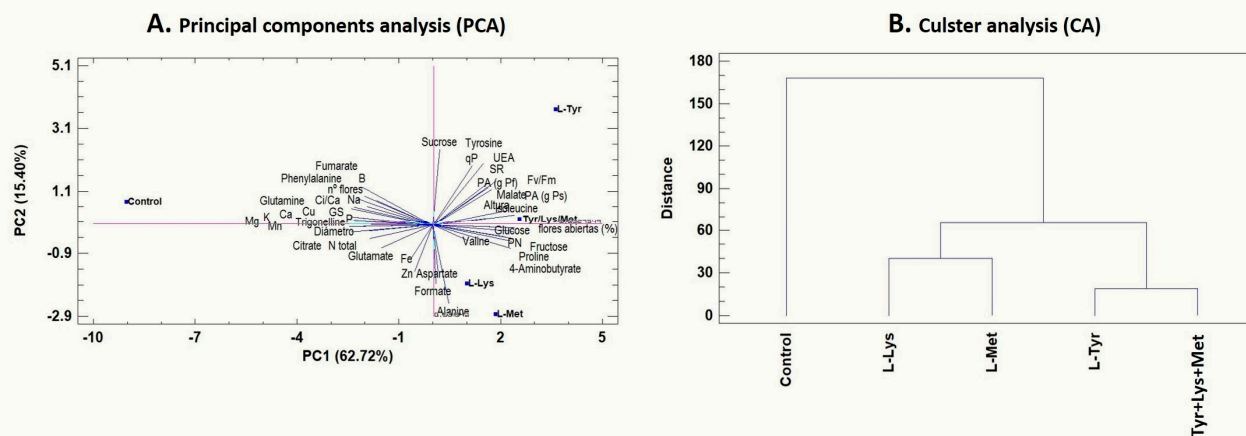
Other metabolites were also quantified, such as 4-Aminobutyrate (GABA) and trigonelline (Figure 3); in control conditions (without AAs), their concentrations were  $0.56$  and  $0.79 \text{ mg g}^{-1} \text{ dw}$ , respectively. Both compounds showed significant differences in treatment application. The concentration of GABA increased with the application of AAs as compared to the control, with the Tyr + Lys + Met treatment greatly increasing its concentration ( $3.8 \text{ mg g}^{-1} \text{ dw}$ ). Trigonelline, on the other hand, suffered a decrease when the AAs were applied to the plants. This decrease was similar for the four AA treatments, with a range of values between  $0.55$  and  $0.62 \text{ mg g}^{-1} \text{ dw}$ .



**Figure 3.** Concentrations of 4-Aminobutyrate (GABA) (A) and trigonelline (B) ( $\text{mg g}^{-1} \text{ dw}$ ) quantified with NMR in leaves of the tomato plant of var. Optima one week after exogenous application of the AA treatments: Control (without AAs), L-Tyrosine (L-Tyr), L-Lysine (L-Lys), L-Methionine (L-Met), and the Tyr + Lys + Met combination. In the ANOVA, \*\* and \*\*\* indicate significant differences at  $p < 0.01$  and  $0.001$ , respectively. The different lowercase letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the means, as established by Duncan's test. The vertical bar indicates the standard error of the mean ( $n = 4$ ).

#### 3.5. Principal Component Analysis (PCA) and Cluster Analysis

Figure 4 shows the results of the principal component analysis and the cluster analysis. The three main components explained 90.49% of variance, represented as PC1, PC2, and PC3. It was noted that PC1 (62.72%) explained the Sh ( $\text{g dw}$ ), number of flowers, open flowers (%),  $g_s$ , Ci/Ca, Ca, K, Mg, Na, P, Cu, Mn, isoleucine, proline, citrate, malate, fructose, glucose, 4-Aminobutyrate, and trigonelline. The cluster analysis showed two completely different groups: one composed of the control group and the other of the AA treatments. In the latter, two distinct groups could be distinguished: one composed of Met and Lys and another one composed of Tyr and Tyr + Lys + Met.



**Figure 4.** Principal component analysis (PCA) (A) and Cluster analysis (CA) (B) of leaves of the tomato plant of var. Optima one week after exogenous application of the AA treatments: Control (without AAs), L-Tyrosine (L-Tyr), L-Lysine (L-Lys), L-Methionine (L-Met), and the Tyr + Lys + Met combination.



#### 4. Discussion

The application of amino acids is an agricultural practice that is becoming more widespread, as it supports sustainable agriculture thanks to the role that amino acids play in the physiological, metabolic, and biochemical processes of plants (e.g., water relations, photosynthesis, antioxidant capacity, nutrient absorption, and stress signaling, to name a few), which have an effect on the plant's vegetative and reproductive development as well as the quality of the crops [12]. Thus, amino acids are some of the most utilized components when formulating biostimulants. These can be added as free amino acids or through sources of botanical or animal origin that contain a great number and concentration of amino acids [11]. However, to achieve greater efficiency in the use of biostimulant products, it is important to first understand the effects that individual AAs have on the physiological, biochemical, and metabolic processes for each crop of interest, and also to determine the possible antagonistic, synergistic, or neutral effects when these are applied as mixtures.

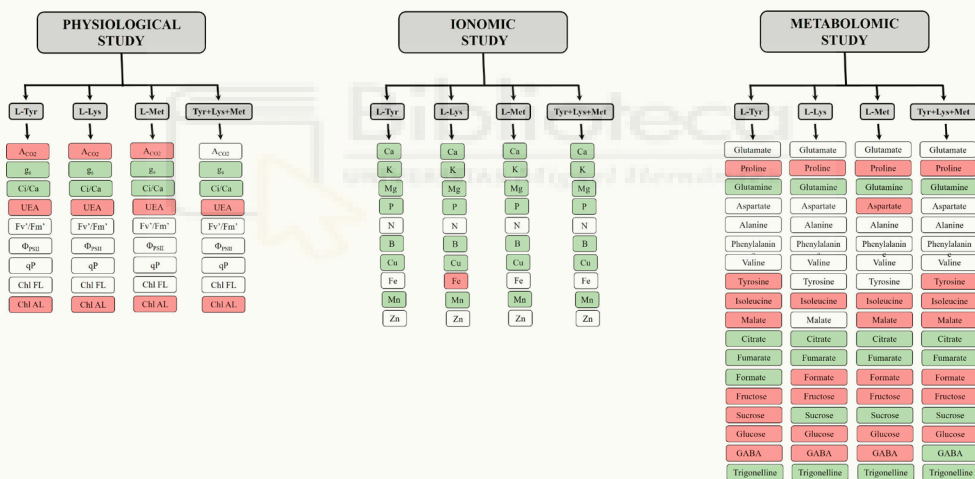
In our assays, exogenous application of amino acids, either individually (Tyr, Lys, and Met) or as a mixture (Tyr + Lys + Met), significantly increased the growth rate of tomato plants as compared to the control plants. Therefore, foliar application of these AAs has beneficial effects on tomato plants (Table 1). In other studies, it was also observed that application of these AAs had positive effects on the crops. In a study conducted by El-Sherbeny and da Silva [30] in beet plants, foliar application of tyrosine at a concentration of 0.55 mM increased the vegetative growth of the plants. Additionally, an assay performed with lettuce plants grown in a hydroponic system to which methionine was applied through the roots showed that this application notably improved the performance of the crop [11]. Likewise, in an experiment with tomato plants grown in a hydroponic system and under salt stress, Met treatment mitigated the negative effects of salinity [23]. Lastly, these positive effects of Met application were also previously verified in caupi pea plants under drought conditions [31], and in bitter melon plants as well [32].

The combined application of Tyr + Lys + Met did not alter the plant response with respect to individual AA application. Therefore, the combination of these three AAs had a neutral effect, as it did not improve or worsen the outcome. However, synergistic or antagonistic interactions between the AAs have been observed in other studies. For example, in a study conducted with tomato plants grown under saline treatments, an antagonistic effect was observed when methionine and arginine were applied together, as the combined application of these two amino acids had negative effects on the plants. In the same study, a synergistic effect was found for the simultaneous application of proline and glutamic acid, as the response of the plants was better than when these AAs were applied separately [23]. However, in a study conducted with lettuce plants, where glycine and glutamine were applied individually or combined, no important differences were found in the results [33]. In a treatment with soy seeds, a synergistic effect with the AAs cysteine, phenylalanine, glycine, and glutamate was observed when these were applied as a mixture [12].

Individual application of Tyr, Lys, and Met stimulated physiological processes of plants, as observed in the gas exchange data (Table 2), in which  $A_{CO_2}$  increased by 30% with respect to the control plants. AA application also downregulated stomatal conductance and leaf transpiration (data not shown). The ratio between  $A_{CO_2}$  and leaf transpiration (a ratio known as water use efficiency, WUE) increased with the application of AA treatments with respect to the control plants, and this parameter was higher in plants from the Tyrosine treatment. High WUE values are beneficial to crops, as they indicate that for the same quantity of water transpired, they are able to produce a greater biomass, allowing the plants to regulate and save water in a sustainable manner during their development cycle. Thus, with these data, it can be concluded that the applications of Tyr, Lys, and Met induced an increase in WUE in plants by regulating non-stomatal factors (even when the concentration of substomatal  $CO_2$  decreased and  $A_{CO_2}$  increased) and stomatal factors (regulation of stomata opening and closing).

In photosynthesis, there are various non-stomatal factors, such as the photochemical efficiency of photosystem II, the carboxylation efficiency, the activity of photosynthetic enzymes, and the chlorophyll

concentration [34,35]. The results of chlorophyll fluorescence in our assays allowed us to conclude that application of these AAs induced an increase in  $A_{CO_2}$  through the biochemical reactions of C metabolism and not through the light-dependent processes of photosynthesis, as changes were not observed in the  $qP$ ,  $Fv'/Fm'$ , and  $\Phi_{PSII}$  parameters (Figure 5). However, these AAs increased the concentration of chlorophylls, which could be the reason why  $A_{CO_2}$  increased. Some evidence of  $A_{CO_2}$  and  $g_s$  regulation has already been published by Kong et al. [36], but the possible mechanisms involved in these effects are still unknown. Bakry et al. [37] observed that exogenous application of Tyr in concentrations of 0.27, 0.55, and 0.83 mM improved growth by increasing the photosynthetic pigments of the plants. Likewise, in an assay with lettuce plants to which Met was applied through the roots in a hydroponic system, better results were obtained with the lowest doses (0.0013 and  $1.3 \cdot 10^{-7}$  mM), highlighting that these doses improved the photosynthetic activity and also showed an increase in performance. It was also demonstrated that higher doses damaged the photosynthesis machinery [11]. On the other hand, in an experiment conducted with bean plants irrigated with seawater, to which a commercial product based on amino acids was applied at different concentrations, a relationship between the AAs and photosynthetic production was established [38]. However, foliar application of two commercial products, 'Kadoustim'<sup>®</sup> and 'Humi Fort'<sup>®</sup>, composed of AAs, did not show an increase in photosynthetic parameters [39]. In conclusion, these studies confirm that the response mechanisms involved are still unknown, and this could be due to the great variability existing between amino acids, doses, crops to which these are applied, timing, and manner of application.



**Figure 5.** Summary of the relative results with respect to the control obtained after foliar application of the AA treatments: Control (without AAs), L-Tyrosine (L-Tyr), L-Lysine (L-Lys), L-Methionine (L-Met), and the Tyr + Lys + Met combination. The red or green colors indicate a significant increase or decrease, respectively, in metabolite concentration in AA-treated plants as compared to the control treatment. The white color indicates that no significant difference between the control and the corresponding AA treatment was found.

In the ionic study, all the plants, independently of the treatment, had leaf nutrient concentrations within normal ranges for tomato crops (Table 3; [40]). However, this concentration was lower (Ca, K, Mg, and P) in the plants treated with AAs. This result indicates that the AA treatments inhibited absorption of the nutrients; however, this result may be related with a dilution effect that may occur when shoot mass increases by 46%. The decrease in concentration of minerals, without being affected by the growth parameters or  $A_{CO_2}$ , could also indicate that application of these AAs increases the nutrient efficiency, meaning that for a given lower concentration of nutrients in the leaves, these plants are able to increase their growth and stimulate their physiological processes, as compared to plants not

treated with AAs. A different model from the one stated previously was only observed for N and Fe. In the case of N, this could be due to the extra supply of N given to the plants treated with the AAs. The relationship between the AAs and N assimilation is more related to the general levels found in the cell than to the accumulation of a specific AA [41]. On the other hand, more recent studies have shown that Ca is an essential element for plants, and it also plays an important role in N assimilation. Lastly, an appropriate supply of Ca can considerably increase nitrate transport and also increase the concentration of amino acids in leaves and roots [42].

Our metabolic study showed that application of AAs, independent of treatment, changed the aminogram of the leaves: the concentration of proline increased and that of glutamine decreased. This indicates that for our plants treated with exogenous AAs, proline was the main amino acid, and glutamine increased its concentration near aspartate values (Table 4, Figure S1). Proline is an amino acid that plays multiple roles in plants, including osmotic adjustment, stabilization of membranes and proteins, reserving carbon and nitrogen, inhibition of reactive oxygen species (ROS), etc. [43,44]. The increase in this AA due to exogenous applications of Tyr, Lys, and Met led to a better response of the plants to environmental conditions. Although the plants were not subjected to abiotic stress during the experiment, the temperatures commonly reached inside a greenhouse located in the Mediterranean region, especially at midday, could affect their development, so that an increase in endogenous proline could have palliated the negative effects caused by environmental factors. Along the same line, we found an increase in isoleucine in all AA treatments and an increase in tyrosine in the treatments with Tyr and Tyr + Lys + Met. Tyrosine and isoleucine have specific functions in crops. It is known that branched amino acids such as isoleucine play a fundamental role in a plant's tolerance to stresses, and this could be due to the adjustment of intracellular pH, accumulation of osmolytes, and the detoxification of reactive oxygen species (ROS), xenobiotics, and heavy metals. This AA could also be an alternative source of C under stress, given that branched amino acids promote their own degradation during specific times, such as seed germination and senescence, or at times when sugars are lacking [45]. This is also corroborated by Li et al. [46], attesting that accumulation of isoleucine could palliate the negative effects of salinity by improving glycolysis. Among the many functions of Tyr, pollinator attraction, defense, and a greater structural support are attributed to the greater assimilation of lignin [19]. This amino acid is synthesized in the shikimate route, more specifically starting with chorismate. This route is a starting point for the biosynthesis of carbocyclic aromatic compounds, and it is also a precursor for other AAs, such as phenylalanine and tryptophan. In addition, chorismate is involved in the synthesis of vitamins K and E, folate, plastoquinones, and co-enzyme Q [21].

NMR analysis identified the compounds malate, citrate, fumarate, and formate as the major organic acids. These compounds participate in the tricarboxylic acid cycle (citrate, fumarate, and malate) and the pentose phosphate pathway (formate). The organic acid profile, according to their concentrations, followed the order malate > citrate > fumarate = formate (Figure S2). This order did not change with the application of different AAs, although the concentration of these compounds was affected by the AA treatments with respect to the control plants. These data indicate that application of AAs modifies the metabolic processes in the plants. A generalized response was observed with the application of Tyr, Lys, Met, and their mixture, based on an increase in the concentration of malate and a decrease in the concentration of citrate and fumarate in all AA treatments. The increase in malate in the Krebs cycle (major acid) could indicate that treatments with AAs induced a greater influx of C to the glycolysis cycle, which could generate greater oxidation power (redox potential) and energy (NADH, FADH<sub>2</sub>, and ATP) with respect to the plants that were not treated with the AAs [47].

The major sugars in tomato plant leaves are fructose, sucrose, and glucose (Figure 2). In control plants, their concentrations decreased in the following order: fructose > sucrose > glucose. However, when the AAs were applied, the order changed to fructose > glucose > sucrose. Therefore, the AAs could have promoted a greater influx of C into the plant, thereby increasing the concentrations of fructose and glucose, so that the increase in glucose shuttled more C to the glycolysis reactions as

compared to the synthesis of sucrose. This would result in the plant having greater redox potential and more C and energy available for its growth [47].

GABA is a non-proteinogenic amino acid that can temporarily store nitrogen, thereby reducing excess accumulation of amines produced during photorespiration and maintaining appropriate pH. The synthesis of GABA is catalyzed by the enzyme glutamate decarboxylase (GAD) and liberates CO<sub>2</sub> under drought stress conditions, which promotes correct functioning of the Calvin cycle with closed or semi-closed stomata. Thus, pressure on the photosynthetic electron chain is relieved, the concentration of ROS decreases, and photodamage to leaf tissues is curbed. GABA can act as an osmolyte with no toxic effects in equilibrating the water potential during cellular dehydration, and it works as an antioxidant to stabilize and protect thylakoids and macromolecules [48].

## 5. Conclusions

In this study, foliar applications of Tyr, Lys, and Met at concentrations of 15 mM had beneficial effects on tomato plants, as an increase in vegetative growth was observed compared to the control plants. This was due to the treatments stimulating A<sub>CO2</sub> and increasing the efficient use of nutrients; therefore, despite the reduced concentration of minerals, this did not limit the physiological processes. Another interesting result from the experiments was that treatments with AAs increased the water use efficiency as a result of the increase in A<sub>CO2</sub> as well as a reduction in g<sub>s</sub>. Thus, application of these AAs could be useful for agronomic strategies directed towards saving water and, therefore, will support the practice of sustainable agriculture. Our metabolic study indicated that greater vegetative growth of the plants treated with AAs could be due to (i) increased proline concentration in the plants, which is an AA related to the processes of osmotic adjustment and protection against adverse environmental factors; (ii) the greater increase in A<sub>CO2</sub> rate, promoting additional carbon in the shape of fructose and glucose, which are destined towards the processes of glycolysis and the Krebs cycle to obtain a greater reducing power and energy, as well as more C molecules needed for the growth of the plants. To link metabolic profiles with vegetative growth, artificial intelligence will be needed in the future to estimate how plant growth is initiated with these metabolic profiles.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2071-1050/12/22/9729/s1>, Figure S1: Profile of AA concentration (%) quantified with NMR in leaves of the tomato plant of var. Optima one week after exogenous application of the AA treatments: Control (without AAs), L-Tyrosine (L-Tyr), L-Lysine (L-Lys), L-Methionine (L-Met), and the Tyr + Lys + Met combination. \* indicates significant differences ( $p < 0.05$ ) between the means as established by Student's *t* test ( $n = 4$ ). Figure S2: Profile of organic acid concentrations (%) quantified with NMR in leaves of the tomato plant of var. Optima one week after exogenous application of the AA treatments: Control (without AAs), L-Tyrosine (L-Tyr), L-Lysine (L-Lys), L-Methionine (L-Met), and the Tyr + Lys + Met combination. \* indicates significant differences ( $p < 0.05$ ) between the means as established by Student's *t* test ( $n = 4$ ). Figure S3: Profile of sugar concentration (%) quantified with NMR in leaves of the tomato plant of var. Optima one week after exogenous application of the AA treatments: Control (without AAs), L-Tyrosine (L-Tyr), L-Lysine (L-Lys), L-Methionine (L-Met), and the Tyr + Lys + Met combination. \* indicates significant differences ( $p < 0.05$ ) between the means as established by Student's *t* test ( $n = 4$ ).

**Author Contributions:** F.G.-S., E.A.Z.-G. and I.S. conceived the idea and designed the experiments; M.A.-S., S.S.-G. and V.L. performed the experiments; M.A.-S., J.M.C.-Z., J.J.M.-N. and W.M.R.-O. contributed to the analysis and discussion of results; M.A.-S. wrote the first draft of the paper, and all authors contributed to improving the paper. All authors assisted in writing and improving the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the State R&D Program Oriented to the Challenges of the Society, Innovation, and Ministerial Science (Spain government), grant number RTC-2016-4568-2.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.



## Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

AAs	amino acids
A <sub>CO2</sub>	net assimilation of CO <sub>2</sub>
CA	cluster analysis
Chl HD	chlorophyll in completely developed leaves
Chl HB	chlorophyll in leaf buds
Fv'/Fm'	antenna efficiency of photosystem II
Φ <sub>PSII</sub>	quantum efficiency of photosystem II
g <sub>s</sub>	stomatal conductance
Lys	lysine
Met	methionine
PCA	principal component analysis
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Tyr	tyrosine
WUE	water use efficiency

## References

1. Tonhati, R.; Mello, S.C.; Momesso, P.; Pedroso, R.M. L-proline alleviates heat stress of tomato plants grown under protected environment. *Sci. Hortic.* **2020**, *268*, 109370. [CrossRef]
2. Chavan, R.F.; Sakhal, B.K. Studies on the effect of exogenous application of salicylic acid on post-harvest quality and shelf life of tomato fruit Cv. Abhinav. *Food Res.* **2020**, *4*, 1444–1450. [CrossRef]
3. Food and Agriculture Organization (FAO). Datos Sobre Alimentación en Agricultura (FAOSTAT). Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (accessed on 14 September 2020).
4. Parry, M.L. *Climate Change and World Agriculture*, 1st ed.; Routledge: London, UK, 2019.
5. Mutale-Joan, C.; Redouane, B.; Najib, E.; Yassine, K.; Lyamlouli, K.; Laila, S.; Zeroual, Y.; El Arroussi, H. Screening of microalgae liquid extracts for their bio stimulant properties on plant growth, nutrient uptake and metabolite profile of *Solanum lycopersicum* L. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1. [CrossRef]
6. Foley, J.A.; Ramankutty, N.; Brauman, K.A.; Cassidy, E.S.; Gerber, J.S.; Johnstone, M.; Mueller, N.D.; O'Connell, C.; Ray, D.K.; West, P.C.; et al. Solutions for a cultivated planet. *Nature* **2011**, *478*, 337–342. [CrossRef]
7. Lucini, L.; Roupael, Y.; Cardarelli, M.; Canaguier, R.; Kumar, P.; Colla, G. The effect of a plant-derived biostimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions. *Sci. Hortic.* **2015**, *182*, 124–133. [CrossRef]
8. Roupael, Y.; Colla, G. Editorial: Biostimulants in Agriculture. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 124–133. [CrossRef]
9. Reglamento (UE) 2019/1009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 5 de Junio de 2020. Available online: <https://www.boe.es/doue/2019/170/L00001-00114.pdf> (accessed on 21 September 2020).
10. Du Jardin, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic.* **2015**, *196*, 3–14. [CrossRef]
11. Khan, S.; Yu, H.; Li, Q.; Gao, Y.; Sallam, B.N.; Wang, H.; Liu, P.; Jiang, W. Exogenous application of amino acids improves the growth and yield of lettuce by enhancing photosynthetic assimilation and nutrient availability. *Agronomy* **2019**, *9*, 266. [CrossRef]
12. Teixeira, W.F.; Fagan, E.B.; Soares, L.H.; Umburanas, R.C.; Reichardt, K.; Neto, D.D. Foliar and seed application of amino acids affects the antioxidant metabolism of the soybean crop. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 327. [CrossRef]
13. Parađiković, N.; Teklić, T.; Zeljković, S.; Lisjak, M.; Špoljarević, M. Biostimulants research in some horticultural plant species—A review. *Food Energy Secur.* **2019**, *8*, 2. [CrossRef]
14. Colla, G.; Nardi, S.; Cardarelli, M.; Ertani, A.; Lucini, L.; Canaguier, R.; Roupael, Y. Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* **2015**, *196*, 28–38. [CrossRef]
15. Simón-Grao, S.; Garcia-Sanchez, F.; Alfosea-Simón, M.; Simón, I.; Lidón, V.; Ortega, W.M.R. Study on the foliar application of fitomare<sup>®</sup> on drought tolerance of tomato plants. *IJPAES* **2016**, *6*, 15–21.

16. Francesca, S.; Arena, C.; Hay Mele, B.; Schettini, C.; Ambrosino, P.; Barone, A.; Rigano, M.M. The use of a plant-based biostimulant improves plant performances and fruit quality in tomato plants grown at elevated temperatures. *Agronomy* **2020**, *10*, 363. [[CrossRef](#)]
17. Maach, M.; Boudouasar, K.; Akodad, M.; Skalli, A.; Moumen, A.; Baghour, M. Application of biostimulants improves yield and fruit quality in tomato. *Int. J. Veg. Sci.* **2020**, 1–6. [[CrossRef](#)]
18. Klokić, I.; Koleška, I.; Hasanagić, D.; Murtić, S.; Bosančić, B.; Todorović, V. Biostimulants' influence on tomato fruit characteristics at conventional and low-input NPK regime. *Acta Agric. Scand. B Plant Soil Sci.* **2020**, *70*, 233–240. [[CrossRef](#)]
19. Schenck, C.A.; Maeda, H.A. Tyrosine biosynthesis, metabolism, and catabolism in plants. *Phytochemistry* **2018**, *149*, 82–102. [[CrossRef](#)]
20. Arruda, P.; Barreto, P. Lysine Catabolism Through the saccharopine pathway: Enzymes and intermediates involved in plant responses to abiotic and biotic stress. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 587. [[CrossRef](#)]
21. D'Mello, J.P.F. *Amino Acids in Higher Plants*; D'Mello, J.P.F., Ed.; CABI International: Edinburgh, UK, 2015.
22. Amir, R.; Hacham, Y.; Galili, G. Cystathionine  $\gamma$ -synthase and threonine synthase operate in concert to regulate carbon flow towards methionine in plants. *Trends Plant Sci.* **2002**, *7*, 153–156. [[CrossRef](#)]
23. Alfosea-Simón, M.; Zavala-Gonzalez, E.A.; Camara-Zapata, J.M.; Martínez-Nicolás, J.J.; Simón, I.; Simón-Grao, S.; García-Sánchez, F. Effect of foliar application of amino acids on the salinity tolerance of tomato plants cultivated under hydroponic system. *Sci. Hortic.* **2020**, *272*, 109509. [[CrossRef](#)]
24. Capaldi, F.R.; Gratão, P.L.; Reis, A.R.; Lima, L.W.; Azevedo, R.A. Sulfur metabolism and stress defense responses in plants. *Trop. Plant Biol.* **2015**, *8*, 60–73. [[CrossRef](#)]
25. Rai, V.K. Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biol. Plant.* **2002**, *45*, 481–487. [[CrossRef](#)]
26. Simón-Grao, S.; Nieves, M.; Cámara-Zapata, J.M.; Martínez-Nicolás, J.J.; Rivero, R.M.; Fernández-Zapata, J.C.; García-Sánchez, F. The Forner Alcaide n° 5 citrus genotype shows a different physiological response to the excess of boron in the irrigation water in relation to its two genotype progenitors. *Sci. Hortic.* **2019**, *245*, 19–28. [[CrossRef](#)]
27. Van der Sar, S.; Kim, H.K.; Meissner, A.; Verpoorte, R.; Choi, Y.H. Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy for plant metabolite profiling. *Handb. Plant Metab.* **2013**, 57–76. [[CrossRef](#)]
28. Duynhoven, J.V.; Van As, H.; Belton, P.S.; Webb, G.A. *Magnetic Resonance in Food Science: Food for Thought*, 1st ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2013.
29. Becerra-Martínez, E.; Florentino-Ramos, E.; Pérez-Hernández, N.; Zepeda-Vallejo, L.G.; Villa-Ruano, N.; Velázquez-Ponce, M.; García-Mendoza, F.; Bañuelos-Hernández, A.E.  $^1\text{H}$  NMR-based metabolomic fingerprinting to determine metabolite levels in serrano peppers (*Capsicum annum* L.) grown in two different regions. *Food Res. Int.* **2017**, *102*, 163–170. [[CrossRef](#)]
30. El-Sherbeny, M.; da Teixeira Silva, J.A. Foliar treatment with proline and tyrosine affect the growth and yield of beetroot and some pigments in beetroot leaves. *J. Hortic. Res.* **2013**, *21*, 95–99. [[CrossRef](#)]
31. Merwad, A.R.M.A.; Desoky, E.S.M.; Rady, M.M. Response of water deficit-stressed *Vigna unguiculata* performances to silicon, proline or methionine foliar application. *Sci. Hortic.* **2018**, *228*, 132–144. [[CrossRef](#)]
32. Akram, N.A.; Umm, E.H.; Ashraf, M.; Ashraf, M.; Sadiq, M. Exogenous application of L-methionine mitigates the drought-induced oddities in biochemical and anatomical responses of bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Sci. Hortic.* **2020**, *267*, 109333. [[CrossRef](#)]
33. Noroozlo, Y.A.; Souri, M.K.; Delshad, M. Stimulation Effects of Foliar Applied glycine and glutamine amino acids on lettuce growth. *Open Agric.* **2019**, *4*, 164–172. [[CrossRef](#)]
34. Yordanova, R.; Popava, L. Effect of exogenous treatment with salicylic acid or photosynthetic activity and antioxidant capacity of chilled wheat plants. *Gen. Appl. Plant Physiol.* **2007**, *33*, 155–170.
35. Nishiyama, Y.; Allakhverdiev, S.I.; Murata, N. Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Physiol. Plant* **2011**, *142*, 35–46. [[CrossRef](#)]
36. Kong, D.; Hu, H.C.; Okuma, E.; Lee, Y.; Lee, H.S.; Munemasa, S.; Cho, D.; Ju, C.; Pedoeim, L.; Rodriguez, B.; et al. L-Met activates arabidopsis GLR  $\text{Ca}^{2+}$  channels upstream of ROS production and regulates stomatal movement. *Cell Rep.* **2016**, *17*, 2553–2561. [[CrossRef](#)]
37. Bakry, B.A.; Sadak, M.S.; Abd El-Monem, A.A. Physiological aspects of tyrosine and salicylic acid on morphological, yield and biochemical constituents of peanut plants. *PJBS* **2020**, *23*, 375–384.
38. Sadak, M.S.; Abdelhamid, M.T.; Schmidhalter, U. Effect of foliar application of aminoacids on plant yield and some physiological parameters in bean plants irrigated with seawater. *Acta Biol. Colomb.* **2015**, *20*, 141–152.

39. Molaie, H.; Panahi, B.; Tajabadipour, A. The effect of foliar application of some amino acid compounds on photosynthesis and yield of two commercial cultivars in pistachio orchards of Kerman province in Iran. *IJACS* **2013**, *5*, 2827–2830.
40. Watanabe, T.; Maejima, E.; Yoshiruma, T.; Urayama, M.; Yamauchi, A.; Owadano, M.; Okada, R.; Osaki, M.; Kanayama, Y.; Shinano, T. The ionic study of vegetable crops. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0160273. [[CrossRef](#)]
41. Padgett, P.E.; Leonard, R.T. Free amino acid levels and the regulation of nitrate uptake in maize cell suspension cultures. *J. Exp. Bot.* **1996**, *47*, 871–883. [[CrossRef](#)]
42. Xing, Y.; Zhu, Z.L.; Wang, F.; Zhang, X.; Li, B.Y.; Liu, Z.X.; Wu, X.X.; Ge, S.F.; Jiang, Y.M. Role of calcium as a possible regulator of growth and nitrate nitrogen metabolism in apple dwarf rootstock seedlings. *Sci. Hortic.* **2021**, *276*, 109740. [[CrossRef](#)]
43. Dar, M.I.; Naikoo, M.I.; Rehman, F.; Naushin, F.; Khan, F.A. Proline accumulation in plants: Roles in stress tolerance and plant development. In *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies*; Iqbal, N., Nazar, R., Khan, N.A., Eds.; Springer: New Delhi, India, 2016; pp. 155–166.
44. Pervaiz, A.; Iqbal, A.; Khalid, A.; Manzoor, A.; Noreen, S.; Ayaz, A.; Zafar, Z.; Athar, H.; Ashraf, M. Proline induced modulation in physiological responses in wheat plants. *J. Agric. Environ. Sci.* **2019**, *8*, 112–119. [[CrossRef](#)]
45. Joshi, V.; Joung, J.G.; Fei, Z.; Jander, G. Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: Accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. *Amino Acids* **2010**, *39*, 933–947. [[CrossRef](#)]
46. Li, M.; Guo, R.; Jiao, Y.; Jin, X.; Zhang, H.; Shi, L. Comparison of salt tolerance in Soja based on metabolomics of seedling roots. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1101. [[CrossRef](#)]
47. Zhong, M.; Yuan, Y.; Shu, S.; Sun, J.; Guo, S.; Yuan, R.; Tang, Y. Effects of exogenous putrescine on glycolysis and Krebs cycle metabolism in cucumber leaves subjected to salt stress. *Plant Growth Regul.* **2016**, *79*, 319–330. [[CrossRef](#)]
48. Carillo, P.; Woo, S.L.; Comite, E.; El-nakhel, C.; Roupael, Y.; Fusco, G.M.; Borzacchiello, A.; Lanzuise, S.; Vinale, F. Application of trichoderma harzianum, 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone and plant biopolymer formulations modulate plant metabolism and fruit quality of plum tomatoes. *Plants* **2020**, *9*, 771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 7.4. Publicación 04

### Título

Effect of foliar application of amino acids on the salinity tolerance of tomato plants cultivated under hydroponic system

### Autores

Alfosea-Simón, M., Zavala-González, E.A., Cámara-Zapata, J.M., Martínez-Nicolás, J.J., Simón, I., Simón-Grao, S., y García-Sánchez, F.

### Revista

*Scientia Horticulturae*, 272, 109509

### Categoría JCR

Horticulture

### Categoría de cuartil

Q1

### Factor de impacto

3,463 (2020)



# Effect of foliar application of amino acids on the salinity tolerance of tomato plants cultivated under hydroponic system

Marina Alfosea-Simón<sup>a,c</sup>, Ernesto A. Zavala-Gonzalez<sup>b</sup>, Jose M. Camara-Zapata<sup>c</sup>,  
Juan J. Martínez-Nicolás<sup>c</sup>, Inmaculada Simón<sup>c</sup>, Silvia Simón-Grao<sup>a</sup>, Francisco García-Sánchez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, CEBAS-CSIC, Murcia, Spain<sup>1</sup>

<sup>b</sup> Investigador asociado al departamento I+D Atlántica Agrícola, Spain

<sup>c</sup> EPSO, Universidad Miguel Hernández, Elche, Alicante, Spain

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Abiotic stress  
Biostimulants  
carbohydrates  
chloride toxicity  
osmolytes

## ABSTRACT

Salinity is one of the most critical problems faced by agriculture in all the arid and semi-arid climates in the world. Many biostimulant-producing companies utilize different raw materials to palliate the negative effects of salinity on crops. Some of these active materials are amino acids (AAs). In this study, the effect of the foliar application of free amino acids or as a mixture of them was studied in tomato plants cv "Optima", grown in a controlled environment growth chamber in a hydroponic system with Hoagland's solution with added 50 mM NaCl. The following treatments were applied: i) Control (-salt), ii) salt (+salt), and the salt treatments with amino acids (AAs + salt): iv) L-Arg, v) L-Pro, vi) Glu, vii) L-Trp, viii) L-Met + L-Arg, ix) L-Met + L-Trp, x) Glu + L-Pro. At the end of the assay, vegetative growth parameters, relative water content, mineral nutrient content, carbohydrates and organic solutes and chlorophylls were measured. The results showed that salinity decreased the growth of the plants, but those treated with the **L-Met, Pro + Glu and Met + Trp** reversed the negative effect of salinity. Also, this result was not due to differences in the concentration of Cl<sup>-</sup> or Na<sup>+</sup> in the leaves, or to changes in the water status of the plants, but to a greater accumulation of total soluble sugars induced by the application of AAs, which could have de-activated the reactive oxygen species created by the toxicity of these ions. The results of this experiment also highlight the antagonistic or synergistic effects between the AAs, which should be taken into account by fertilizer producers.

## 1. Introduction

Faced with the increase in the world's population and the ensuing demand for food, together with the negative effects of climate change on the productivity of crops, the main objective of agricultural research has been refocused into acquiring new scientific knowledge related with the mechanisms involved in the tolerance of abiotic stress in plants in order to design agronomic strategies that help crops live and thrive with these stresses (Safdar et al., 2019). About 40% of the world's surface is found in arid regions, which forces agricultural production to depend on irrigation. Under these conditions, and in order to palliate the lack of good water resources, water from aquifers is utilized, which contain a high concentration of dissolved salts. These salts, along with a high evapotranspiration rate, a low leaching capacity of some soils and the use of high quantities of fertilizers, and/or sea water intrusion into aquifers and agricultural land near the coast and marshes, have

increased the salinization of agricultural soils (Plaut et al., 2013; Safdar et al., 2019).

Soil salinity is one of the environmental factors that greatly affects agricultural productivity and the quality of the harvest (Zhang et al., 2019). It is estimated that about 20% of the area in the world dedicated to irrigation is affected by salinity (Kader and Lindberg, 2010), especially in the most productive areas such as California, the southern part of Asia, and a great part of the Mediterranean area (FAO, 2019). Thus, soil and water salinity have become a true threat for agriculture, as most of the cultivated plants, among them tomato (*Solanum lycopersicum* L.), are affected, to a greater or lesser degree, by this environmental factor. The negative effect of salinity on crop growth is due to the combination of various factors (Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2001; Syvertsen and Garcia-Sanchez, 2014), including: i) the water deficit due to osmotic effects, as a high concentration of salts in the soil results in the establishment of a zone with low water potential, which

\* Corresponding author.

E-mail address: fgs@cebas.csic.es (F. García-Sánchez).

<sup>1</sup> <http://www.atlanticaagricola.com/>.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109509>

Received 13 April 2020; Received in revised form 8 May 2020; Accepted 21 May 2020

Available online 04 June 2020

0304-4238/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

makes difficult the absorption of water through the plant's roots; ii) the creation of a specific ionic toxicity that is normally associated to an excessive absorption of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  ions; and iii) the excess of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  in the soil results in a decreased absorption of mineral nutrients or disequilibrium with  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , nitrate or phosphate (Negrao et al., 2017). At the same time, all of these factors lead to the negative alteration of different physiological processes such as water relations, net assimilation rate of  $\text{CO}_2$ , light-gathering processes, antioxidant capacity, among others, which result in a decrease in both production and commercial quality of the crops.

In order to adapt to conditions of salinity plants utilize a series of mechanisms, among them the synthesis of amino acids such as Proline and/or glycine betaine (an ammonium quaternary compound). Proline is involved in processes of osmotic adjustment, protection of cellular membranes and deactivation of reactive oxygen species (ROS), at the same time that it acts as a nitrogen reserve compound (Dar et al., 2016). Of the metabolic routes that are involved in the synthesis of proline (glutamate or ornithine pathway), it has been demonstrated that those that begin with the synthesis of the amino acid glutamate are the main ones in situations of osmotic stress (Rhodes et al., 1986). The sulfur-containing amino acid methionine is a nutritionally important essential amino acid and the precursor of several metabolites that regulate plant growth and responses to the environment (Amir et al., 2002). This amino acid, through the S-adenosyl methionine (SAM) route, regulates the synthesis of secondary metabolites, polyamines and ethylene, and together with an amine group, help plants withstand abiotic stresses (Capaldi et al., 2015). From the 21 proteinogenic AAs, arginine has the greatest amount of nitrogen, making this amino acid an important reserve and manner of transport of this element. Also, this amino acid is the precursor of polyamines and nitric oxide; therefore, it also plays crucial roles in regulating developmental processes, as well as the responses to biotic and abiotic stress (Winter et al., 2015). L-Tryptophan is known to be a physiological precursor of auxins and melatonin in higher plants, and research has shown that L-Tryptophan has a more positive effect on plant growth and yield as compared to auxins themselves (Mustafa et al., 2018). L-Tryptophan may act as an osmolyte or ion transport regulator, modulating stomatal opening and diminishing the harmful effects of heavy metals (Hildebrandt et al., 2015).

The application of biostimulants is one of the most popular strategies utilized today for mitigating the negative effects of salinity on crops (Rouphael et al., 2017; Yakhin et al., 2017). This is due to the product's ability to decrease the absorption and transport of  $\text{Cl}^-$  to the aerial part of the plants, to protect the photosynthetic machinery, to maintain a good nutritional equilibrium, to reduce the reactive oxygen species (ROS) and to favor the osmotic adjustment processes, among other factors (Calvo et al., 2014; Du Jardin, 2015; Colla et al., 2015; Rouphael and Colla, 2020). The biostimulants can be formulated from a wide range of materials, but one of the most utilized to combat salinity are protein hydrolysates. Thus, beneficial effects have been observed with the application of animal protein hydrolysates in persimmon (*Diospyros kaki* L.f.) (Visconti et al., 2017), alfalfa plant hydrolysates in maize (*Zea mays* L.) (Ertani et al., 2013), or plant hydrolysates in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) (Cerdán et al., 2009) or lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivation (Lucini et al., 2015). However, the products formulated with materials coming from the hydrolysis of animal or plant proteins have some inconveniences (Colla et al., 2015), such as: i) the destruction of some beneficial AAs, such as tryptophan, cysteine and threonine, ii) the conversion of AAs to their acidic forms such as asparagine and glutamine, iii) appearance of non-desired AAs. Numerous researchers from research centers and biostimulant companies have observed that the foliar application of individual amino acids can promote the mechanisms of adaptation of plants to salinity. The amino acid that has been most-commonly used in foliar applications to alleviate the effects of salinity is proline. The applications of proline have been beneficial in mustard crops (*Brassica juncea* L.) (Ahmad et al., 2015), wheat (*Triticum* L.) (Amir et al., 2002; Talat et al., 2013; Amir

et al., 2020) and rice (*Oryza sativa* L.) (Siddique et al., 2015). To a lesser degree, other amino acids have been applied such as glycine betaine (Estaji et al., 2019), arginine (Badi et al., 2018), and cysteine (Genisel et al., 2014), with promising results. In other abiotic stresses, beneficial AAs applications have also been reported: drought, application of proline in oats (*Avena sativa* L.) (Ghafoor et al., 2019), L-Ornithine in sugar beet (*Beta vulgaris* var. *saccharifera* L.) (Hussein et al., 2019), and salicylic acid and L-Tryptophan in maize (Rao et al., 2012), absorption of nutrients, L-Glycine and L-Glutamine, individual and combined in lettuce (Lucini et al., 2015), Cd toxicity, application of aspartic acid in rice plants (Rizwan et al., 2017), low temperatures, application of glutamic acid in Kimchi cabbage (*Brassica campestris* spp. *Pekinensis*) (Lee et al., 2017). However, there is a lack of studies which have compared the application of AAs individually or in a mixture. To manufacture biostimulants efficiently, it would be wise to understand the function of each of the AAs found in nature and to know if an interaction between them exists. The objective of this study was to evaluate the effect of the foliar application of AAs (Arginine, Methionine, Glutamine, Proline and Tryptophan), either individually or as a mixture, on tomato plants grown with saline water, in order to: i) elucidate which of these free amino acids can increase the tolerance to salinity of these plants, ii) estimate possible tolerance mechanisms induced by these AAs, and iii) determine synergistic or antagonistic effects between AAs in mixtures.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Growing Conditions and Plant Material

The experiment was performed with tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar "Óptima". For this, plants from a commercial nursery (Baby Plant, S.L. Murcia, Spain) were utilized, and these were grown in hydroponics in a grown chamber located at the CEBAS-CSIC (Espinardo, Murcia, Spain) under controlled conditions. The photoperiod was set for 16 hours of light with an intensity of  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , the temperature was set at  $25^\circ\text{C}$  day/night, with a relative humidity of 60%. The seedlings were grown in 9 L containers with a Hoagland nutrient solution, composed of:  $0.54 \text{ g L}^{-1}$  of  $\text{KNO}_3$ ,  $0.84 \text{ g L}^{-1}$  of  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $0.14 \text{ g L}^{-1}$  of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0.25 \text{ g L}^{-1}$  of  $\text{MgSO}_4$ ,  $0.2 \text{ g L}^{-1}$  of Fe, and  $0.2 \text{ g L}^{-1}$  of a micronutrient mix (Hidromix S, Valagro). This nutrient solution had an  $\text{EC} = 2 \text{ dS m}^{-1}$ , and the pH was adjusted weekly to pH 5.5-6.5 with 1 M NaOH. These containers had a constant flow of air to avoid conditions of hypoxia during the experimental period. The experiment lasted 42 days; firstly plants were germinated until four true leaves were fully developed (25 days), then they were transferred to hydroponic cultivation system for 10 days for acclimatization. The experiment started after the acclimatization period (7 days), and the plants were 10 days under salt condition.

### 2.2. Salinity treatment

The experiment was comprised by a set of plants grown with a Hoagland nutrient solution without salinity (control;  $\text{EC} = 2 \text{ dS m}^{-1}$ ) and another set of plants grown with this solution but to which NaCl was added at a concentration of 50 mM ( $\text{EC} = 8 \text{ dS m}^{-1}$ ). The EC was monitored daily with a conductivity meter (LAQUAtwin EC-22; Kioto, Japan).

### 2.3. Preparation, and application of AAs and mixtures during the salinity stress period

Of the 21 proteinogenic AAs, the following were selected: Glutamic acid (Glu), L-Proline (L-Pro), L-Arginine (L-Arg), L-Methionine (L-Met) and L-Tryptophan (L-Trp), which were applied foliarly, individually or in a mixture, to the salt-treated plants, with the following independent treatments: i) Control (-salt), ii) saline (+salt), iii) L-Met + salt, iv) L-



Arg + salt, v) L-Pro + salt, vi) Glu + salt, vii) L-Trp + salt, viii) L-Met + L-Arg + salt, ix) L-Met + L-Trp + salt, x) Glu + L-Pro + salt. For the application of the selected AAs, the individual stock solutions were first prepared for each one of them (Glu, Pro, Arg, Met and Trp) with a concentration of 5% (v/v). In second place, for the foliar application of each amino acid: i) for the individual treatments, a 10 mL L<sup>-1</sup> dose of the stock solution was utilized, and ii) for the AAs mixtures, a solution was prepared starting with the two stock solutions, having in mind that the final dose of each was also 10 mL L<sup>-1</sup>. Before the application, all the products were adjusted to a pH of 5.5-5.6, and Tween-20, whose composition is a saturated fatty acid ester and polyoxyethylene sorbitan, was added for a final concentration of 0.1% (v/v); this surfactant improves the adherence of the sprayed solution. The application of these products was conducted an hour before the salt treatment. For this, the products were foliarly sprayed onto the plants in a manner that the leaves were completely covered with the solution. For each treatment, 4 containers with 3 plants each were utilized. In total, 120 plants were utilized, and each container with its three plants was considered to be an experimental unit. The containers were randomly distributed in the growth chamber.

#### 2.4. Growth parameters and relative water content

At the end of the experiment (6 days after the foliar application), the plants were harvested, and the leaves, stems and roots were weighed separately (g, fresh weight; fw). Afterwards, they were thoroughly washed with deionized water and dried in an oven at 60 °C for at least 48 hours. Then, the samples were weighed again (g, dry weight; dw), and they were milled until obtaining a fine powder for their posterior analysis in the lab. For the quantification of the relative water content (RWC), 1 cm leaf disks were taken from each plant, weighed (g fw) and placed in a rack with distilled water for 16 hours in the dark and at room temperature for them to become turgid. Posteriorly, they were weighed again (g, turgid weight; tw), and dried in an oven at 60 °C for 16 hours, after which they were weighed again (g dw). With this data, the water content of the shoots was calculated with the equation:  $[(fw - dw)/(tw - dw)] \times 100$ , expressed as a %.

#### 2.5. Leaf chlorophyll concentration

To determine the concentration of total chlorophylls in the leaf, the spectrophotometry method proposed by [Hansmann \(1973\)](#) was utilized with some modifications. Discs of 1 cm in diameter were taken from the aerial part of the plant and suspended in a volume of 5 mL acetone-water at 90% (v/v) as the pigment extraction solvent. They were agitated and left in the dark at 4 °C for 24 hours. Afterwards, the optical density of the supernatant was measured at 665, 645 and 630 nm, verifying that there was no turbidity or particles present. The solvent solution was utilized as the blank. For quantification, the equation proposed by [Parsons and Strickland \(1963\)](#) was utilized:

$$C_a \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 11.6 \text{ O.D.665} - 1.31 \text{ O.D.645} - 0.14 \text{ O.D.630}$$

$$C_b \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 20.7 \text{ O.D.645} - 4.34 \text{ O.D.665} - 4.42 \text{ O.D.630}$$

$$C_c \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 55.0 \text{ O.D.630} - 4.64 \text{ O.D.665} - 16.3 \text{ O.D.645}$$

Where  $C_a$ ,  $C_b$  and  $C_c$  are the concentrations of chlorophylls a, b and c, respectively, and O.D. is the average optical density. The concentration of chlorophyll was expressed in mg g<sup>-1</sup> leaf fw.

#### 2.6. Biochemical parameters

At the end of the experiment, the concentrations of proline, carbohydrates (total soluble sugars, reducing sugars and starch) and the concentration of quaternary ammonium compounds (QAC) were quantified in the leaves. Proline was extracted from the dry leaf tissue

with sulfosalicylic acid (3%) and was quantified according to the protocol described by [Bates et al. \(1973\)](#). On their part, the total soluble and reducing sugars were also extracted from the dry leaf tissue with ethanol (80%) and quantified in accordance by protocols described by [Hodge and Hofreiter \(1962\)](#), [Nelson \(1944\)](#) and [Somogy \(1952\)](#). Also, the concentration of starch from the dry tissue was determined with the method described by [Haissig and Dickson \(1979\)](#). The QAC were extracted and quantified from the dry material following the protocol by [Grieve and Grattan \(1983\)](#). The results were expressed in mg g<sup>-1</sup> dw.

#### 2.7. Mineral analysis

A nutritional analysis of the dry and milled leaf samples was conducted. The concentration of Cl<sup>-</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> was measured using a silver ion titration chloridometer (Corning 926 Chloridometer; Sherwood, UK) and a Dionex DX-600 HPLC (California, EE.UU.), respectively, after extraction with distilled water. On the other hand, the concentration of Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> was analyzed through inductively coupled plasma (ICP) spectrophotometry (Iris Intrepid II, Thermo Electron corporation, Franklin, USA), after digestion with HNO<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5:3 by volume) in a microwave (CERM Mars Xpress, North Carolina, USA).

#### 2.8. Statistical analysis

The experiment utilized a single-factor design (treatment with AAs), and therefore, the statistical analysis of the data was performed with an analysis of variance (ANOVA) with the statistical program SPSS version 24 (Chicago, IL, USA). When the variables were found to be significant ( $p < 0.05$ ), the treatment means were separated utilizing Tukey's multiple range test. The values presented for each treatment are the means of 4 experimental repetitions (every experimental unit are three replicate plants). Principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA) were also performed. Cluster analysis was applied to the standardized data for hierarchical associations employing Ward's method for agglomeration and the squared Euclidean distance as the dissimilarity measure.

### 3. Results

#### 3.1. Plant growth parameters

As expected, the salt treatment (+salt) significantly reduced vegetative growth as compared to the control plants (-salt). The total dry biomass of the plants was reduced by 31% as compared to the control plants (-salt), and this reduction was due to the biomass reduction of the shoots (32%) as well as the root (30%). The total dry biomass of the plants treated with the AAs Glu, Trp, Pro, Arg and Arg + Met was similar to the plants in the + salt treatment, with a reduction of 53-61%, relative to the control treatment ([Fig. 1](#)). However, the application of the treatments **Met**, **Met + Trp**, and **Pro + Glu** mitigated the reduction in vegetative growth due to salinity. In this last treatment, there were no significant differences with the control plants.

For the growth results for each plant tissue, it can be observed that the shoot was significantly reduced in all plants from the salt treatments except for the Pro + Glu treatment, relative to the non-salinized plants. Also, the plants from the Met + Trp and Met treatments had a vegetative growth that was greater than those from the salt treatment without AAs, with the growth similar to the rest of treatments, except for the L-Pro plants, with a significantly less growth. In the case of the roots, the L-Met, Met + Trp and Pro + Glu treatments did not show a decreased growth, while the L-Pro, Met + Arg and L-Arg had a 15% decrease in growth, although their growth was greater than in the salt treatments without AAs or the salt treatments with Glu and L-Trp. The changes occurred in the growth of shoot and roots, resulted in alterations in the root/shoot ratio. In general, a progressively decreasing trend was observed in the following order:



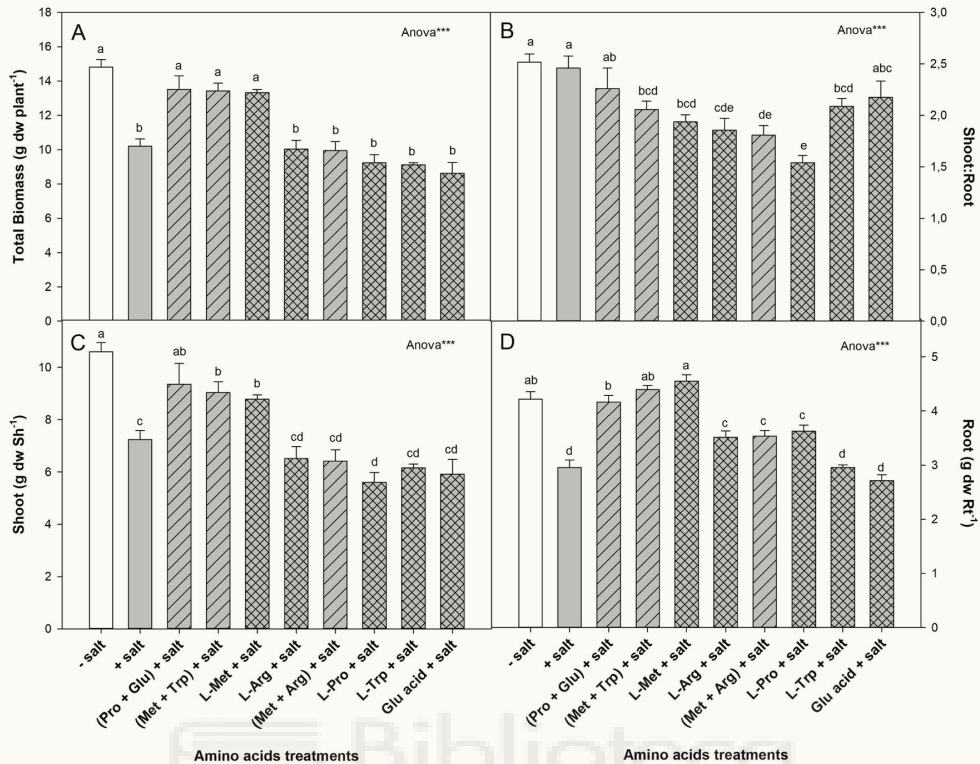


Fig. 1. Growth parameters: (A) Total Biomass, (B) Shoot:Root ratio, (C) Shoot, and (D) Root of tomato plants *var. Óptima* watered with saline water (50 mM) and foliarly treated with different amino acids (glutamic acid (Glu), L-Tryptophan (L-Trp), L-Proline (L-Pro), L-Arginine (L-Arg) and L-Methionine (L-Met); and their mixtures: Met + Arg, Met + Trp and Pro + Glu). In the ANOVA: \*\*\* indicates significant differences at  $p < 0.001$ . The different lower case letters indicate significant differences between the treatments at  $p < 0.05$  established by Tukey's multiple range test. The vertical bar indicates the standard error of the mean ( $n = 4$ ).

-salt > +salt > Pro + Glu > Glu > L-Trp > Met + Trp > L-Met > L-Arg > Met + Arg > L-Pro.

### 3.2. Relative water content (RWC)

The RWC data had a range between 69% in the control treatment and 46% of the salt treatment without AAs, with significant differences between these two treatments (Fig. 2). The RWC of the salt treatments with amino acids were found between the previously-mentioned values. The Pro + Glu, Met + Trp, L-Met, Met + Arg and Glu treatments had a tendency to decrease the RWC, but without significant differences with the non-salinized control treatment. The L-Arg and L-Pro treatments had a RWC that was significantly lower than the control treatment, but these values were higher than the + salt treatment. Non-significant differences were observed between L-Trp and + salt treatments.

### 3.3. Concentration of mineral nutrients in leaves

The salt treatments significantly increased the concentration of Cl- and Na<sup>+</sup> in the leaves with respect to the control treatment plants, independently of the treatments with or without AAs (Fig. 3). In the case of chloride, the salt-treated plants with AAs had a range of concentration between 1.3-2.1 (% mg 100 mg<sup>-1</sup> dw). All AAs treatments, except for L-Trp, reported non-significant differences between them or between the + salt treatment. The plants treated with the amino acid tryptophan significantly increased their concentration with respect to the rest of the treatments, reaching a concentration of 2.2%.

In the case of Na<sup>+</sup>, a similar response as that of Cl- was observed. The salinity applied increased its concentration in the leaves in all the

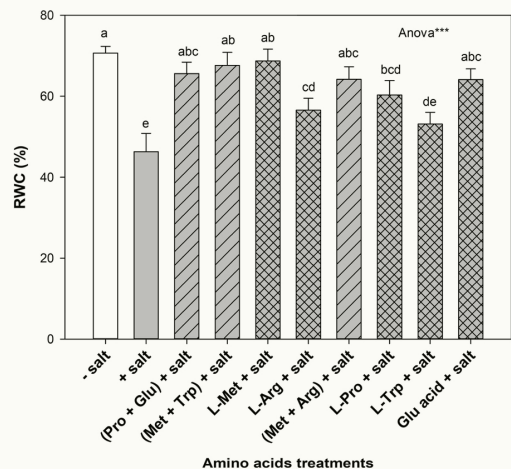
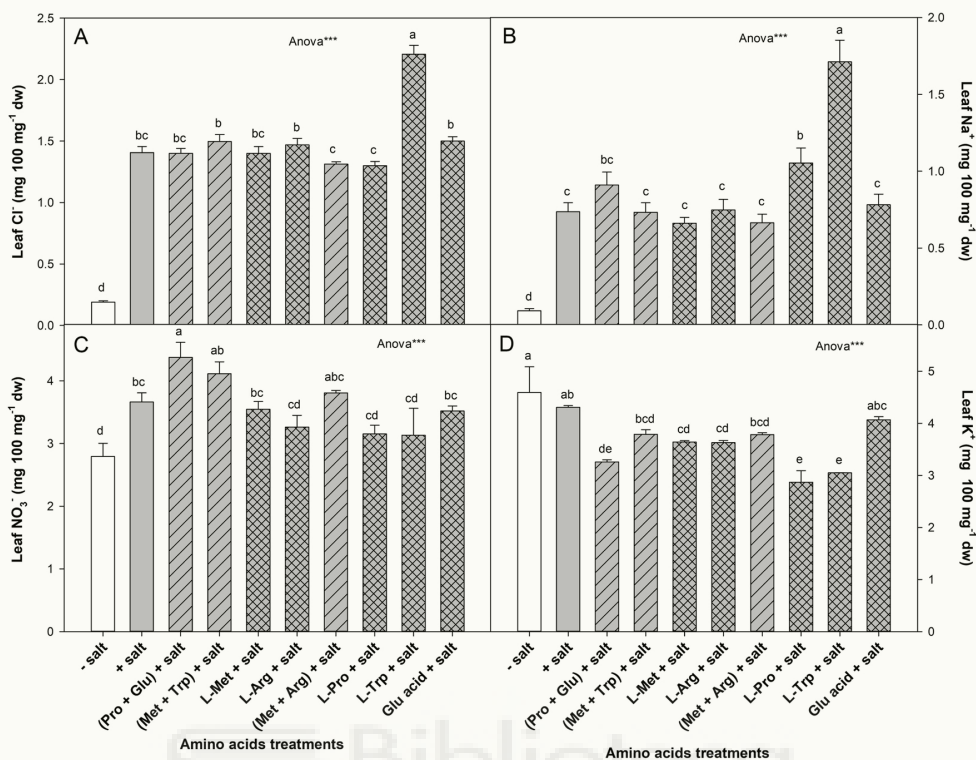


Fig. 2. RWC of tomato plants *var. Óptima* watered with saline water (50 mM) and foliarly treated with different amino acids (glutamic acid (Glu), L-Tryptophan (L-Trp), L-Proline (L-Pro), L-Arginine (L-Arg) and L-Methionine (L-Met); and their mixtures: Met + Arg, Met + Trp and Pro + Glu). In the ANOVA: \*\*\* indicates significant differences at  $p < 0.001$ . The different lower case letters indicate significant differences between the treatments at  $p < 0.05$  established by Tukey's multiple range test. The vertical bar indicates the standard error of the mean ( $n = 4$ ).



**Fig. 3.** Mineral nutrition. Concentration of (A)  $\text{Cl}^-$ , (B)  $\text{Na}^+$ , (C)  $\text{NO}_3^-$ , and (D)  $\text{K}^+$  of tomato plants *var.* Óptima watered with saline water (50 mM) and foliarly treated with different amino acids (glutamic acid (Glu), L-Tryptophan (L-Trp), L-Proline (L-Pro), L-Arginine (L-Arg) and L-Methionine (L-Met); and their mixtures: Met + Arg, Met + Trp and Pro + Glu). In the ANOVA: \*\*\* indicates significant differences at  $p < 0.001$ . The different lower case letters indicate significant differences between the treatments at  $p < 0.05$  established by Tukey's multiple range test. The vertical bar indicates the standard error of the mean ( $n = 4$ ).

treatments, independently of the application or not of the amino acids. No significant differences were observed between the plants to which no AAs were applied (+ salt treatment), and the treatments with Glu, L-Arg, L-Met, Met + Arg, Met + Trp and Pro + Glu (Fig. 3). However, the L-Pro and L-Trp treatments had a significantly higher leaf  $\text{Na}^+$  concentration than plants from the + salt treatments, with the L-Trp plants reaching the highest value (1.7%).

The range in foliar concentration of nitrate was found to be between 2.8-4.4%. The trend found was that the salt treatment, independently of the application of AAs, tended to increase the concentration of nitrate as compared to the control treatment (-salt), with the highest value observed in Pro + Glu plants. However, in this trend, there were no significant differences between the -salt and L-Arg, L-Pro, and L-Trp treatments.

The concentration of  $\text{K}^+$  significantly decreased with the application of all the AAs treatments with respect to the control treatment, except for Glu. However, in the plants from the salt treatment without AAs,  $\text{K}^+$  was similar to the control plants. Among the treatments with amino acids, where a decrease of  $\text{K}^+$  was observed (L-Pro, L-Trp, Pro + Glu, L-Arg, L-Met, Met + Arg and Met + Trp), the lowest value was observed for the treatments with L-Pro and L-Trp, although without significant differences with respect to Pro + Glu.

#### 3.4. Organic solutes, carbohydrates and chlorophylls

The concentration of proline tended to increase in the salt treatments as compared to the control treatment (-salt), with this increase being significant for all the treatments except for Pro + Glu and L-Trp. In the treatments with AAs, L-Arg, Met + Arg and L-Pro had a similar

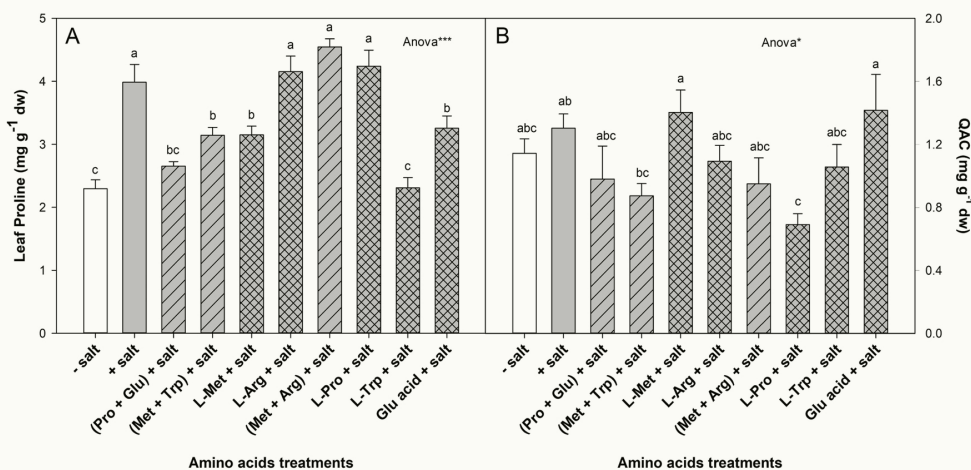
but higher concentration than the rest of the treatments (Fig. 4). The concentration of quaternary ammonium compounds (QAC) ranged between 0.7-1.4  $\text{mg g}^{-1}$  dw. The salt treatment without AAs did not show significant differences with the control (-salt), although + salt plants had significantly higher values than L-Pro plants.

The total chlorophyll concentration, as compared to the control treatment, significantly decreased with the salt treatment without AAs and with the Met + Trp, Met + Arg, L-Pro, L-Trp and Glu treatments (Table 1). In these treatments, the plants treated with Pro + Glu, Met + Arg, and L-Met, had a greater concentration of chlorophylls than those to which no AAs were applied.

The concentration of total soluble sugars increased significantly in the Pro + Glu, Met + Trp and L-Pro treatments with respect to the rest of the treatments, where no differences were observed between them. The concentration of reducing sugars was significantly higher in the plants from the L-Pro, Glu and Pro + Glu treatments, although this last did not show significant differences with Met + Trp, relative to -salt and + salt treatments. Leaf concentration of starch, Pro + Glu treatment had higher concentration than those from L-Met, L-Arg and Glu, which concentration was significantly lower than for control treatments (-salt and + salt).

#### 3.5. Principal components analysis (PCA) and cluster analysis

For a better and simpler visual interpretation of all the data, a principal component analysis and a cluster analysis were conducted (Fig. 5). The first five components explained 93% of the variability, and the first three, represented by PC1, PC2 and PC3, explained 76%. The PC1 component explained 41% of the variability observed, thus



**Fig. 4.** (A) Proline and (B) QAC concentration quantified in leaves of tomato *var.* Óptima plants watered with saline water (50 mM) and foliarly treated with different amino acids (glutamic acid (Glu), L-Tryptophan (L-Trp), L-Proline (L-Pro), L-Arginine (L-Arg) and L-Methionine (L-Met); and their mixtures: Met + Arg, Met + Trp and Pro + Glu). In the ANOVA: \*\*\* indicates significant differences at  $p < 0.001$ . The different lower case letters indicate significant differences between the treatments at  $p < 0.05$  established by Tukey's multiple range test. The vertical bar indicates the standard error of the mean ( $n = 4$ ).

**Table 1**

Concentration of chlorophylls, carbohydrates and other osmolytes in leaves of tomato plants *var.* Óptima watered with saline water (50 mM) and foliarly treated with different amino acids and their mixtures.

Treatment	Soluble sugars (mg g <sup>-1</sup> dw)	Reducing sugars (mg g <sup>-1</sup> dw)	Starch (mg g <sup>-1</sup> dw)	Total Chl (mg g <sup>-1</sup> fw)
- Salt	38.84 c	10.65 c	22.68 bc	1.64 a
+ Salt	49.97 bc	13.79 c	29.30 b	0.93 de
Pro + Glu + Salt	66.20 a	25.17 b	39.49 a	1.41 ab
Met + Trp + Salt	70.27 a	15.79 bc	15.77 cd	1.32 bc
L-Met + Salt	65.67 a	11.83 c	8.22 e	1.54 ab
L-Arg + Salt	39.80 bc	13.71 c	10.97 de	0.96 de
Met + Arg + Salt	46.57 bc	9.98 c	17.27 cd	1.12 cd
L-Pro + Salt	47.3 bc	78.89 a	17.28 cd	1.00 d
L-Trp + Salt	52.03 b	11.27 c	17.24 cd	0.69 e
Ac. Glu + Salt	46.27 bc	25.31 b	14.78 de	1.05 cd
ANOVA	***	***	***	***

In the ANOVA: \*\*\* indicates significant differences at  $p < 0.001$ . The different lower case letters indicate significant differences between the treatments at  $p < 0.05$  established by Tukey's multiple range test. The vertical bar indicates the standard error of the mean ( $n = 4$ ).

showing that the variability was fundamentally due to the total biomass, growth of the shoots and the root, relative water content, total chlorophylls and foliar Na concentration. The PC2 component explained 20% of variability, with the parameters associated to it shown in Fig. 5.

In light of these results, it can be confirmed that the PCA demonstrates that there were differences in the results of the different treatments tested (AAs and their combinations). The cluster analysis shows results that are similar to those from the PCA. The treatments of L-Met, L-Met + Trp and the Pro + Glu showed results that were the most similar to the control treatment (-salt), and therefore, their tolerance was greater than the rest of the treatments.

#### 4. Discussion

Under salinity conditions, the growth of the plants is affected as result of the alterations in their physiological and chemical processes, and this leads to decreases in the production and harvest quality of the crops (Chrysargyris et al., 2018). Many fertilizer companies aim to formulate biostimulant products, which could help to mitigate the

negative effects of abiotic stresses such as salinity. To manufacture these products, AA-rich active materials are utilized, but as these materials are composed by a great variety of organic molecules, the role that these AA-based biostimulants have in plants is unknown. In this study, the individual application of 4 AAs and 3 double mixtures was analyzed in tomato plants under salinity conditions in order to better understand the effect of the AAs in the tolerance to salinity of tomato plants.

In our experiments, as expected, salinity decreased the overall growth of the tomato plants. But the individual application of L-Met and the Pro + Glu and Met + Trp mixtures reversed this effect, so that the salinity in the nutrient solution scarcely affected the total dry biomass of the plants. In fact, this parameter did not show significant differences with respect to the control plants. The beneficial effect of the application of L-Met, Pro + Glu and Met + Trp was not observed with the rest of AAs treatments, although no negative effects were found either. Even the application of L-Arg, Met + Arg and L-Pro induced a greater growth of the root with respect to the salt-treated plants without the application of AAs.

The high concentration of NaCl in the irrigation water can result in i) the loss of turgor of the leaves as a result of the osmotic effect, ii) Cl- and Na<sup>+</sup> toxicity in the different plant tissues, iii) a possible nutritional imbalance (Khan et al., 2000; Acosta-Motos et al., 2017; Hussain et al., 2018). The degree of tolerance to salinity of the plants depends on their ability to mitigate some of these factors (Ghalati et al., 2020). In our assay, as previously mentioned, the plants treated with the AAs L-Met, Pro + Glu and Met + Trp had a greater tolerance to salinity with respect to the rest of the salt treatments. According to the data on the relative water concentration (Fig. 2), the foliar concentration of Cl- and Na<sup>+</sup> (Fig. 3) and the concentration of K<sup>+</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, this greater tolerance to salinity was not related to the accumulation of Cl- in the leaves, the water status or the nutritional status of the plants, as a relationship between these parameters and the growth of the plants was not observed. Nevertheless, in the plants that received the treatments with L-Met, Pro + Glu and Met + Trp, the concentration of total soluble sugars increased, which could have reduced the oxidative stress produced by the toxicity of Cl- and Na<sup>+</sup> accumulated in the leaves. In fact, in these plants, the concentration of total Chl was barely reduced with salinity, which is an indication that the Cl- and/or Na<sup>+</sup> toxicity in the leaves was less than for the rest of the treatments, despite a similar concentration of these two ions accumulating in all salinized plants.

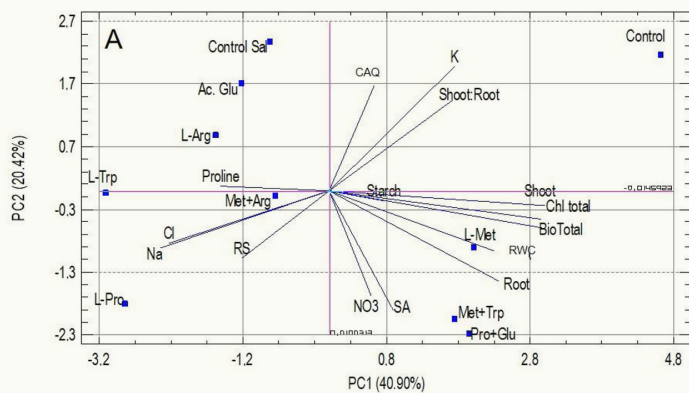
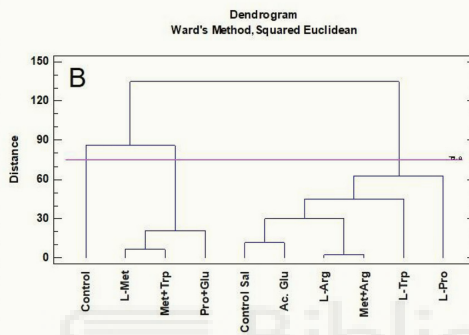


Fig. 5. (A) Principal component analysis (PC1 and PC2) and (B) cluster analysis (CA) of tomato plants *var.* Óptima watered with saline water (50 mM) and foliarly treated with different amino acids (glutamic acid (Glu), L-Tryptophan (L-Trp), L-Proline (L-Pro), L-Arginine (L-Arg) and L-Methionine (L-Met); and their mixtures: Met + Arg, Met + Trp and Pro + Glu) in a growth chamber.

Principal components	1	2
<b>Characters</b>	<b>Eigenvectors</b>	
BioTotal	0.383	-0.128
Shoot	0.389	-0.051
Root	0.305	-0.310
Shoot:Root	0.223	0.311
RWC	0.297	-0.206
Chl total	0.381	-0.097
Cl <sup>-</sup>	-0.288	-0.181
Na <sup>+</sup>	-0.304	-0.197
K <sup>+</sup>	0.226	0.426
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.075	-0.361
Proline	-0.195	0.016
CAQ	0.082	0.359
SA	0.115	-0.411
RS	-0.156	-0.230
Starch	0.100	-0.035



The synthesis and accumulation of organic solutes are common responses of the adaptation of plants to water deficit as well as salt stress (osmoregulation). These compounds include AAs such as proline, quaternary ammonium compounds, poly-alcohols and sugars such as sucrose. These compounds, aside from acting as osmoregulators, have an antioxidant capacity that helps plants de-activate ROS (Caverzan et al., 2019). According to our data, the following hypothesis can be raised: The increase on salt tolerance in plants treated with L-Met and Met + Trp could have been due to relation of these two AAs with polyamines metabolism. It is known that these compounds (polyamines) are involved in the tolerance of the plants to salinity (Ke et al., 2018), and that L-Met is a precursor in the biochemical synthesis route of these compounds (Duarte-Sierra et al., 2019). In the case of the Pro + Glu treatment, the presence of Glu could help plants tolerate salinity thanks to this amino acid modulating the equilibrium of ions and boosting the antioxidant systems under salt stress, as confirmed by the results obtained by Guo et al. (2017), in an experiment where poly- $\gamma$ -glutamic acid ( $\gamma$ -PGA) was applied exogenously to wheat plants grown with 150 mM NaCl.

Another important conclusion that could be extracted from these experiments is related with i) the osmoregulatory capacity of the AAs, ii) the accumulation of proline in the plants, and iii) the effect of tryptophan on the accumulation of Cl<sup>-</sup> and Na<sup>+</sup> in the leaves. Starting with the first, one of the negative effects of salinity in plants is the dehydration of the tissues. In order to impede this, the plants increase the synthesis of osmoregulatory substances, such as proline and glycine-betaine (Núñez-Vázquez et al., 2017). Thus, this experiment also revealed that other amino acids such as L-Met, L-Arg and Glu can also induce osmoregulation, since RWC of the salinized L-Met, L-Arg and Glu plants was greater than those from the salt treated plants without AAs. L-Trp, however, did not have this osmoregulating capacity as observed in Fig. 2.

It is known that tomato plants synthesize proline when subjected to

salt stress (Kishor et al., 2015; Siddiqui et al., 2020), but its accumulation is not enough for it to have a beneficial effect (Gagneul et al., 2007; Ghars et al., 2008; Bendaly et al., 2016; Mansour and Ali, 2017), and also, this accumulation increases as the plants are more affected by the stress, so that the concentration of proline can be used as a negative indicator of tolerance, where the higher levels indicate less tolerance (*data not published*). In our experiments, this can be confirmed, as the more tolerant plants had the least concentration of proline. In fact, those plants did not have a decreased growth due to salinity, (L-Met, Pro + Glu and Met + Trp), and the concentration of proline was significantly lower than the other salt treatments.

L-Trp, L-Phe and L-Tyr are aromatic AAs derived from the shikimic acid pathway. This metabolic route plays a vital role against pathogenic microorganisms and herbivores, as it is involved in the mechanisms of defense that could also act against abiotic stresses (Marco, 2006; Ávalos-García and Pérez-Urria, 2011; Bilal et al., 2018). These types of amino acids are utilized in the manufacture of new biostimulant products that stimulate and activate the plant's defense systems against pathogens. In our assay, it was observed that the application of these AAs had a detrimental effect on the plants, such as the accumulation of the toxic ions Cl<sup>-</sup> and Na<sup>+</sup> (Fig. 3). However, this effect did not have a critical impact on our experiments, as the total dry biomass was similar in plants under salt stress without amino acids and L-Trp-treated plants. It would be interesting to study if this could have negative repercussions on the development of the crop in the long term, and it would be important to study which mechanisms are responsible for L-Trp increasing the concentration of these ions in the plants.

In this assay, it was also verified that when an amino acids mixture was applied to the tomato plants grown under salt stress conditions, the interaction between the AAs should be taken into account. Antagonistic and synergistic effects could be observed from our experimental data, thus, further research should be conducted on the physiological mechanisms involved. The antagonistic effect could be observed in the



case of L-Met and L-Arg. When L-Met was applied to the plants either as a single amino acid or in a mixture with L-Trp, the result was very different than when applied in a mixture with L-Arg. This amino acid reversed the positive effect of L-Met on the growth of the plants. It is also important to observe that the effect of L-Trp on the concentration of Cl<sup>-</sup> and Na<sup>+</sup> was reversed with the Met + Trp mixture, as Met + Trp plants had a concentration of Cl<sup>-</sup> and Na<sup>+</sup> lower than L-Trp plants under salt stress conditions. This synergistic effect was also observed in the application of the Pro + Glu mixture. The effects of its application were completely different to the effects observed after the individual application of these two amino acids. The mixture of these two AAs stimulated the vegetative growth as compared to their individual application.

## 5. Conclusions

In the response of the tomato cultivar “Optima” plants to salinity, it was observed that when AAs were applied foliarly, the type of amino acid and type of amino acid mixture played a fundamental role, demonstrating that different types of interactions are possible between them. Of all the treatments applied, the L-Met, Pro + Glu and Met + Trp treatments reversed the negative effects of salinity, and this was possibly due to the increase in the concentration of total soluble sugars, whose involvement in mitigating oxidative stress caused by the toxicity of Cl<sup>-</sup> and Na<sup>+</sup> are well-proven (Guan-fu et al., 2011). Also, negative interactions were observed between L-Met with L-Arg and L-Trp, while L-Pro and Glu had synergistic effects. In the future, it would be interesting to evaluate the agronomic behavior of the tomato crop when these treatments are applied in real-world field conditions, and overall, to identify the physiological mechanisms involved in the antagonistic or synergistic interaction of the AAs.

## Declaration of Interest Statement

This statement is to confirm that the co-authors of the manuscript: “Effect of foliar application of amino acids on the salinity tolerance of tomato plants cultivated under hydroponic system” Marina Alfosea-Simón, Ernesto A. Zavala-Gonzalez, Jose M. Camara-Zapata, Juan J. Martínez-Nicolás, Inmaculada Simón, Silvia Simón-Grao, Francisco García-Sánchez have no interests to declare.

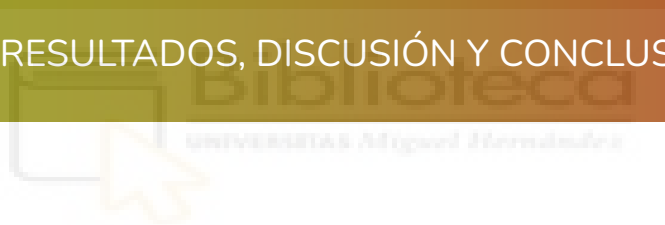
## Acknowledgments

The authors are grateful to the Project on “Formulation of new biostimulants from mixtures of free acidic amino acids to increase the tolerance to salinity and drought of horticultural crops”, funded by CDTI and the Ministry of Economy and Competitiveness.

## References

- Acosta-Motos, J.R., Ortuño, M.F., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez-Blanco, M.J., Hernandez, J.A., 2017. Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms. *Agronomy* 7, 18. <https://doi.org/10.3390/agronomy7010018>.
- Ahmad, P., Hashem, A., Abd-Allah, E.F., Alqarawi, A.A., John, R., Egamberdieva, D., et al., 2015. Role of *Trichoderma harzianum* in mitigating NaCl stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) through antioxidative defense system. *Front. Plant Sci.* 6, 868. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00868>.
- Ami, K., Planchai, S., Cabassa, C., Guivarc’h, A., Very, A.A., Khelifi, M., et al., 2020. Different proline responses of two Algerian durum wheat cultivars to in vitro salt stress. *Acta Physiol. Plant* 42, 21. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-3004-9>.
- Amir, R., Hacham, Y., Gallili, G., 2002. Cystathionine  $\gamma$ -synthase and threonine synthase operate in concert to regulate carbon flow towards methionine in plants. *Trends Plant Sci.* 7, 153–156. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02227-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02227-6).
- Ávalos-García, A., Pérez-Urria, C.E., 2011. *Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal.* 2, 119–145.
- Badi, H.N., Mehrafarin, A., Mustafavi, S.H., Labbafi, M., 2018. Exogenous arginine improved fenugreek sprouts growth and trigonelline production under salinity condition. *Ind. Crops Prod.* 122, 609–616. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.042>.
- Bates, L., Waldren, R., Teare, I., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39, 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>.
- Bendaly, A., Messed, D., Smaoui, A., Ksoui, R., Bouchereau, A., Abdelly, C., 2016. Physiological and leaf metabolome changes in the xerophyte species *Atriplex halimus* induced by salinity. *Plant Physiol. Biochem.* 103, 208–218. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.037>.
- Bilal, M., Wang, S., Iqbal, H.M.N., Zhao, Y., Hu, H., Wang, W., et al., 2018. Metabolic engineering strategies for enhanced shikimate biosynthesis: current scenario and future developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 7759–7773. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9222-z>.
- Calvo, P., Nelson, L., Klopper, J.W., 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil* 383, 3–411. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>.
- Capaldi, F.R., Gratao, P.L., Reis, A.R., Lima, L.W., Azevedo, R.A., 2015. Sulfur metabolism and stress defense responses in plants. *Trop. Plant Biol.* 8, 60–73. <https://doi.org/10.1007/s12042-015-9152-1>.
- Caverzan, A., Piasecki, C., Chavarría, G., Stewart, C.N., Vargas, L., 2019. Defenses against ROS in crops and weeds: the effects of interference and herbicides. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1086. <https://doi.org/10.3390/ijms20051086>.
- Cerdán, M., Sánchez-Sánchez, A., Oliver, M., Juárez, M., Sánchez-Andreu, J.J., 2009. Effect of foliar and root applications of amino acids on iron uptake by tomato plants. *Acta Hort.* 830, 481–488. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.830.68>.
- Chrysargyris, A., Michailidi, E., Tzortzakis, N., 2018. Physiological and biochemical responses of *Lavandula angustifolia* to salinity under inner foliar application. *Front. Plant Sci.* 9, 489. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00489>.
- Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., et al., 2015. Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.037>.
- Dar, M.I., Naikoo, M.I., Rehman, F., Naushin, F., Khan, F.A., 2016. Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development. In: Iqbal, N., Nazar, R., Khan, N. (Eds.), *Osmolytes and plants acclimation to changing environment: emerging omics technologies*. Springer, New Delhi. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2616-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2616-1_9).
- Du Jardin, P., 2015. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic.* 196, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>.
- Duarte-Sierra, A., Nadeau, F., Angers, P., Michaud, D., Arul, J., 2019. UV-C hormesis in broccoli florets: Preservation, phyto-compounds and gene expression.
- Ertani, A., Schiavon, M., Muscolo, A., Nardi, S., 2013. Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. *Plant Soil* 364, 145–158. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1335-z>.
- Estaji, A., Kalaji, H.M., Karimi, H.R., Roosta, H.R., Moosavi-Nezhad, S.M., 2019. How glycine betaine induces tolerance of cucumber plants to salinity stress? *Photosynthetica* 57, 753–761. <https://doi.org/10.32615/ps.2019.053>.
- FAO (Food and Agriculture Organization), 2019. Datos sobre alimentación y agricultura – FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>.
- Gagneul, D., Ainouche, A., Duhaze, C., Luga, R., Larher, F.R., Bouchereau, A., 2007. A reassessment of the function of the so-called compatible solutes in the halophytic *Plumbaginaceae Limonium latifolium*. *Plant Physiol.* 144, 1598–1611. <https://doi.org/10.1104/pp.107.099820>.
- Genisel, M., Erdal, S., Kizilkaya, M., 2014. The mitigating effect of cysteine on growth inhibition in salt-stressed barley seeds is related to its own reducing capacity rather than its effects on antioxidant system. *Plant Growth Regul.* 75, 187–197. <https://doi.org/10.1007/s10725-014-9943-7>.
- Ghafoor, R., Akram, N.A., Rashid, M., Ashraf, M., Iqbal, M., Lixin, Z., 2019. Exogenously applied proline induced changes in key anatomical features and physio-biochemical attributes in water stressed oat (*Avena sativa* L.) plants. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 25, 1121–1135. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00683-3>.
- Ghalati, R.E., Shamili, M., Homaei, A., 2020. Effect of putrescine on biochemical and physiological characteristics of guava (*Psidium guajava* L.) seedlings under salt stress. *Sci. Hortic.* 261, 108961. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108961>.
- Ghars, M.A., Parre, E., Debez, A., Bordenave, M., Richard, L., Leport, L., et al., 2008. Comparative salt tolerance analysis between *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, with special emphasis on K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> selectivity and proline accumulation. *J. Plant Physiol.* 165, 588–599. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.05.014>.
- Grieve, C., Grattan, S., 1983. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant Soil* 70, 303–307. <https://doi.org/10.1007/BF02374789>.
- Guan-fu, F., Jian, S., Jie, X., Yu-rong, L., Hui-zhe, C., Ming-kai, L., et al., 2011. Changes of oxidative stress and soluble sugar in anthers involve in rice pollen abortion under drought stress. *Agr. Sci. China* 10, 1016–1025. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(11\)60089-8](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(11)60089-8).
- Guo, Z., Yang, N., Zhu, C., Gan, L., 2017. Exogenously applied poly- $\gamma$ -glutamic acid alleviates salt stress in wheat seedlings by modulating ion balance and the antioxidant system. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 6592–6598. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8295-4>.
- Haissig, B.E., Dickson, R.E., 1979. Starch measurement in plant tissue using enzymatic hydrolysis. *Physiol. Plant.* 47, 151–157. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1979.tb03207.x>.
- Hansmann, E., 1973. Pigment analysis. In: Stein, J.R. (Ed.), *Handbook of physiological methods. Culture method and growth measurement.* V.1. Cambridge University Press, Reino Unido, pp. 359–368.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J., 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 51, 463–499. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.463>.
- Hildebrandt, T.M., Nunes Nesi, A., Araújo, W.L., Braun, H.P., 2015. Amino Acid Catabolism in Plants. *Mol. Plant* 8, 1563–1579. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.005>.
- Hodge, J., Hofreiter, B., 1962. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: In: Whistler, R., Wolfrom, M. (Eds.), *Methods in carbohydrate chemistry* Vol 1. NY: Academic Press, New York, pp. 380–394.

- Hussain, M., Ahmad, S., Hussain, S., Lal, R., Ul-Allah, S., Nawaz, A., 2018. Rice in saline soils: physiology, biochemistry, genetics, and management. *Adv. Agron.* 148, 231–287. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2017.11.002>.
- Hussein, H.A.A., Mekki, B.B., El-Sadek, M.E.A., El Lateef, E.E., 2019. Effect of L-Ornithine application on improving drought tolerance in sugar beet plants. *Heliyon* 5, e02631. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02631>.
- Kader, M.A., Lindberg, S., 2010. Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. *Plant Signal. Behav.* 5, 233–238. <https://doi.org/10.4161/psb.5.3.10740>.
- Ke, Q., Ye, J., Wang, B., Ren, J., Yin, L., Deng, X., et al., 2018. Melatonin mitigates salt stress in wheat seedlings by modulating polyamine metabolism. *Front. Plant Sci* 9, 914. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00914>.
- Khan, M.A., Gul, B., Weber, D.J., 2000. Germination responses of *Salicornia rubra* to temperature and salinity. *J. Arid Environ.* 45, 207–214. <https://doi.org/10.1006/jare.2000.0640>.
- Kishor, P.B., Kumari, P.H., Sunita, M.S.L., Sreenivasulu, N., 2015. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Front. Plant Sci* 6, 544. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00544>.
- Lee, H.J., Kim, J.S., Lee, S.G., Kim, S.K., Mun, B., Choi, C.S., 2017. Glutamic acid foliar application enhances antioxidant enzyme activities in kimchi cabbages leaves treated with low air temperature. *Hortic. Sci. Technol.* 35, 700–706. <https://doi.org/10.12972/kjhst.20170074>.
- Lucini, L., Roupshael, Y., Cardarelli, M., Canaguier, R., Kumar, P., Colla, G., 2015. The effect of a plant-derived biostimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions. *Sci. Hortic.* 182, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.022>.
- Mansour, M.M., Ali, E.F., 2017. Evaluation of proline functions in saline conditions. *Phytochemistry* 140, 52–68. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.04.016>.
- Marco, J.A., 2006. Terpenes. In: *Química de los productos naturales*. Ed. Síntesis. 172–233.
- Mustafa, A., Imran, M., Ashraf, M., Mahmood, K., 2018. Perspectives of Using L-Tryptophan for Improving Productivity of Agricultural Crops: A Review. *Pedosphere* 28, 16–34. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(18\)60002-5](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(18)60002-5).
- Negrao, S., Schmockel, S.M., Tester, M., 2017. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Ann. Bot.* 119, 1–11. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw191>.
- Nelson, N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153, 375–380.
- Núñez-Vázquez, M., Dell'Amico-Rodríguez, J., Pérez-Hernández, M.C., Betancourt-Grandal, M., 2017. Estrés hídrico y salino en cítricos. Estrategias para la reducción de daños. *Cult. Trop.* 38, 65–74.
- Parsons, T.R., Strickland, J.D.H., 1963. Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *J. Mar. Res.* 21, 155–163.
- Plaut, Z., Edelstein, M., Ben-Hur, M., 2013. Overcoming salinity barriers to crop production using traditional methods. *Crit. Rev. Plant Sci.* 32, 250–291. <https://doi.org/10.1080/07352689.2012.752236>.
- Rao, S.R., Qayyum, A., Razaq, A., Ahmad, M., Mahmood, I., Sher, A., 2012. Role of foliar application of salicylic acid and L-Tryptophan in drought tolerance of maize. *J. Anim. Plant Sci.* 22, 768–772.
- Rhodes, D., Handa, S., Bressan, R.A., 1986. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. *Plant Physiol.* 82, 890–903. <https://doi.org/10.1104/pp.82.4.890>.
- Rizwan, M., Ali, S., Akbar, M.Z., Shakoob, M.B., Mahmood, A., Ishaque, W., et al., 2017. Foliar application of aspartic acid lowers cadmium uptake and Cd-induced oxidative stress in rice under Cd stress. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 21938–21947. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9860-1>.
- Roupshael, Y., Colla, G., Graziani, G., Riteni, A., Cardarelli, M., De Pascale, S., 2017. Phenolic composition, antioxidant activity and mineral profile in two seed-propagated artichoke cultivars as affected by microbial inoculants and planting time. *Food Chem* 234, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.175>.
- Roupshael, Y., Colla, G., 2020. Editorial: Biostimulants in agricultura. *Front. Plant Sci.* 11, 40. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00040>.
- Safdar, H., Amin, A., Shafiq, Y., Ali, A., Yasin, R., Shoukat, A., et al., 2019. A review: Impact of salinity on plant growth. *Nat. Sci.* 17, 34–40. <https://doi.org/10.7537/marsnsj170119.06>.
- Siddique, A.B., Islam, M.R., Hoque, M.A., Hasan, M.M., Rahman, M.T., Uddin, M.M., 2015. Mitigation of salt stress by foliar application of proline in rice. *Univers. J. of Agric. Res.* 3, 81–88. <https://doi.org/10.13189/ujar.2015.030303>.
- Siddiqui, M.H., Almari, S., Alsubaie, Q.D., Ali, H.M., Khan, M.N., Al-Ghamdi, A., et al., 2020. Exogenous nitric oxide alleviates sulfur deficiency-induced oxidative damage in tomato seedlings. *Nitric Oxide* 94, 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.11.002>.
- Somogyi, A.I., 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195 (19).
- Syvertsen, J.P., Garcia-Sanchez, F., 2014. Multiple abiotic stresses occurring with salinity stress in citrus. *Environ. Exp. Bot.* 103, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.015>.
- Talat, A., Nawaz, K., Hussain, K., Bhatti, K.H., Siddiqi, E.H., Khalid, A., et al., 2013. Foliar application of proline for salt tolerance of two wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *World Appl. Sci. J.* 4, 547–554. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2013.22.04.19570>.
- Visconti, F., Intrigliolo, D.S., Quiñones, A., Tudela, L., Bonet, L., de Paz, J.M., 2017. Differences in specific chloride toxicity to *Diospyros kaki* cv. "Rojo Brillante" grafted on *D. lotus* and *D. virginiana*. *Sci. Hortic.* 214, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.11.025>.
- Winter, G., Todd, C.D., Trovato, M., Forlani, G., Funck, D., 2015. Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Front. Plant Sci* 6, 534. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00534>.
- Yakhin, O.I., Lubyayov, A.A., Yakhin, I.A., Brown, P.H., 2017. Biostimulants in plant science: a global perspective. *Front. Plant Sci.* 7, 2049. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>.
- Zhang, H., Li, Y., Meg, Y.L., Cao, N., Li, D.S., Zhou, Z.G., et al., 2019. The effects of soil moisture and salinity as functions of groundwater depth on wheat growth and yield in coastal saline soils. *J. Integr. Agric.* 18, 2472–2482. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62713-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62713-9).
- Zhu, J.K., 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6, 66–71. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01838-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01838-0).





## 8. RESUMEN DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

### 8.1. Publicación 01

Título		
Ionomic, metabolic and hormonal characterization of the phenological phases of different tomato genotypes through the use of ICP, H-NMR, and U-HPLC-MS		
Autores		
Alfosea-Simón, M., Simón-Grao, S., Zavala-González, E.A., Navarro, I., Martínez-Nicolás, J.J., Alfosea-Simón, F.J., Simón, I., y García-Sánchez, F.		
Revista		
<i>Scientia Horticulturae</i> , 293, 110697		
Categoría JCR	Categoría de cuartil	Factor de impacto
Plant Sciences	Q1	3,463 (2020)

El objetivo de este estudio fue caracterizar el perfil metabólico, ionómico y hormonal en diferentes etapas fenológicas de cuatro variedades de tomate con diferentes características agronómicas. Para seleccionar estas variedades primero se hizo un estudio agronómico (crecimiento vegetativo, producción y calidad del fruto) de 10 variedades diferentes de tomate. A partir de este estudio, mediante herramientas de análisis estadístico, se seleccionaron cuatro variedades ('Cherry', 'Green Zebra', 'Montserrat' y 'Tres Cantos') diferentes para hacer el análisis metabólico, ionómico y hormonal empleando diferentes herramientas ómicas.

### 8.1.1. Resumen de resultados y discusión

En este experimento, se evaluaron las características agronómicas de diez variedades de tomate ('Green Zebra', 'Corazón de Buey', 'Tres Cantos', 'Montserrat', 'Roma VF', v 'Óptima', 'Marglobe', 'Cherry', 'Marmande VR' y 'Muchamiel'). Con los datos obtenidos, se procedió a seleccionar aquellas cuatro variedades que más diferencias agronómicas tenían entre sí. Para ello se realizó un análisis estadístico utilizando las herramientas de análisis de componentes principales (ACP) y de análisis Cluster (AC). Con estos resultados, se seleccionaron las variedades: 'Green Zebra', 'Cherry', 'Montserrat' y 'Tres Cantos' con las que se hicieron el estudio metabólico, ionómico y hormonal.

Los resultados de dicho ensayo indican que la variabilidad de los datos obtenidos en los estudios llevados a cabo se debió más al estado fenológico que al genotipo, por lo tanto, a la hora de formular y desarrollar nuevos bioestimulantes se debería tener en cuenta este factor, aunque las variedades tengan unas características agronómicas muy diferentes entre sí. Por lo tanto, a continuación, se comentan los resultados de estos estudios en las diferentes fases de desarrollo.

En cuanto a los aminoácidos, para cubrir las necesidades de las plantas los productos bioestimulantes deberían estar formulados en base a cinco aminoácidos principalmente como son glutamato, glutamina, aspartato, tiroxina y fenilalanina. Los tres primeros tuvieron una alta concentración en todas las fases fenológicas de las plantas, aunque la glutamina y el aspartato destacaron sobre todo en la fase 3 y 4, respectivamente. La tiroxina y fenilalanina tuvieron una mayor variabilidad entre las fases, observando una mayor concentración en las fases 2 y 5, respectivamente. Los tres primeros AAs (glutamato, glutamina y aspartato) tienen funciones claves en los procesos fisiológicos y metabólicos de las plantas ya que intervienen en la asimilación de amonio sincronizándola con las rutas metabólicas relacionadas con la nutrición de las plantas, la energía, la fotosíntesis y las respuestas a los estreses abióticos y bióticos, además actúan como portadores de nitrógeno, y están involucrados en la síntesis del resto de aminoácidos (Osuji y Madu, 2012; Han y col., 2021). En cuanto a la tiroxina es importante en las plantas porque está involucrada en la síntesis de proteínas y participa en la ruta del ácido shikímico. Este aminoácido es precursor de compuestos fenilpropanoides (metabolismo secundario) entre los que se incluyen cumarinas, flavonoides, isoflavonoides, lignanos, silbenos, etc que tienen importantes funciones en la tolerancia de las plantas a los estreses abióticos y bióticos. Finalmente, la fenilalanina es un aminoácido aromático que también forma parte de la ruta del ácido shikímico, formándose a partir del arogenato. Está relacionado también con el metabolismo de los fenilpropanoides

que tienen importantes funciones en la defensa contra patógenos, protección contra estrés abiótico, transducción de señales y comunicación con otros organismos (Astaneh y col., 2018; Barros y Dixon, 2020).

En la familia de compuestos relacionados con las rutas metabólicas de las pentosas fosfato y los ácidos tricarbóxicos, se observó que, en todas las fases fenológicas estudiadas, el azúcar mayoritario fue la fructosa, siendo la concentración de glucosa y sacarosa similares entre sí, alcanzando todos ellos la máxima concentración en la fase 4. Estos azúcares son importantes en las plantas porque actúan como sustratos de las rutas metabólicas relacionados con la fijación de CO<sub>2</sub>, el transporte de carbono y energía desde los órganos fuente a los órganos sumideros (Koch, 2004). En nuestro estudio vemos que en la mayoría de las variedades se produce un descenso drástico de la concentración de azúcares al pasar del estado fenológico F4 a F5 debido a que los frutos en su etapa de maduración demandan una gran cantidad de azúcares (Agius y col., 2018). En cuanto a los ácidos orgánicos del ciclo de Krebs el mayoritario fue el malato seguido del citrato, alcanzando la máxima concentración en F3 y F1, respectivamente. El malato, en muchas plantas, es el ácido que más se acumula, cumpliendo muchas funciones en las células vegetales. Una de estas es la de actuar como osmolito y regulador de cargas compensando la carga positiva de potasio, función particularmente importante en las respuestas de regulación estomática (Meyer y col., 2010).

Respecto a los macronutrientes y micronutrientes de forma general se pudo establecer que los requerimientos nutricionales del cultivo de tomate siguieron el orden N = Ca = K < Mg < P < Fe = Mn < B = Zn < Cu. Siguiendo la evaluación de las fases fenológicas, en la fase F3 las plantas mostraron un gran requerimiento en P debido a que en esta fase se produce la floración en la que este nutriente tiene un papel fundamental (Jin y col., 2005). En esta fase también destacan las altas concentraciones de Cu, Mn y Zn; ya que todos ellos tienen una importante relación con el crecimiento y desarrollo de las plantas (Alejandro y col., 2020). En la fase F4 de desarrollo del fruto se observó que el K, Mg y N alcanzan su mayor concentración debido a que estos nutrientes están directamente relacionados con el cuaje y el desarrollo de los frutos de tomate (Sainju y col., 2003). Además, el N resulta de gran importancia durante todas

las etapas de desarrollo ya que es el encargado de proporcionar soporte a las plantas, promueve el desarrollo vegetativo y estimulan el crecimiento de las raíces (Ding y col., 2018). En la fase de maduración del fruto, F5, los mayores requerimientos nutricionales fueron para el Ca, B y Fe; donde todos ellos son nutrientes esenciales tanto en el desarrollo de las plantas como de los frutos (Davis y col., 2003; Sakya, 2019; Sajid y col., 2020). Una mala fertilización de Ca puede provocar la fisiopatía en los frutos conocida como BER (Vinh y col., 2018).

En cuanto al estudio hormonal, trans-Zeatin (tZ), isopentenyladenine (iP), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (AS) y ácido jasmónico (AJ) mostraron sus mayores concentraciones en la F5 de desarrollo del fruto. Esto podría ser debido a que las hormonas tZ, ABA, AS, y AJ son las encargadas de regular el desarrollo y maduración de los frutos (Srivastava y Handa, 2005). Se conoce que las hormonas vegetales juegan un papel importante en el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular de los cultivos (Wilkinson y col., 2012; Zhang y Huang, 2013).

### 8.1.2. Conclusión

En este trabajo se han seleccionado cuatro genotipos de tomate de características agronómicas muy diferentes como son 'Green Zebra', 'Cherry', 'Montserrat' y 'Tres Cantos' para caracterizar sus perfiles iónico, metabólico y hormonal en sus diferentes estados fenológicos. Estos estudios revelaron que la mayor variabilidad se dio entre las fases fenológicas y una pequeña variabilidad puede ser explicada por los genotipos. De los compuestos mayoritarios en el estudio de iónica destaca el N seguido del K y P. En cuanto al estudio hormonal y metabólico, se detectaron y cuantificaron aminoácidos, compuestos de la ruta de las pentosas fosfato y de los ácidos tricarbónicos, y hormonas siendo los mayoritarios glutamato, glutamina, aspartato, tiroxina, fenilalanina, sacarosa, malato y isopentenyladenine. Por lo tanto, los productos bioestimulantes para el cultivo del tomate deberían contener estos compuestos si se quiere estimular el crecimiento y producción, ya que le suministrarían a las plantas buena parte de los metabolitos que necesitan.

## 8.2. Publicación 02

### Título

Physiological, nutritional and metabolomic responses of tomato plants after the foliar application of amino acids aspartic acid, glutamic acid and alanine

### Autores

Alfosea-Simón, M., Simón-Grao, S., Zavala-González, E.A., Cámara-Zapata, J.M., Simón, I., Martínez-Nicolás, J.J., Lidón, V., y García-Sánchez, F.

### Revista

*Frontiers in Plant Science*, 11, 581234.

### Categoría JCR

Plant Science

### Categoría de cuartil

Q1

### Factor de impacto

5,753 (2020)

Este estudio tuvo como objetivo conocer qué efectos tiene la aplicación de los aminoácidos glutámico, aspártico y alanina, aplicados de forma individual o en algunas de sus mezclas, en los procesos fisiológicos y metabólicos, y el estado nutricional de plantas de tomate de la variedad 'Optima'; y si estos cambios estimulan los parámetros de crecimiento vegetativo de las plantas.

### 8.2.1. Resumen de resultados y discusión

En este experimento se observó que la aplicación de AAs vía foliar puede alterar el crecimiento vegetativo de las plantas. Pero este efecto dependió de la composición de AAs que se aplican a las plantas. Según los datos obtenidos, se puede concluir que el mejor tratamiento de todos los aplicados fue la mezcla de Asp+Glu. Y, teniendo en cuenta que la aplicación de estos dos AAs de forma individual ó no afectó a este parámetro (Asp) ó lo disminuyó (Glu), con respecto a las plantas control, queda demostrado que entre estos dos AAs se da un efecto sinérgico. Mientras tanto, en el otro extremo, se encuentra el comportamiento que tuvieron las plantas cuando se les aplicó Ala de forma individual o en mezcla. En este caso, parece ser que la Ala es perjudicial para las plantas de tomate cuando se aplica a una concentración de 15 mM; y, cuando se mezcla con Asp+Glu, su efecto negativo se potencia aún más.

Uno de los motivos por los cuales las plantas a las que se les aplicó el tratamiento Asp+Glu tuvieron un mayor crecimiento se puede encontrar en

los datos del estudio fisiológico. Una de las respuestas comunes que tuvieron las plantas cuando se aplicaron los tratamientos con AAs fue el incremento de la conductancia estomática (gs). Sin embargo, las únicas plantas que incrementaron su tasa de asimilación neta de CO<sub>2</sub> paralelamente a la apertura de estomas fueron las del tratamiento Asp+Glu. Por lo que el efecto simultáneo Asp+Glu podría haber estimulado las reacciones bioquímicas de la fotosíntesis. Por otro lado, la aplicación de Ala parece que alteró a los factores no-estomáticos de la fotosíntesis (factores bioquímicos), disminuyendo la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> como se puede ver en los datos procedentes de las plantas tratadas con Ala y Asp+Glu+Ala (Farquhar y Sharkey, 1982).

El estudio de ionómica reveló que las plantas a las que se les aplicó Ala (Ala y Asp+Glu+Ala) alteraron su estado nutricional al incrementar la concentración de K, P y N; esto podría ser debido a un efecto de concentración al disminuir el peso seco de la parte aérea. Asimismo, esta mayor concentración de N que se observa en los tratamientos con Ala (tanto de forma individual como en mezclas) puede tener una relación directa con que este aminoácido aporta un mayor contenido de nitrógeno a las plantas en comparación con los otros AAs aplicados. En consecuencia, se podría establecer que la aplicación foliar de alanina puede llegar a empeorar el uso eficiente del nitrógeno.

En el estudio metabólico se observó que los tratamientos Asp y Glu y su mezcla Asp+Glu incrementaron la concentración de prolina y este incremento fue mayor en la mezcla. El incremento de prolina en estas plantas podría haber ejercido un papel protector que favoreció el incremento de la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> y el crecimiento de las mismas (Ben-Rejeb y col., 2014; Zheng y col., 2011). En el caso contrario, la aplicación de Ala y Asp+Glu+Ala disminuyó la concentración de prolina, y esta respuesta coincidió con una disminución de A<sub>CO2</sub> y el menor crecimiento vegetativo. Estos resultados, ponen de manifiesto que Asp+Glu mejora los parámetros fisiológicos y morfológicos de las plantas mediante la síntesis de prolina. Mientras que la Ala alteró el metabolismo de las plantas reduciendo la concentración de prolina y por tanto, disminuyendo el crecimiento de las mismas.

En las plantas el glutamato y aspartato son precursores de hasta once aminoácidos. La reacción de glutamato + oxalacetato da como resultado aspartato + α-cetoglutarato. Esta reacción es reversible, lo que hace que en las rutas de biosíntesis estén conectados los AAs procedentes del glutamato (como son Alanina, Valina, Leucina, Glutamina, Prolina y Arginina) con los procedentes del Aspartato (como son la Asparragina, Metionina, Treonina, Isoleucina, y Lisina) (Forde y Lea, 2007). La aplicación de glutamato y aspartato y su mezcla no incrementó la concentración foliar de estos AAs en las hojas,

si no que fueron metabolizados para incrementar la concentración de prolina. En cambio, la aplicación de Ala de forma individual o en mezcla incrementó la concentración de Ala en hojas. La aplicación de Ala produjo una disminución de la Tirosina. Este AA es un precursor de metabolitos secundarios derivados de la ruta de p-Coumaroyl CoA, los cuales están relacionados con la capacidad protectora antioxidante de las células y con los mecanismos de protección de plagas y enfermedades de las plantas. Por lo tanto, en nuestro experimento quedó claro que la aplicación de L-Ala a 15 mM debilita los procesos metabólicos de las plantas.

Las rutas metabólicas de la pentosa fosfato, caracterizada por la concentración de fructosa, sacarosa, glucosa y formato, y la de los ácidos tricarbósilicos (citrato, malato y fumarato) también se vieron afectadas por los tratamientos ensayados. Para la aplicación individual de Asp, Glu y Ala y su mezcla Asp+Glu se observan respuestas diferentes. Las mezclas que llevan Ala producen una disminución de la concentración de fructosa, sacarosa, glucosa, malato y citrato. Esto podría sugerir que la Ala aplicada a 15 mM produce alteraciones en el metabolismo del C que le lleva a reducir el crecimiento vegetativo. En el caso de Asp, Glu y su mezcla, se observa que mientras la mezcla mantiene la concentración de glucosa a valores similares a los del control, la aplicación individual disminuye la concentración. En la ruta de ácidos tricarbósilicos se observa que la aplicación de estos tratamientos reduce por igual la concentración del citrato, pero el paso del citrato a fumarato y de fumarato a malato dependió del tratamiento aplicado.

En nuestro experimento, los diferentes cambios que se observan en los procesos metabólicos de las plantas podrían ser debidos a que los AAs y los derivados de estos, además de tener funciones puramente fisiológicas, están involucrados en el metabolismo de las plantas en funciones de señalización. Ha sido descrito que las plantas tienen receptores de glutamato (GRLs) (Vincill y col., 2012; Forde y Roberts, 2014) y la activación de estos receptores podría desencadenar una serie de mecanismos de señalización en procesos relacionados con la absorción de nitrógeno por las raíces (Miller y col., 2008), crecimiento y arquitectura de las raíces (Weiland y col., 2015), metabolismo antioxidante (Hildebrandt y col., 2015; Weiland y col., 2015), regulación de factores de transcripción (Santi y col., 2017), regulación de apertura de estomas y fotosíntesis, y defensa de las plantas (Weiland y col., 2015), así como balances entre el metabolismo del C y N (Kang y Turano, 2003; Price y col., 2012).



### 8.2.2. Conclusión

En este experimento se puso de manifiesto que la aplicación de AAs a las plantas de tomate puede ser beneficioso para incrementar su desarrollo vegetativo, pero esta aplicación debe ser previamente optimizada. Para incrementar la eficacia de los productos bioestimulantes en agricultura se requiere todavía adquirir conocimiento científico relacionado con: i) los efectos de los AAs sobre los procesos fisiológicos y metabólicos de las plantas, tanto aplicados de forma individual como en mezcla. Así, en este experimento se puede ver que la aplicación combinada de Asp + Glu tiene mejores efectos que la aplicación individual y ii) la dosis a aplicar; en este experimento se ha visto que la aplicación de 15 mM de Alanina es tóxica en las plantas de tomate, y no es revertida por la aplicación simultánea del pool Asp+Glu+Ala. En resumen, la aplicación de AAs en las plantas produjo cambios en el perfil iónico, fisiológico y metabólico; sin embargo, como estos compuestos tienen múltiples funciones en las plantas para profundizar en los mecanismos que producen estos cambios se requiere hacer estudios de biología de sistemas en los que se integren estudios de metabolómica, proteómica, genómica y hormonales.



### 8.3. Publicación 03

#### Título

Application of biostimulants containing amino acids to tomatoes could favor sustainable cultivation: Implications for tyrosine, lysine, and methionine

#### Autores

Alfosea-Simón, M., Simón-Grao, S., Zavala-González, E.A., Cámara-Zapata, J.M., Simón, I., Martínez-Nicolás, J.J., Lidón, V., Rodríguez-Ortega, W.M., y García-Sánchez, F.

#### Revista

*Sustainability*, 12 (22), 9729

#### Categoría JCR

Environmental Science

#### Categoría d e cuartil

Q2

#### Factor de impacto

3,251 (2020)

El objetivo general de este ensayo fue el de conocer los efectos que tiene la aplicación foliar exógena de los aminoácidos tirosina, lisina y metionina de forma individual o sus mezclas en los procesos fisiológicos, metabólicos, y nutricionales de plantas de tomate de la variedad 'Óptima', y determinar si estos cambios estimulan el crecimiento de las plantas.

#### 8.3.1. Resumen de resultados y discusión

En este ensayo se observó que la aplicación exógena de los aminoácidos Tyr, Lys y Met, tanto individual como su mezcla (Tyr+Lys+Met) incrementó la tasa de crecimiento de las plantas de tomate con respecto a las plantas control. Por lo tanto, las aplicaciones de estos AAs vía foliar tienen efectos beneficiosos en las plantas de tomate. La aplicación conjunta de Tyr+Lys+Met no intensificó la respuesta de las plantas con respecto a su aplicación individual, por lo que se puede decir que la combinación de estos tres AAs tiene un efecto neutro en el que no se potencia ni se empeora el efecto sobre las plantas. En cambio, en otros estudios se han visto interacciones tanto sinérgicas como antagónicas de mezcla de AAs.

La aplicación de Tyr, Lys, y Met de forma individual estimuló los procesos fisiológicos de las plantas. En el estudio de intercambio gaseoso se vio que la  $A_{CO_2}$  incrementó un 30% con respecto a las plantas control. Además, la aplicación de los AAs también reguló a la baja la conductancia estomática y la transpiración foliar, de tal manera que la relación entre la  $A_{CO_2}$  y la transpiración foliar (relación conocida como uso eficaz del agua, UEA) aumentó con la aplicación de los tratamientos de AAs con respecto a las plantas control, siendo esta relación más alta en las plantas a las que se les aplicó el tratamiento de Tirosina. Valores altos de UEA son beneficiosos para los cultivos porque indican que para una misma cantidad de agua transpirada son capaces de producir una mayor biomasa, lo que permite a las plantas regular y ahorrar agua de forma sostenible durante su ciclo de vida. Con estos datos podemos concluir que la aplicación de Tyr, Lys y Met inducen en las plantas un incremento del UEA mediante la regulación de factores no estomáticos y de factores estomáticos (regulación de la apertura y cierre de estomas).

En el estudio iónico se puede ver que todas las plantas, independientemente del tratamiento, tuvieron una concentración de nutrientes en las hojas en el rango de la normalidad para el cultivo de tomate (Watanabe y col., 2016). Ahora bien, esta concentración fue más baja (Ca, K, Mg, y P) en las plantas a las que se les aplicaron los AAs. Esto no quiere decir que los tratamientos de AAs inhibieran la absorción de nutrientes, más bien este efecto podría estar relacionado con un efecto de dilución que se produjo al incrementar la biomasa foliar en un 46%. Además, la disminución de la concentración mineral sin que se vean modificados los parámetros de crecimiento o la  $A_{CO_2}$  podría indicar que la aplicación de estos AAs puede incrementar el uso eficaz de los nutrientes; es decir que para una menor concentración de nutrientes en las hojas estas plantas son capaces de incrementar y estimular el crecimiento y los procesos fisiológicos, respectivamente, con respecto a las plantas que no se les aplicaron los AAs. Solamente en el N y el Fe se observaron un modelo diferente al comentado anteriormente. En el caso del N no hubo diferencias entre el control y los tratamientos con AAs, esto puede ser debido al suministro extra de N que tuvieron las plantas a las que se les aplicaron los AAs.

El estudio metabólico muestra que la aplicación de los AAs, independientemente del tratamiento, cambió la concentración de prolina y glutamina en el aminograma de las hojas ya que se produjo un incremento de la prolina y una disminución de la glutamina que hicieron que en las plantas tratadas con AAs exógenos la prolina se convirtiera en el aminoácido mayoritario y que la glutamina se acercara a valores del aspartato. La prolina es un aminoácido con múltiples funciones en las plantas entre las que se incluyen el ajuste osmótico, estabilización de membranas y proteínas, fuente de reserva

de carbono y nitrógeno, inhibición de las especies reactivas de oxígeno (ROS), etc. (Dar y col., 2016; Pervaiz y col., 2019). El aumento de este AA por la aplicación exógena de Tyr, Lys y Met hizo que las plantas respondieran mejor a las condiciones medioambientales. En la misma línea nos encontramos con el incremento de la isoleucina en todos los tratamientos que se aplicaron AAs, y el incremento de la tirosina en los tratamientos de Tyr y Tyr+Lys+Met. Estos dos AAs, tirosina e isoleucina, tienen funciones específicas en los cultivos. Se conoce que los aminoácidos de cadena ramificada como la isoleucina, tienen un papel fundamental en la tolerancia a los estreses por parte de la planta, esto puede ser gracias al ajuste del pH intracelular, a la acumulación de osmolitos y la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno (ROS), xenobióticos y metales pesados (Joshi y col., 2010).

El equipo H-RMN identificó como ácidos orgánicos mayoritarios los compuestos: malato, citrato, fumarato y formato. Estos compuestos participan en la ruta de los ácidos tricarboxílicos (citrato, fumarato y malato), y la ruta de las pentosas fosfato (formato). La concentración de estos ácidos orgánicos siguió el siguiente orden: malato > citrato > fumarato > formato, y este no cambió con la aplicación foliar de los diferentes AAs; aunque la concentración de estos compuestos sí que se vio afectada por los tratamientos aplicados con respecto a las plantas control. Estos datos indican que la aplicación de AAs modifica los procesos metabólicos de las plantas. Se observó una respuesta generalizada con la aplicación de Tyr, Lys, Met, y sus mezclas basada en un incremento de la concentración de malato y disminución de la concentración de citrato y fumarato. El incremento de malato en el ciclo de Krebs (ácido mayoritario) podría indicar que el tratamiento con los AAs indujo una mayor entrada de C al ciclo a la ruta de la glicolisis lo que podría generar más poder oxidante y energía con respecto a las plantas a las que no se les aplican los AAs (Zhong y col., 2016).

Los azúcares mayoritarios en las hojas de las plantas de tomate son fructosa, sacarosa y glucosa. En las plantas control se observó que la concentración disminuye en el siguiente orden fructosa>sacarosa>glucosa. Sin embargo, cuando se le aplican los AAs este perfil cambian siguiendo el orden fructosa>glucosa>sacarosa. Por lo tanto, los AAs han podido influir en una mayor entrada de C a la planta incrementando la concentración de fructuosa y glucosa de tal manera que el aumento de glucosa fue dirigido a exportar más C a las reacciones de glucolisis más que a la síntesis de sacarosa. Esto haría que la planta tenga más Carbono, potencial redox, y energía disponible para su crecimiento (Zhong y col., 2016).

### 8.3.2. Conclusión

En este experimento se ha puesto de manifiesto que aplicaciones vía foliar de Tyr, Lys y Met a una concentración de 15 mM tienen efectos beneficiosos en las plantas de tomate ya que se produce un incremento del desarrollo vegetativo en relación a las plantas control. Estos tratamientos estimularon la  $A_{CO_2}$ , incrementaron el uso eficaz de los nutrientes y el uso eficaz del agua; esto hace que la aplicación de estos AAs pueda ser útil en estrategias agronómicas dirigidas a ahorrar agua. El estudio metabólico indica que el mayor crecimiento vegetativo en las plantas que se le aplicaron los AAs podría ser debido a que: i) las plantas incrementan la concentración de prolina, un AA relacionado con los procesos de ajuste osmótico y de protección contra factores medioambientales adversos, ii) la mayor tasa de  $A_{CO_2}$  suministró a las plantas una mayor cantidad de Carbono en forma de fructosa y glucosa que fue destinada a los procesos de glucolisis y ciclo de Krebs para obtener mayor poder reductor, energía, y moléculas de carbono necesarias para su crecimiento. Para poder relacionar los perfiles metabólicos con el crecimiento vegetativo es necesario en un futuro utilizar software de inteligencia artificial con los que estimar cómo será el crecimiento de las plantas a partir de dichos perfiles metabólicos.



## 8.4. Publicación 04

### Título

Effect of foliar application of amino acids on the salinity tolerance of tomato plants cultivated under hydroponic system

### Autores

Alfosea-Simón, M., Zavala-González, E.A., Cámara-Zapata, J.M., Martínez-Nicolás, J.J., Simón, I., Simón-Grao, S., y García-Sánchez, F.

### Revista

*Scientia Horticulturae*, 272, 109509

Categoría JCR	Categoría de cuartil	Factor de impacto
Horticulture	Q1	3,463 (2020)

El objetivo de este ensayo fue evaluar los efectos que tienen la aplicación foliar de aminoácidos (Arginina, Metionina, Glutamina, Prolina y Triptofano) ya sea en forma individual o en mezclas en las plantas de tomate regadas con aguas salinas con el fin de: i) conocer qué aminoácidos pueden incrementar la tolerancia a la salinidad en estas plantas, ii) determinar los posibles mecanismos de tolerancia que inducen estos aminoácidos, y iii) identificar posibles efectos sinérgicos o antagónicos que se pueden dar entre estos aminoácidos.

### 8.4.1. Resumen de resultados y discusión

En nuestro ensayo, las plantas a las que se les aplicaron los tratamientos de AAs Met, Pro+Glu y Met+Trp tuvieron una mayor tolerancia a la salinidad con respecto al resto de tratamientos salinos. Según los datos de concentración de CRA, concentración foliar de Cl<sup>-</sup> y Na, y la concentración de K y Nitratos, esta mayor tolerancia no estuvo relacionada con la acumulación de Cl<sup>-</sup> en las hojas, el estado hídrico o el estado nutricional de las plantas, ya que no se observan ninguna relación entre estos parámetros y el crecimiento vegetativo de las plantas. Sin embargo, en las plantas a las que se les aplicaron los tratamientos Met, Pro+Glu y Met+Trp tuvieron una mayor concentración de azúcares solubles totales. Los azúcares tienen una alta capacidad antioxidante que podrían haber reducido el estrés oxidativo causado por la toxicidad del Cl<sup>-</sup> y Na. De hecho, en estas plantas la concentración de clorofilas totales apenas se redujo con la salinidad, lo que indica que la toxicidad de Cl<sup>-</sup> y/o Na fue menor que para el resto de tratamientos, a pesar de que se acumularon en una concentración similar al

de las plantas de otros tratamientos salinos. En el caso de los tratamientos Met y Met+Trp barajamos la hipótesis de que la Met puede incrementar la tolerancia a la salinidad al incrementar la concentración de poliaminas. Se sabe que estos compuestos están implicados en la mayor tolerancia a la salinidad de las plantas (Ke y col., 2018), y la Met es un precursor de la ruta de bioquímica de síntesis de estos compuestos (Duarte-Sierra y col., 2019). En el caso del tratamiento Pro+Glu, la presencia del ácido glutámico podría ayudar a las plantas a tolerar la salinidad gracias a que este aminoácido modula el equilibrio iónico y potencia los sistemas antioxidantes bajo estrés salino (Guo y col., 2017).

Otras de las conclusiones relevantes que se pueden extraer de este ensayo es en relación con i) la capacidad osmorreguladora de los AAs, ii) la acumulación de prolina en las plantas, y iii) el efecto que tiene el triptófano en la acumulación de Cl<sup>-</sup> y Na en las hojas. Comenzando con el primero, uno de los efectos negativos más importantes que tiene la salinidad en las plantas es la deshidratación de los tejidos. Las plantas para impedir que esto ocurra incrementan la síntesis de sustancias osmorreguladoras entre las que se incluyen la prolina y la glicina-betaina (Núñez-Vázquez y col., 2017). Se sabe incluso que la aplicación endógena de estos aminoácidos ayuda a que las plantas se ajusten osmóticamente (Sadak y col., 2015). Pues bien, en este experimento hemos puesto de manifiesto que otros AAs como la Met, Arg, y el ac. Glu también pueden actuar como osmorreguladores, mientras que el Trp no tiene capacidad osmorreguladora. En el caso de la prolina, cabe destacar que en las plantas que no disminuyeron su crecimiento con la salinidad (Met, Pro+Glu y Met+Trp) la concentración de prolina fue menor significativamente que la de otros tratamientos salinos. Se sabe que las plantas de tomate sintetizan prolina bajo condiciones de estrés salino (Kavi Kishor y col., 2015; Siddiqui y col., 2020), pero su acumulación no es suficiente para que tenga un gran efecto beneficioso (Bendaly y col., 2016; Mansour y Ali, 2017) y además, esta acumulación aumenta conforme las plantas se ven más afectadas por el estrés. Por lo tanto, la baja concentración de prolina en los tratamientos Met, Pro+Glu y Met+Trp estaría indicando que estas plantas son más tolerantes que las del resto de tratamientos.

Con respecto al Trp, este junto con la Phe y Tyr, son aminoácidos aromáticos derivados de la ruta del ácido shikímico que actúan como precursores de diferentes alcaloides que tienen acción contra microorganismos patógenos y herbívoros activando mecanismos de defensa que podrían tener también acción contra los estreses abióticos (Marco, 2006; Bilal y col., 2018). Este tipo de compuestos se utilizan en la fabricación de nuevos productos bioestimulantes por su acción estimulante y de inductores de defensa contra patógenos. En



nuestro ensayo se observó que la aplicación de Trp tiene un efecto perjudicial sobre las plantas como es la acumulación de los iones tóxicos Cl<sup>-</sup> y Na. Aunque este efecto no ha repercutido de forma grave en nuestro ensayo como demuestra que la biomasa seca total de las plantas salinas sin AAs y a las que se le aplicó el tratamiento Trp fueron las mismas; aunque habría que estudiar si a largo plazo esto podría repercutir negativamente en el desarrollo del cultivo.

En este ensayo, también hemos puesto de manifiesto que a la hora de aplicar mezclas de AAs a las plantas de tomate cultivadas bajo condiciones salinas, hay que tener en cuenta las posibles interacciones que se dan entre los AAs. Con los datos obtenidos se observa tanto efectos antagónicos como sinérgicos, en los que el efecto antagónico lo podemos ver en el caso de la Met y la Arg. Cuando a las plantas se les aplicó Met de forma individual o mezclada con Trp el resultado fue totalmente diferente que cuando se aplicó mezclada con la Arg. Este AA revertió el efecto positivo de la Met en el crecimiento de las plantas. También es importante observar que el efecto del Trp sobre la concentración de Cl y Na quedó revertido con la mezcla Met+Trp ya que estas plantas tuvieron una concentración similar al resto de plantas cultivadas con condiciones salinas. El efecto sinérgico se dio en la aplicación de la mezcla Pro+ac. Glu. Los efectos de su aplicación en las plantas fueron totalmente diferentes a los efectos observados por la aplicación individual de cada uno de estos dos AAs. La mezcla de estos dos AAs estimuló el crecimiento vegetativo en relación a la aplicación individual.

#### 8.4.2. Conclusión

En relación a la respuesta de las plantas de tomate cultivar "Óptima" a la salinidad se ha visto que cuando se aplican aminoácidos vía foliar el tipo de aminoácido y la forma de combinarlo con otros aminoácidos juegan un papel fundamental, poniendo de manifiesto que se pueden dar distintos tipos de interacciones entre ellos. De todos los tratamientos aplicados Met, Pro+Glu y Met+Trp fueron los que revertieron el efecto negativo de la salinidad. Además, se vieron interacciones negativas entre Met con la Arg y Trp, mientras que Pro y Glu tienen efectos sinérgicos. Sería interesante en un futuro evaluar el comportamiento agronómico del cultivo de tomate cuando se aplican estos tratamientos en condiciones reales de campo y sobre todo, identificar los mecanismos fisiológicos involucrados en las interacciones antagónicas o sinérgicas de los AAs.

## CONCLUSIONES GENERALES | 9



Biblioteca  
UNIVERSIDAD Algora y Hernández

## 9. CONCLUSIONES GENERALES

Para cada uno de los ensayos realizados en este Tesis se han obtenido una serie de conclusiones que han sido expuestas previamente en los correspondientes capítulos de esta memoria. En este apartado se exponen de forma muy resumida las conclusiones globales:

### **Caracterización estados fenológicos de diferentes genotipos**

- Los compuestos analizados en los estudios de metabólica, ionómica y hormonal dieron una mayor variabilidad de respuesta con respecto al estado fenológico de las plantas que frente a los distintos genotipos ensayados. Por lo tanto, los productos bioestimulantes deberían ser formulados de forma genérica para cualquier variedad siguiendo los perfiles nutricionales, metabólicos y hormonales de sus estados fenológicos.
- En el estudio ionómico los nutrientes mayoritarios fueron N, K y P; y en el estudio hormonal y metabólico los compuestos mayoritarios fueron glutamato, glutamina, aspartato, tiroxina, fenilalanina, sacarosa, malato e isopentiladenina. Esta información es valiosa para formular nuevos productos bioestimulantes pero sería conveniente ajustar las cantidades empleadas en las formulaciones según los perfiles obtenidos en los estudios ómicos.

### **Aplicación de aminoácidos para estimular el cultivo de las plantas de tomate**

- La aplicación de aminoácidos de forma foliar puede estimular el desarrollo vegetativo de las plantas de tomate, pero es necesario tener en cuenta los efectos que tienen estos compuestos cuando son aplicados de forma individual o en mezclas.
- La aplicación foliar Asp+Glu, Tyr, Lys y Met a 15 mM estimulan el desarrollo vegetativo de las plantas de tomate. Los cambios metabólicos y nutricionales estimularon la asimilación neta de CO<sub>2</sub> e incrementaron el uso eficaz del agua conduciendo a un mayor desarrollo vegetativo.
- La aplicación foliar de 15 mM de Ala es tóxica y no se debería aplicar a las plantas ni en forma individual ni en mezclas con otros aminoácidos.
- En los dos experimentos se han observado que la aplicación de AAs en mezclas puede dar lugar a efectos antagónicos, sinérgicos o neutros y es necesario caracterizarlos para hacer productos bioestimulantes de calidad.

### **Aplicación de aminoácidos bajo estrés salino**

La aplicación de aminoácidos de forma foliar en plantas cultivadas bajo condiciones adversas como la salinidad producida por la alta concentración de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  en el agua de riego puede ser beneficioso para los cultivos ya que se estimulan una serie de mecanismos como ajuste osmótico o actividad antioxidante capaz de contrarrestar los efectos tóxicos del  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$ . En este ensayo se llegaron a las conclusiones.

- La aplicación de Met, Pro+Glu, y Met+Trp incrementa la tolerancia a la salinidad de las plantas de tomate debido al incremento de la concentración de azúcares solubles totales.
- La pulverización de Met conjunta con Arg o Trp produjeron efectos antagónicos reduciendo los efectos positivos de la Met en las plantas; mientras que la aplicación Pro + Glu tiene efectos sinérgicos en relación a la aplicación individual de cada uno de estos AAs.





## 10. INVESTIGACIONES FUTURAS

La formulación de bioestimulantes facilitará la conversión de la agricultura convencional a un modelo de producción agraria más respetuosa con el medio ambiente al reducir el empleo de fertilizantes convencionales y otros productos de síntesis química. En esta tesis hemos estudiado cómo responden las plantas a la aplicación de aminoácidos identificando los procesos fisiológicos y bioquímicos que se ven estimulados, y las relaciones sinérgicas, antagónicas, o neutras que hay entre estos compuestos. No obstante para fabricar un producto bioestimulante a escala industrial será necesario todavía resolver una serie de cuestiones como: i) conocer cuál es el comportamiento químico de los aminoácidos cuando son mezclados con otros compuestos que forman parte de estos productos como pueden ser apelmazantes, reguladores del pH, colorantes, antiespumantes y otras materias activas; ii) conocer la mejor forma de fabricar estos productos determinando los parámetros técnicos de los equipos que se usan a escala industrial como pueden ser torvas, mezcladoras, agitadores, control de temperatura, orden de mezclado, etc; y iii) conocer los efectos de los nuevos fertilizantes en los cultivos determinando la mejor forma de aplicarlos teniendo en cuenta el tipo de cultivo y las condiciones edafoclimáticas estableciendo la dosis, la forma de aplicarlo (foliar vs radicular), cuando aplicarlos (estados fenológicos de los cultivos) y como combinar su aplicación con la de los fertilizantes convencionales.

Conocer todos estos aspectos puede ser de gran utilidad a la hora de formular bioestimulantes de última generación, bien adicionando estos aminoácidos de forma libre o seleccionando aquellas materias primas procedentes de muy diferente naturaleza (residuos agrícolas, ganaderos, industriales, estaciones de depuradoras, etc) que los contengan en la proporción y concentraciones deseadas.

Asimismo, las herramientas ómicas son de gran utilidad para conocer los nutrientes y metabolitos que más demandan las plantas en cada uno de sus estados fenológicos, cómo responden las plantas a estos productos, y, para analizar la composición química de los mismos. No obstante, con estas herramientas se obtienen datos de forma masiva, en ocasiones, difícil de gestionar e interpretar, por lo que el uso de herramientas de inteligencia artificial podría ser un gran aliado para diseñar y desarrollar los nuevos productos bioestimulantes integrando toda esta información. Por lo tanto, para poder elaborar productos bioestimulantes con una alta eficacia sería imprescindible conocer qué papel juegan los diferentes aminoácidos en los procesos fisiológicos y metabólicos de los cultivos, y los posibles efectos antagónicos, neutros y sinérgicos que se dan

entre ellos. Permitiendo todo esto la fabricación de productos bioestimulantes 'a la carta', es decir, productos adaptados a las necesidades de las plantas y los cuales aportarían los compuestos que más demandan las plantas. Otra forma de desarrollar estos productos sería investigando qué aminoácidos tienen efecto "elicitador" en las plantas. Es decir, usar compuestos que al aplicarse a bajas dosis son capaces de inducir una serie de respuestas en las plantas que conducen a estimular su crecimiento e incrementar la producción y la calidad de la cosecha.







Biblioteca  
UNIVERSIDAD Algora y Hernández

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelhamid, M.T., Rady, M.M., Osman, A.S. y Abdalla, M.A.** (2013). Exogenous application of proline alleviates salt-induced oxidative stress in *Phaseolus vulgaris* L. plants. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88(4), 439-446. <https://doi.org/10.1080/14620316.2013.11512989>
- Abdel-Said, Z.H.R., Bazaraa, W.M. y Nabih, A.** (2019). Effect of amino acid (threonine), irrigation levels and their interaction on growth, flowering, bulbs productivity and chemical constituents of *Lilium longiflorum*, Thunb. plant. *Middle East Journal of Agriculture Research*, 8(1), 153-166.
- Aghaei, K., Pirbalouti, A.G., Mousavi, A., Badi, H.N. y Mehnatkesh, A.** (2019). Effects of foliar spraying of l-phenylalanine and application of bio-fertilizers on growth, yield, and essential oil of hyssop [*Hyssopus officinalis* L. subsp. *Angustifolius* (Bieb.)]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101318. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101318>
- Aghdam, M.S., Moradi, M., Razavi, F. y Rabiei, V.** (2019). Exogenous phenylalanine application promotes chilling tolerance in tomato fruits during cold storage by ensuring supply of NADPH for activation of ROS scavenging systems. *Scientia Horticulturae*, 246, 818-825. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.074>
- Agius, C., Von Tucher, S., Poppenberger, B. y Rozhon, W.** (2018). Quantification of glutamate and aspartate by ultra-high performance liquid chromatography. *Molecules*, 23(6), 1389. <https://doi.org/10.3390/molecules23061389>
- Ahmad, R., Ishaque, W., Khan, M., Ashraf, U., Riaz, M.A., Ghulam, S. y col.** (2020). Relief role of lysine chelated zinc (Zn) on 6-week-old maize plants under tannery wastewater irrigation stress. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(14), 5161. <https://doi.org/10.3390/ijerph17145161>
- Ahmed, A.M.H., Khalil, M.K., Abd El-Rahman, A.M. y Nadia, A.H.** (2012). Effect of zinc, tryptophan and indole acetic acid on growth, yield and chemical composition of Valencia orange trees. *Journal of Applied Sciences Research*, 901-914.
- Akladios, S.A. y Abbas, S.M.** (2013). Alleviation of sea water stress on tomato plants by foliar application of aspartic acid and glutathione. *Bangladesh Journal of Botany*, 42(1), 31-44. <https://doi.org/10.3329/bjb.v42i1.15822>

- Akram, N.A., Ashraf, M., Ashraf, M. y Sadiq, M.** (2020). Exogenous application of L-methionine mitigates the drought-induced oddities in biochemical and anatomical responses of bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Scientia Horticulturae*, 267, 109333. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109333>
- Albacete, A., Ghanem, M.E., Martínez-Andújar, C., Acosta, M., Sánchez-Bravo, J., Martínez, V. y col.** (2008). Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Journal of Experimental Botany*, 59(15), 4119-4131. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern251>
- Al-Duraid, M.H., Al-Taey, K.A. y Al-Kikhani, A.H.** (2019). Effect of phenylalanine and naphthalene acetic acid on growth, yield and antioxidant activity of Fenugreek *Trigonella foenum-graecum*. En: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, IOP Publishing, 388, 012073. <https://doi.org/doi:10.1088/1755-1315/388/1/012073>
- Alejandro, S., Höller, S., Meier, B. y Peiter, E.** (2020). Manganese in plants: from acquisition to subcellular allocation. *Frontiers in Plant Science*, 11, 300. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00300>
- Ali, Q., Ashraf, M., Shahbaz, M. y Humera, H.** (2008). Ameliorating effect of foliar applied proline on nutrient uptake in water stressed maize (*Zea mays* L.) plants. *Pakistan Journal of Botany*, 40(1), 211-219.
- Al-Kazzaz, A.G., Al-Hadeethia, M.A. y Attarbash, R.W.** (2009). Physiological and Anatomical Study of Caraway (*Carum carvi* L.) Plant Sprayed with serine and arginine. *Journal of Global Pharma Technology*, 10(10), 289-296.
- Almas, H.I., Anwar, S., Kausar, A., Farhat, F., Munawar, M. y Khalizadieh, R.** (2021). Exogenous Application of Methionine and Phenylalanine Confers Salinity Tolerance in Tomato by Concerted Regulation of Metabolites and Antioxidants. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s42729-021-00588-9>
- Al-Mohammad, M.H. y Al-Taey, D.K.** (2019). Effect of tyrosine and sulfur on growth, yield and antioxidant compounds in arugula leaves and seeds. *Research on Crops*, 20(1), 116-120. <https://doi.org/10.31830/2348-7542.2019.016>
- Amin, A.A., Gharib, F.A., El-Awadi, M. y Rashad, E.S.M.** (2011). Physiological response of onion plants to foliar application of putrescine and glutamine. *Scientia Horticulturae*, 129(3), 353-360. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.03.052>

- Amin, A.A., Abouzienna, H.F., Abdelhamid, M.T., Rashad, E.S.M. y Gharib, A.F.** (2014). Improving growth and productivity of faba bean plants by foliar application of thiourea and aspartic acid. *International Journal of Plant & Soil Science*, 724-736.
- Anuario de Estadística Agraria.** (2017-2018). Análisis provincial de superficie, rendimiento y producción. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/default.aspx>
- AOAC** (1984). *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists*, Washington, DC, EEUU.
- Aqsa, T., Khalid, N., Khalid, H., Bhatti, K.H., Siddiqi, E.H., Aneela, K. y col.** (2013). Foliar application of proline for salt tolerance of two wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *World Applied Sciences Journal*, 22(4), 547-554.
- Arruda, P. y Barreto, P.** (2020). Lysine catabolism through the saccharopine pathway: enzymes and intermediates involved in plant responses to abiotic and biotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 11, 587. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00587>
- Astaneh, R.K., Bolandnazar, S., Nahandi, F.Z. y Oustan, S.** (2018). Effect of selenium application on phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, phenol leakage and total phenolic content in garlic (*Allium sativum* L.) under NaCl stress. *Information Processing in Agriculture*, 5(3), 339-344. <https://doi.org/10.1016/j.inpa.2018.04.004>
- Azarakhsh, M.R., Asrar, Z. y Mansouri, H.** (2015). Effects of seed and vegetative stage cysteine treatments on oxidative stress response molecules and enzymes in *Ocimum basilicum* L. under cobalt stress. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15(3), 651-662. <http://doi.org/10.4067/S0718-95162015005000044>
- Azevedo, R.A., Lancien, M. y Lea, P.J.** (2006). The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. *Amino acids*, 30(2), 143-162. <http://doi.org/10.1007/s00726-005-0245-2>
- Bahadur, A., Singh, D.P., Sarma, B.K. y Singh, U.P.** (2012). Foliar application of l-phenylalanine and ferulic acids to pea plants: induced phenylalanine ammonia lyase activity and resistance against *Erysiphe pisi*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45(4), 398-403. <https://doi.org/10.1080/03235408.2011.587963>

- Banin Sogvar, O., Razavi, F., Rabiei, V. y Gohari, G.** (2020). Postharvest application of L cysteine to prevent enzymatic browning of "Stanley" plum fruit during cold storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(10), e14788. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14788>
- Barros, J. y Dixon, R.A.** (2020). Plant phenylalanine/tyrosine ammonia-lyases. *Trends in plant science*, 25(1), 66-79. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.09.011>
- Bates, L.S., Waldren, R.P. y Teare, I.D.** (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39(1), 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Becerra-Martínez, E., Florentino-Ramos, E., Pérez-Hernández, N., Zepeda-Vallejo, L. G., Villa-Ruano, N., Velázquez-Ponce, M. y col.** (2017). 1H NMR-based metabolomic fingerprinting to determine metabolite levels in serrano peppers (*Capsicum annum* L.) grown in two different regions. *Food Research International*, 102, 163-170. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.005>
- Ben Ahmed, C., Ben Rouina, B., Sensoy, S., Boukhriss, M. y Ben Abdullah, F.** (2010). Exogenous proline effects on photosynthetic performance and antioxidant defense system of young olive tree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4216-4222. <https://doi.org/10.1021/jf9041479>
- Bendaly, A., Messedi, D., Smaoui, A., Ksouri, R., Bouchereau, A. y Abdelly, C.** (2016). Physiological and leaf metabolome changes in the xerohalophyte species *Atriplex halimus* induced by salinity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 103, 208-218. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.037>
- Ben-Rejeb, K., Abdelly, C. y Savouré, A.** (2014). How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 278-284. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.04.007>
- Bilal, M., Wang, S., Iqbal, H.M., Zhao, Y., Hu, H., Wang, W. y Zhang, X.** (2018). Metabolic engineering strategies for enhanced shikimate biosynthesis: current scenario and future developments. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(18), 7759-7773. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9222-z>
- Chamarro, J.** (1995). Anatomía y fisiología de la planta. En: *El cultivo del tomate*. Mundi-Prensa, Madrid, 43-91.
- Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R. y Roupheal, Y.** (2015). Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 28-38. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.037>

- Collado-González, J., Piñero, M.C., Otálora, G., López-Marín, J. y Del Amor, F.M.** (2021). Merging Heat Stress Tolerance and Health-Promoting Properties: The Effects of Exogenous Arginine in Cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis L.). *Foods*, 10(1), 30. <https://doi.org/10.3390/foods10010030>
- Çavuşoğlu, K., Dinçtürk, İ. y Çavuşoğlu, D.** (2020a). The Effects of Aspartic Acid on Some Physiological and Cytogenetical Parameters in *Allium cepa* L. Seeds Germinated under Salt Stress. *Bulgarian Journal of Crop Science*, 57(1), 66-72.
- Çavuşoğlu, K., Toğay, D. y Çavuşoğlu, D.** (2020b). Physiological and Cytogenetical Effects of Glutamine Treatment in Onion (*Allium cepa* L.) seeds exposed to salt stress. *Bulgarian Journal of Crop Science*, 57(1), 60-65.
- D'Mello, J.PF.** (2015) Amino Acids in Higher Plants. En: *CABI International*, Edinburgh, UK.
- Dar, M.I., Naikoo, M.I., Rehman, F., Naushin, F. y Khan, F.A.** (2016). Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development. En: *Osmolytes and plants acclimation to changing environment: emerging omics technologies*, Springer, New Delhi, 155-165. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2616-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2616-1_9)
- Davis, J. M., Sanders, D.C., Nelson, P.V., Lengnick, L. y Sperry, W.J.** (2003). Boron improves growth, yield, quality, and nutrient content of tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(3), 441-446. <https://doi.org/10.21273/JASHS.128.3.0441>
- Dawood, M.G., Taie, H.A.A., Nassar, R.M.A., Abdelhamid, M.T. y Schmidhalter, U.** (2014). The changes induced in the physiological, biochemical and anatomical characteristics of *Vicia faba* by the exogenous application of proline under seawater stress. *South African Journal of Botany*, 93, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.03.002>
- Ding, L., Lu, Z., Gao, L., Guo, S. y Shen, Q.** (2018). Is nitrogen a key determinant of water transport and photosynthesis in higher plants upon drought stress? *Frontiers in plant science*, 9, 1143. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01143>
- Diretto, G., Frusciante, S., Fabbri, C., Schauer, N., Busta, L., Wang, Z. y col.** (2020). Manipulation of  $\beta$ -carotene levels in tomato fruits results in increased ABA content and extended shelf life. *Plant biotechnology journal*, 18(5), 1185-1199. <https://doi.org/10.1111/pbi.13283>

- Du Jardin, P.** (2015). Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Duarte-Sierra, A., Nadeau, F., Angers, P., Michaud, D. y Arul, J.** (2019). UV-C hormesis in broccoli florets: Preservation, phyto-compounds and gene expression. *Postharvest Biology and Technology*, 157, 110965. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.110965>
- Duque-Acevedo, M., Belmonte-Ureña, L.J., Plaza-Úbeda, J.A. y Camacho-Ferre, F.** (2020). The management of agricultural waste biomass in the framework of circular economy and bioeconomy: An opportunity for greenhouse agriculture in Southeast Spain. *Agronomy*, 10(4), 489. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040489>
- Duynhoven, J.V., Van As, H., Belton, P.S. y Webb, G.A.** (2013). Magnetic resonance in food science: En: *Food for thought*, Cambridge, RSC Publishing.
- EBIC (European Biostimulants Industry Council)** (2022). Disponible en: <https://biostimulants.eu/>
- El-Sherbeny, M.R. y Teixeira da Silva, J.A.** (2013). Foliar treatment with proline and tyrosine affect the growth and yield of beetroot and some pigments in beetroot leaves. *Journal of Horticultural Research*, 21(2). <https://doi.org/10.2478/johr-2013-0027>
- El-Tanany, M.M. y Abdallah, H.R.** (2019). Valencia orange productivity, fruit quality and storability as affected by foliar application with potassium sulphate, oleic acid, salicylic acid and phenylalanine. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 9(4), 943-962. <https://doi.org/10.36632/mejas/2019.9.4.12>
- Emam, K.A., Gomaa, S.A. y Khela Evon, A.** (2017). Effect of foliar spraying with some amino acids and fertilizer levels on growing of Moringa seedlings. *Journal of Biological Chemistry and Environmental Sciences*, 12(1): 239-61.
- Espinosa-Alonso, L.G., Valdez-Morales, M., Aparicio-Fernandez, X., Medina-Godoy, S. y Guevara-Lara, F.** (2020). Vegetable By-products. Food Wastes and By-products: Nutraceutical and Health Potential, 223-266. <https://doi.org/10.1002/9781119534167.ch8>
- Esquinas-Alcázar, J.T. y Nuez, F.** (1995). Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. *El cultivo del tomate*. Ediciones Mundi Prensa, Madrid, España, 13-42.



- Famiani, F., Battistelli, A., Moscatello, S., Cruz-Castillo, J. G. y Walker, R.P.** (2015). Ácidos orgánicos acumulados en la pulpa de los frutos: Ocurrencia, metabolismo y factores que afectan sus contenidos-una revisión. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 21(2), 97-128. <https://doi.org/10.5154/rchsh.2015.01.004>
- FAO (Food and Agriculture Organization)** (2009). Cambio Climático. El impacto en la agricultura y los costos de adaptación – FAOSTAT. Disponible en: [https://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/AGRO\\_Noticias/docs/costo%20adaptacion.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/AGRO_Noticias/docs/costo%20adaptacion.pdf)
- FAO (Food and Agriculture Organization)**. (2019). Statistics division of the food and agriculture organization of the united nations. Disponible en: <http://faostat3.fao.org>
- Farquhar, G.D. y Sharkey, T.D.** (1982). Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual review of plant physiology*, 33(1), 317-345.
- Foley, J.A., Ramankutty, N., Brauman, K.A., Cassidy, E.S., Gerber, J.S., Johnston, M. y col.** (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature*, 478(7369), 337-342. <https://doi.org/10.1038/nature10452>
- Foolad, M.R.** (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International journal of plant genomics*, 64358.
- Forde, B.G. y Lea, P.J.** (2007). Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signaling. *Journal of Experimental Botany*, 58, 2339-2358. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm121>
- Forde, B.G. y Roberts, M.R.** (2014). Glutamate receptor-like channels in plants: a role as amino acid sensors in plant defence? *F1000prime reports*, 6. <https://doi.org/10.12703/P6-37>
- Frankenberger, W.T., Chang, A.C. y Arshad, M.** (1990). Response of *Raphanus sativus* to the auxin precursor, L-tryptophan applied to soil. *Plant and Soil*, 129(2), 235-241. <https://doi.org/10.1007/BF00032418>
- Frusciante, L., Carli, P., Ercolano, M. R., Pernice, R., Di Matteo, A., Fogliano, V. y Pellegrini, N.** (2007). Antioxidant nutritional quality of tomato. *Molecular nutrition and food research*, 51(5), 609-617. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600158>

- Gao, H., Tuyishime, P., Zhang, X., Yang, T., Xu, M. y Rao, Z.** (2021). Engineering of microbial cells for L-valine production: challenges and opportunities. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01665-5>
- García-Martínez, S., Corrado, G., Ruiz, J.J. y Rao, R.** (2013). Diversity and structure of a sample of traditional Italian and Spanish tomato accessions. *Genetic resources and crop evolution*, 60(2), 789-798. <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9876-9>
- Garde-Cerdán, T., López, R., Portu, J., González-Arenzana, L., López-Alfaro, I. y Santamaría, P.** (2014). Study of the effects of proline, phenylalanine, and urea foliar application to Tempranillo vineyards on grape amino acid content. Comparison with commercial nitrogen fertilisers. *Food chemistry*, 163, 136-141. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.101>
- Gaufichon, L., Reisdorf-Cren, M., Rothstein, S.J., Chardon, F. y Suzuki, A.** (2010). Biological functions of asparagine synthetase in plants. *Plant Science*, 179(3), 141-153. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.010>
- Ghafoor, R., Akram, N.A., Rashid, M., Ashraf, M., Iqbal, M. y Lixin, Z.** (2019). Exogenously applied proline induced changes in key anatomical features and physio-biochemical attributes in water stressed oat (*Avena sativa* L.) plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25(5), 1121-1135. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00683-3>
- Gholami, F., Antonio, J., Evans, C., Cheraghi, K., Rahmani, L. y Amirnezhad, F.** (2021). Tomato powder is more effective than lycopene to alleviate exercise-induced lipid peroxidation in well-trained male athletes: randomized, double-blinded cross-over study. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 18 (1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s12970-021-00415-7>
- Gil-Meseguer, E., Bernabé-Crespo, M.B. y Gómez-Espín, J.M.** (2019). Recycled sewage-a water resource for dry regions of Southeastern Spain. *Water Resources Management*, 33(2), 725-737. <https://doi.org/10.1007/s11269-018-2136-9>
- Grey, C.B., Cowan, D.P., Langton, S.D. y Watkins, R.W.** (1997). Systemic application of L-phenylalanine increases plant resistance to vertebrate herbivory. *Journal of chemical ecology*, 23(5), 1463-1470. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006476.51106.44>
- Grieve, C.M. y Grattan, S.R.** (1983). Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and soil*, 70(2), 303-307.

- Guo, Z., Yang, N., Zhu, C. y Gan, L.** (2017). Exogenously applied poly- $\gamma$ -glutamic acid alleviates salt stress in wheat seedlings by modulating ion balance and the antioxidant system. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(7), 6592-6598. <https://10.1007/s11356-016-8295-4>
- Haissig, B.E. y Dickson, R.E.** (1979). Starch measurement in plant tissue using enzymatic hydrolysis. *Physiologia plantarum*, 47(2), 151-157. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1979.tb03207.x>
- Hammad, S.A. y Ali, O.A.** (2014). Physiological and biochemical studies on drought tolerance of wheat plants by application of amino acids and yeast extract. *Annals of Agricultural Sciences*, 59(1), 133-145. <https://doi.org/10.1016/j.aogas.2014.06.018>
- Han, M., Zhang, C., Suglo, P., Sun, S., Wang, M. y Su, T.** (2021). L-Aspartate: An Essential Metabolite for Plant Growth and Stress Acclimation. *Molecules*, 26(7), 1887. <https://doi.org/10.3390/molecules26071887>
- Hanci, F. y Tuncer, G.** (2020). How do foliar application of melatonin and L-tryptophan affect lettuce growth parameters under salt stress? *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(4), 960-964. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v8i4.960-964.3224>
- Hansen, M., Chae, H.S. y Kieber, J.J.** (2009). Regulation of ACS protein stability by cytokinin and brassinosteroid. *The Plant Journal*, 57(4), 606-614. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03711.x>
- Hansmann, E.** (1973). Pigment analysis. J.R. Stein (Ed.), *Handbook of phycological methods*. En: *Culture method and growth measurement*. Cambridge University Press, Reino Unido, 1, 359-368.
- Hardy, L., Garrido, A. y Juana, L.** (2012). Evaluation of Spain's water-energy nexus. *International Journal of Water Resources Development*, 28(1), 151-170. <https://doi.org/10.1080/07900627.2012.642240>
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K. y Bohnert, H.J.** (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual review of plant biology*, 51(1), 463-499.
- Hassan, A.M. y Mohamed, H.E.** (2019). L-arginine pretreatment enhances drought resistance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants by increase in polyamines content. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(2), 600-605. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9873-0>

- Hassan, M.U., Islam, M.M., Wang, R., Guo, J., Luo, H., Chen, F. y Li, X.** (2020). Glutamine application promotes nitrogen and biomass accumulation in the shoot of seedlings of the maize hybrid ZD958. *Planta*, 251(3), 1-15. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03363-9>
- Hayat, K., Khan, J., Khan, A., Ullah, S., Ali, S. y Fu, Y.** (2021). Ameliorative Effects of Exogenous Proline on Photosynthetic Attributes, Nutrients Uptake, and Oxidative Stresses under Cadmium in Pigeon Pea (*Cajanus cajan* L.). *Plants*, 10(4), 796. <https://doi.org/10.3390/plants10040796>
- Hildebrandt, T.M., Nesi, A.N., Araújo, W.L. y Braun, H.P.** (2015). Amino acid catabolism in plants. *Molecular plant*, 8(11), 1563-1579. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.005>
- Hodge, J. y Hofreiter, B.** (1962). Determination of reducing sugars and carbohydrates. R. Whistler, M. Wolfrom. En: *Methods in carbohydrate chemistry*. Academic Press, New York, 380-394
- Hussain, A., Ali, S., Rizwan, M., ur Rehman, M.Z., Hameed, A., Hafeez, F. y col.** (2018). Role of zinc-lysine on growth and chromium uptake in rice plants under Cr stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37(4), 1413-1422. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9831-x>
- Ingle, R.A.** (2011). Histidine biosynthesis. En: *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 9. <https://doi.org/10.1199/tab.0141>
- Jaisi, A. y Panichayupakaranant, P.** (2020). Enhanced plumbagin production in *Plumbago indica* root culture by simultaneous and sequential dual elicitations using chitosan with L-alanine and methyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Bioresources and Bioprocessing*, 7(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s40643-020-0298-9>
- Jerry, A.N. y Al-Jarah, T.M.** (2015). Effect of foliar application of two amino acids" arginine and cysteine" and potassium nitrate on the growth and yield of the tomato plants grown in plastic houses. *Kufa Journal for Agricultural Sciences*, 7(2).
- Jin, J., Wang, G., Liu, X., Pan, X. y Herbert, S.J.** (2005). Phosphorus application affects the soybean root response to water deficit at the initial flowering and full pod stages. *Soil Science and Plant Nutrition*, 51(7), 953-960. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2005.tb00133.x>

- Jin, L., Cai, Y., Sun, C., Huang, Y. y Yu, T.** (2019). Exogenous l-glutamate treatment could induce resistance against *Penicillium expansum* in pear fruit by activating defense-related proteins and amino acids metabolism. *Postharvest Biology and Technology*, 150, 148-157. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.11.009>
- Jorkesh, A. y Hossein Aminifard, M.** (2019). Foliar application of asparagine and casein on biochemical and morphological attributes of garden cress (*Lepidium sativum* L.) plants under greenhouse conditions. *Advances in Horticultural Science*, 33(2), 227-233.
- Joshi, V., Joung, J.G., Fei, Z. y Jander, G.** (2010). Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. *Amino acids*, 39(4), 933-947. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0505-7>
- Kader, M.A. y Lindberg, S.** (2010). Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. *Plant signaling and behavior*, 5(3), 233-238. <https://doi.org/10.4161/psb.5.3.10740>
- Kahlaoui, B., Hachicha, M., Misle, E., Fidalgo, F. y Teixeira, J.** (2018). Physiological and biochemical responses to the exogenous application of proline of tomato plants irrigated with saline water. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(1), 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.12.002>
- Kang, J. y Turano, F.J.** (2003). The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) functions as a regulator of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(11), 6872-6877. <https://doi.org/10.1073/pnas.1030961100>
- Kaushal, N., Gupta, K., Bhandhari, K., Kumar, S., Thakur, P. y Nayyar, H.** (2011). Proline induces heat tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) plants by protecting vital enzymes of carbon and antioxidative metabolism. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17(3), 203-213. <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0078-2>
- Kavi Kishor, P.B., Hima Kumari, P., Sunita, M.S.L. y Sreenivasulu, N.** (2015). Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Frontiers in Plant Science*, 6, 544. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00544>
- Kaya, C., Aydemir, S., Sonmez, O., Ashraf, M. y Dikilitas, M.** (2013). Regulation of growth and some key physiological processes in salt-stressed maize (*Zea mays* L.) plants by exogenous application of asparagine and glycerol. *Acta Botanica Croatica*, 72(1), 157-168. <https://doi.org/10.2478/v10184-012-0012-x>

- Ke, Q., Ye, J., Wang, B., Ren, J., Yin, L., Deng, X. y Wang, S.** (2018). Melatonin mitigates salt stress in wheat seedlings by modulating polyamine metabolism. *Frontiers in plant science*, 9, 914. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00914>
- Kendziorak, M., Paszkowski, A. y Zagdańska, B.** (2012). Differential regulation of alanine aminotransferase homologues by abiotic stresses in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Plant cell reports*, 31(6), 1105-1117. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1231-2>
- Khan, W., Rayirath, U.P., Subramanian, S., Jithesh, M.N., Rayorath, P., Hodges, D.M. y col.** (2009). Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(4), 386-399. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9103-x>
- Khan, S., Yu, H., Li, Q., Gao, Y., Sallam, B.N., Wang, H. y col.** (2019). Exogenous application of amino acids improves the growth and yield of lettuce by enhancing photosynthetic assimilation and nutrient availability. *Agronomy*, 9(5), 266. <https://doi.org/10.3390/agronomy9050266>
- Knapp, S. y Peralta, I.E.** (2016). The tomato (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) and its botanical relatives. En: *The tomato genome*. Springer, Berlin, Heidelberg, 7-21. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-53389-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-662-53389-5_2)
- Koch, K.** (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current opinion in plant biology*, 7(3), 235-246. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.014>
- Lea, P.J. y Mifflin, B.J.** (2011). Nitrogen assimilation and its relevance to crop improvement. *Annual Plant Reviews*, 42, 1-40. <https://doi.org/10.1002/9781444328608.ch1>
- Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L. y Rentsch, D.** (2010). Proline metabolism and transport in plant development. *Amino acids*, 39(4), 949-962. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0525-3>
- Liao, Z., Hodén, K.P., Singh, R.K. y Dixelius, C.** (2020). Genome-wide identification of Argonautes in Solanaceae with emphasis on potato. *Scientific reports*, 10(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77593-y>
- Linnaeus, C.** (1753). Species Plantarum. En: *Laurentius Salvius*, Stockholm, 1–560 (1).
- Liu, X., Han, Q., Wang, J., Wang, X., Xu, J. y Shi, J.** (2016). Two FgLEU2 genes with different roles in leucine biosynthesis and infection-related morphogenesis in *Fusarium graminearum*. *PloS one*, 11(11), e0165927. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165927>

- Liu, Y., Li, Y., Bi, Y., Jiang, Q., Mao, R., Liu, Z. y col.** (2021). Induction of defense response against *Alternaria* rot in Zaosu pear fruit by exogenous L-lysine through regulating ROS metabolism and activating defense-related proteins. *Postharvest Biology and Technology*, 179, 111567. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111567>
- Ludmerszki, E.** (2011). The beneficial effects of S-methyl-methionine in maize in the case of Maize dwarf mosaic virus infection. *Acta Biologica Szegediensis*, 55(1), 109-112.
- Mansour, M.M.F. y Ali, E.F.** (2017). Evaluation of proline functions in saline conditions. *Phytochemistry*, 140, 52-68. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.04.016>
- Marco, J.A.** (2006). Terpenos. En: *Química de los productos naturales*. Síntesis, 172-233
- Matysiak, K., Kierzek, R., Siatkowski, I., Kowalska, J., Krawczyk, R. y Miziniak, W.** (2020). Effect of exogenous application of amino acids l-arginine and glycine on maize under temperature stress. *Agronomy*, 10(6), 769. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060769>
- Maxwell, B.B. y Kieber, J.J.** (2010). Cytokinin signal transduction. En: *Plant hormones*. Springer, Dordrecht., 329-357.
- Melomey, L.D., Danquah, A., Offei, S.K., Ofori, K., Danquah, E. y Osei, M.** (2019). Review on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) improvement programmes in Ghana. *Recent advances in tomato breeding and production*, 49. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.75843>
- Merwad, A.R.M., Desoky, E.S.M. y Rady, M.M.** (2018). Response of water deficit-stressed *Vigna unguiculata* performances to silicon, proline or methionine foliar application. *Scientia Horticulturae*, 228, 132-144. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.10.008>
- Meyer, S., Mumm, P., Imes, D., Endler, A., Weder, B., Al-Rasheid, K.A. y col.** (2010). AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant Journal*, 63(6), 1054-1062. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04302.x>
- Miller, A.J., Fan, X., Shen, Q. y Smith, S.J.** (2008). Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. *Journal of experimental botany*, 59(1), 111-119. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm208>



- Mohammadipour, N. y Souri, M.K.** (2019). Beneficial effects of glycine on growth and leaf nutrient concentrations of coriander (*Coriandrum sativum*) plants. *Journal of plant nutrition*, 42(14), 1637-1644. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1628985>
- Mohammadrezakhani, S., Hajilou, J., Rezanejad, F. y Zaare-Nahandi, F.** (2019). Assessment of exogenous application of proline on antioxidant compounds in three Citrus species under low temperature stress. *Journal of Plant Interactions*, 14(1), 347-358. <https://doi.org/10.1080/17429145.2019.1629033>
- Mona, H.M. y Talaat, I.M.** (2005). Physiological response of Rose Geranium (*Pelargonium gravealens* L.) to phenylalanine and nicotinic Acid. *Annals of Agricultural Science, Moshtohor*, 807-822.
- Mosa, W.F., Ali, H.M. y Abdelsalam, N.R.** (2021). The utilization of tryptophan and glycine amino acids as safe alternatives to chemical fertilizers in apple orchards. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(2), 1983-1991. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10658-7>
- Mozafari, H.** (2013). Calcium and L-histidine interaction on growth improvement of three tomato cultivars under nickel stress. *Acta Biologica Szegediensis*, 57(2), 131-144.
- Mustafa, A., Hussain, A., Naveed, M., Ditta, A., Nazli, Z.E.H. y Sattar, A.** (2016). Response of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) to soil and foliar applied L-tryptophan. *Soil and Environment*, 35(1).
- Mutale-Joan, C., Redouane, B., Najib, E., Yassine, K., Lyamlouli, K., Laila, S. y col.** (2020). Screening of microalgae liquid extracts for their bio stimulant properties on plant growth, nutrient uptake and metabolite profile of *Solanum lycopersicum* L. *Scientific Reports*, 10, 1. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-59840-4>
- Naika, S., de Jeude, J.V.L., de Goffau, M., Hilmi, M. y van Dam, B.** (2005). Cultivation of tomato. En: *Production, processing and marketing*, Agromisa/CTA. Revised edition.
- Nambara, E., Kawaide, H., Kamiya, Y. y Naito, S.** (1998). Characterization of an Arabidopsis thaliana mutant that has a defect in ABA accumulation: ABA-dependent and ABA-independent accumulation of free amino acids during dehydration. *Plant and cell physiology*, 39(8), 853-858. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029444>
- Negrão, S., Schmöckel, S.M. y Tester, M.** (2017). Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annals of botany*, 119(1), 1-11. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw191>

- Nelson, N.** (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of biological chemistry*, 153(2), 375-380.
- Noroozlo, Y.A., Souri, M.K. y Delshad, M.** (2019). Stimulation effects of foliar applied glycine and glutamine amino acids on lettuce growth. *Open Agriculture*, 4(1), 164-172. <https://doi.org/10.1515/opag-2019-0016>
- Núñez-Vázquez, M., Pérez-Hernández, M.D.C. y Betancourt-Grandal, M.** (2017). Estrés hídrico y salino en cítricos. Estrategias para la reducción de daños. *Cultivos tropicales*, 38(4), 65-74.
- Osuji, G.O. y Madu, W.C.** (2012). Using the RNA synthetic activity of glutamate dehydrogenase to illuminate the natural role of the enzyme. *Advances in Biological Chemistry*, 2, 379-389. <https://doi.org/10.4236/abc.2012.24047>
- Padgett, P. E. y Leonard, R.T.** (1996). Free amino acid levels and the regulation of nitrate uptake in maize cell suspension cultures. *Journal of Experimental Botany*, 47(7), 871-883. <https://doi.org/10.1093/jxb/47.7.871>
- Paradičković, N., Teklić, T., Zeljković, S., Lisjak, M. y Špoljarević, M.** (2019). Biostimulants research in some horticultural plant species—A review. *Food and Energy Security*, 8(2), e00162. <https://doi.org/10.1002/fes3.162>
- Parry, M.L.** (2019) Climate change and world agriculture. En: *Routledge. Earthscan*, London, UK,
- Parsons, T.R. y Strickland, J.D.H.** (1963). Discussion of spectrophotometric determination of Marine-plant Pigments, with Revised Equations for Ascertaining Chlorophylls and Carotenoids. *Journal of Marine Research*, 21, 155-163.
- Pervaiz, A., Iqbal, A., Khalid, A., Manzoor, A., Noreen, S., Ayaz, A. y col.** (2019). Proline induced modulation in physiological responses in wheat plants. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, 8, 112-119. <https://doi.org/10.15640/jaes.v8n1a11>
- Portu, J., González-Arenzana, L., Hermosín-Gutiérrez, I., Santamaría, P. y Garde-Cerdán, T.** (2015). Phenylalanine and urea foliar applications to grapevine: Effect on wine phenolic content. *Food Chemistry*, 180, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.008>
- Price, M.B., Jelesko, J. y Okumoto, S.** (2012). Glutamate receptor homologs in plants: functions and evolutionary origins. *Frontiers in Plant Science*, 3, 235. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00235>
- Rajagopal, V.** (1981). The influence of exogenous proline on the stomatal resistance in *Vicia faba*. *Physiologia Plantarum*, 52(2), 292-296. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1981.tb08508.x>

- Ramakrishna A. y Atanu B.** (2020) Glutamate: Physiological Roles and Its Signaling in Plants. En: *Neurotransmitters in Plant Signaling and Communication. Signaling and Communication in Plants*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-54478-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-54478-2_13)
- Rao, S.R., Qayyum, A., Razzaq, A., Ahmad, M., Mahmood, I. y Sher, A.** (2012). Role of foliar application of salicylic acid and L-tryptophan in drought tolerance of maize. *Journal of Animal and Plant Science*, 22(3), 768-772.
- Raposo, R., Gomez, V., Urrutia, T. y Melgarejo, P.** (2001). Survival of Botrytis cinerea in southeastern Spanish greenhouses. *European Journal of Plant Pathology*, 107(2), 229-236. <https://doi.org/10.1023/A:1011250200724>
- Rashad, M., Jaime, A. y da Silva, T.** (2014). Foliar treatment with proline and tyrosine affect the growth and yield of beetroot and some pigments in beetroot leaves. *Journal of Horticultural Research*, 21, 95-99.
- Rausser, W.E.** (1995). Phytochelatin and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant physiology*, 109(4), 1141. <https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1141>
- Refaat, A. M. y Naguib, N.Y.** (1998). Peppermint yield and oil quality as affected by application of some amino acids. *Bulletin-faculty of agriculture university of cairo*, 49, 89-98.
- Reglamento (UE) 2019/1009** del Parlamento Europeo y del Consejo de 5 de Junio de 2020. Disponible online: <https://www.boe.es/doue/2019/170/L00001-00114.pdf>
- Reham, M.S., Khattab, M.E., Ahmed, S.S. y Kandil, M.A.M.** (2016). Influence of foliar spray with phenylalanine and nickel on growth, yield quality and chemical composition of genoveser basil plant. *African Journal of Agricultural Research*, 11(16), 1398-1410. <https://doi.org/10.5897/AJAR2015.10699>
- Rizwan, M., Ali, S., Akbar, M.Z., Shakoor, M.B., Mahmood, A., Ishaque, W. y Hussain, A.** (2017a). Foliar application of aspartic acid lowers cadmium uptake and Cd-induced oxidative stress in rice under Cd stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(27), 21938-21947. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9860-1>
- Rizwan, M., Ali, S., Hussain, A., Ali, Q., Shakoor, M.B., Zia-ur-Rehman, M. y col.** (2017b). Effect of zinc-lysine on growth, yield and cadmium uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.) and health risk assessment. *Chemosphere*, 187, 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.071>

- Román, S.M.S., Garde-Cerdán, T., Baroja, E., Rubio-Bretón, P. y Pérez-Álvarez, E.P.** (2020). Foliar application of phenylalanine plus methyl jasmonate as a tool to improve Grenache grape aromatic composition. *Scientia Horticulturae*, 272, 109515. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109515>
- Ros, R., Muñoz-Bertomeu, J. y Krueger, S.** (2014). Serine in plants: biosynthesis, metabolism, and functions. *Trends in plant science*, 19(9), 564-569. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.06.003>
- Rossini, L., Jepson, I., Greenland, A.J. y Gorla, M.S.** (1996). Characterization of glutathione S-transferase isoforms in three maize inbred lines exhibiting differential sensitivity to alachlor. *Plant physiology*, 112(4), 1595-1600. <https://doi.org/10.1104/pp.112.4.1595>
- Rouphael, Y. y Colla, G.** (2020). Biostimulants in agriculture. *Frontiers in plant science*, 11, 40. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00040>
- Rouphael, Y., Corrado, G., Colla, G., De Pascale, S., Dell'Aversana, E., D'Amelia, L.I. y col.** (2021). Biostimulation as a Means for Optimizing Fruit Phytochemical Content and Functional Quality of Tomato Landraces of the San Marzano Area. *Foods*, 10(5), 926. <https://doi.org/10.3390/foods10050925>
- Sadak, M.S.H, Abdelhamid, M.T. y Schmidhalter, U.** (2015). Effect of foliar application of aminoacids on plant yield and some physiological parameters in bean plants irrigated with seawater. *Acta Biológica Colombiana*, 20(1), 141-152. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n1.42865>
- Sadak, M.S., Abd El-Hameid, A.R., Zaki, F.S., Dawood, M.G. y El-Awadi, M.E.** (2020). Physiological and biochemical responses of soybean (*Glycine max L.*) to cysteine application under sea salt stress. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0259-7>
- Sainju, U.M., Dris, R. y Singh, B.** (2003). Mineral nutrition of tomato. *Food, Agriculture and Environment*, 1(2), 176-183.
- Sajid, M., Ullah, I., Rab, A., Shah, S.T., Basit, A., Bibi, F. y Ahmad, M.** (2020). 2. Foliar application of calcium improves growth, yield and quality of tomato cultivars. *Pure and Applied Biology (PAB)*, 9(1), 10-19. <http://dx.doi.org/10.19045/bspab.2020.90002>
- Sakya, A.T.** (2019). Foliar iron application on growth and yield of tomato. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 250 (1), 012001. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/250/1/012001>

- Salman, F.A., Mutar, K.A. y Alewi, Z.H.** (2019). Influence of foliar application of arginine and phenylalanine on growth and essential oil content in dill (*Anethum graveolens* L.) cultivars. *Research on Crops*, 20(4), 826-830. <https://doi.org/10.31830/2348-7542.2019.122>
- Samani, M.R., Pirbalouti, A.G., Moattar, F. y Golparvar, A.R.** (2019). L-Phenylalanine and bio-fertilizers interaction effects on growth, yield and chemical compositions and content of essential oil from the sage (*Salvia officinalis* L.) leaves. *Industrial Crops and Products*, 137, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.019>
- Samuels, J.** (2015). Biodiversity of food species of the Solanaceae family: a preliminary taxonomic inventory of subfamily Solanoideae. *Resources*, 4(2), 277-322. <https://doi.org/10.3390/resources4020277>
- Santi, C., Molesini, B., Guzzo, F., Pii, Y., Vitulo, N. y Pandolfini, T.** (2017). Genome-wide transcriptional changes and lipid profile modifications induced by *Medicago truncatula* N5 overexpression at an early stage of the symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Genes*, 8(12), 396. <https://doi.org/10.3390/genes8120396>
- Schenck, C.A. y Maeda, H.A.** (2018). Tyrosine biosynthesis, metabolism, and catabolism in plants. *Phytochemistry*, 149, 82-102. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.02.003>
- Seo, S., Nakaho, K., Hong, S.W., Takahashi, H., Shigemori, H. y Mitsuhashi, I.** (2016). L-Histidine induces resistance in plants to the bacterial pathogen *Ralstonia solanacearum* partially through the activation of ethylene signaling. *Plant and Cell Physiology*, 57(9), 1932-1942. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw114>
- Shaddad, M.A.** (1990). The effect of proline application on the physiology of *Raphanus sativus* plants grown under salinity stress. *Biologia plantarum*, 32(2), 104-112. <https://doi.org/10.1007/BF02897548>
- Shahid, M.A., Balal, R.M., Pervez, M.A., Abbas, T., Aqeel, M.A., Javaid, M.M., y Garcia-Sanchez, F.** (2014). Exogenous proline and proline-enriched *Lolium perenne* leaf extract protects against phytotoxic effects of nickel and salinity in *Pisum sativum* by altering polyamine metabolism in leaves. *Turkish Journal of Botany*, 38(5), 914-926.
- Shekari, G. y Javanmardi, J.** (2017). Application of cysteine, methionine and amino acid containing fertilizers to replace urea: The effects on yield and quality of Broccoli. *Advances in Crop Science and Technology*, 5, 283.

- Siddique, A. B., Islam, M.R., Hoque, M.A., Hasan, M.M., Rahman, M.T. y Uddin, M.M.** (2015). Mitigation of salt stress by foliar application of proline in rice. *Universal Journal of Agricultural Research*, 3(3), 81-88. <https://doi.org/10.13189/ujar.2015.030303>
- Siddiqui, M.H., Alamri, S., Alsubaie, Q.D., Ali, H.M., Khan, M.N., Al-Ghamdi, A. y col.** (2020). Exogenous nitric oxide alleviates sulfur deficiency-induced oxidative damage in tomato seedlings. *Nitric Oxide*, 94, 95-107. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.11.002>
- Sidiq, K.R., Chow, M.W., Zhao, Z. y Daniel, R.A.** (2021). Alanine metabolism in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 115(4), 739-757. <https://doi.org/10.1111/mmi.14640>
- Singh, D.P., Bahadur, A., Sarma, B.K., Maurya, S., Singh, H.B. y Singh, U.P.** (2010). Exogenous application of L-phenylalanine and ferulic acid enhance phenylalanine ammonia lyase activity and accumulation of phenolic acids in pea (*Pisum sativum*) to offer protection against *Erysiphe pisi*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(15), 1454-1462. <https://doi.org/10.1080/03235400802536881>
- Singleton, V.L., Orthofer, R. y Lamuela-Raventós, R.M.** (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Smirnoff, N. y Pallanca, J.E.** (1996). Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 24(2), 472-478. <https://doi.org/10.1042/bst0240472>
- Soad, M.M. y Lobna, S.T.** (2016). Assimilation of *Ficus microcarpa* "Hawaii"(v) plant growth and chemical constituents to peptone and tryptophan foliar application. 9(10), 201-206.
- Somogyi, M.** (1952). Notes on sugar determination. *Journal of biological chemistry*, 195(1), 19-23.
- Sosa-Baldivia, A., Ruiz-Ibarra, G., Johnson, F., Robles-de la Torre, R.R., Robles-Lopez, M. R., Sharma, M., y col.** (2018). A historical review of the scientific and common nomenclature associated with chia: from *Salvia hispanica* to *Salvia mexicana* and Chian to Salba. *Agricultural Science and Technology*, 18(1), 556047. <https://doi.org/10.19080/artoaj.2018.18.556047>
- Srivastava, A. y Handa, A.K.** (2005). Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective. *Journal of plant growth regulation*, 24(2), 67-82. <https://doi.org/10.1007/s00344-005-0015-0>



- Stepansky, A. y Leustek, T.** (2006). Histidine biosynthesis in plants. *Amino acids*, 30(2), 127-142. <https://doi.org/10.1007/s00726-005-0247-0>
- Syvvertsen, J.P. y García-Sánchez, F.** (2014). Multiple abiotic stresses occurring with salinity stress in citrus. *Environmental and Experimental Botany*, 103, 128-137. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.015>
- Tang, W., Jiang, H., Zheng, Q., Chen, X., Wang, R., Yang, S. y col.** (2019). Isopropylmalate isomerase MoLeuI orchestrates leucine biosynthesis, fungal development, and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(1), 327-337. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9456-9>
- Tapia, J., Murray, J., Ormachea, M., Tirado, N. y Nordstrom, D.K.** (2019). Origin, distribution, and geochemistry of arsenic in the Altiplano-Puna plateau of Argentina, Bolivia, Chile, and Perú. *Science of The Total Environment*, 678, 309-325. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.084>
- Taylor I.B.** (1986) Biosystematics of the tomato. En: Atherton J.G., Rudich J. (eds) *The Tomato Crop. The Tomato Crop (A scientific basis for improvement)*. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-3137-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-009-3137-4_1)
- Teixeira, W.F., Fagan, E.B., Soares, L.H., Umburanas, R.C., Reichardt, K. y Neto, D.D.** (2017). Foliar and seed application of amino acids affects the antioxidant metabolism of the soybean crop. *Frontiers in plant science*, 8, 327. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00327>
- Teixeira, W.F., Fagan, E B., Soares, L.H., Soares, J.N., Reichardt, K. y Neto, D.D.** (2018). Seed and foliar application of amino acids improve variables of nitrogen metabolism and productivity in soybean crop. *Frontiers in Plant Science*, 9, 396. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00396>
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R. y Polasky, S.** (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418, 671. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121656>
- Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R. y Fernie, A.R.** (2013). Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Frontiers in plant science*, 4, 62. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00062>
- Tonhati, R., Mello, S.C., Momesso, P. y Pedroso, R.M.** (2020). L-proline alleviates heat stress of tomato plants grown under protected environment. *Scientia Horticulturae*, 268, 109370. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109370>



- Valera, D.L., Belmonte, L.J., Molina-Aiz, F.D., López, A. y Camacho, F.** (2015). The greenhouses of Almería, Spain: Technological analysis and profitability. En *International Symposium on New Technologies and Management for Greenhouses-GreenSys*, 1170: 219-226. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1170.25>
- Van der Sar, S., Kim, H.K., Meissner, A., Verpoorte, R. y Choi, Y.H.** (2013). Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy for plant metabolite profiling. En: *The Handbook of Plant Metabolomics*. W. Weckwerth and G. Kahl, 57–76. <https://doi.org/10.1002/9783527669882.ch3>
- Vincill, E.D., Bieck, A.M. y Spalding, E.P.** (2012). Ca<sup>2+</sup> conduction by an amino acid-gated ion channel related to glutamate receptors. *Plant physiology*, 159(1), 40-46. <https://doi.org/10.1104/pp.112.197509>
- Vinh, T.D., Yoshida, Y., Ooyama, M., Goto, T., Yasuba, K.I. y Tanaka, Y.** (2018). Comparative analysis on blossom-end rot incidence in two tomato cultivars in relation to calcium nutrition and fruit growth. *The Horticulture Journal*, 87(1), 97-105. <https://doi.org/10.2503/hortj.OKD-114>
- Walch-Liu, P., Liu, L.H., Remans, T., Tester, M. y Forde, B.G.** (2006). Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 47(8), 1045-1057. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcj075>
- Wang, X., Zhang, H. y Quinn, P.J.** (2018). Production of L-valine from metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(10), 4319-4330. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8952-2>
- Wang, T., Liu, Q., Wang, N., Dai, J., Lu, Q., Jia, X. y col.** (2021). Foliar arginine application improves tomato plant growth, yield, and fruit quality via nitrogen accumulation. *Plant Growth Regulation*, 95(3), 421-428. <https://doi.org/10.1007/s10725-021-00752-2>
- Wani, A.S., Ahmad, A., Hayat, S. y Tahir, I.** (2016). Is foliar spray of proline sufficient for mitigation of salt stress in *Brassica juncea* cultivars? *Environmental Science and Pollution Research*, 23(13), 13413-13423. <https://doi.org/10.4238/gmr.15018299>
- Watanabe, T., Maejima, E., Yoshimura, T., Urayama, M., Yamauchi, A., Owadano, M. y col.** (2016). The ionomic study of vegetable crops. *PLoS one*, 11(8), e0160273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160273>
- Weiland, M., Mancuso, S. y Baluska, F.** (2015). Signalling via glutamate and GLRs in *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology*, 43(1), 1-25. <https://doi.org/10.1071/FP15109>

- Wilkinson, S., Kudoyarova, G.R., Veselov, D.S., Arkhipova, T.N., y Davies, W.J.** (2012). Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management. *Journal of experimental botany*, 63(9), 3499-3509. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers148>
- Winter, G., Todd, C.D., Trovato, M., Forlani, G. y Funck, D.** (2015). Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Frontiers in plant science*, 6, 534. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00534>
- Xiaochuang, C., Chu, Z., Lianfeng, Z., Junhua, Z., Hussain, S., Lianghuan, W. y Qianyu, J.** (2017). Glycine increases cold tolerance in rice via the regulation of Nuptake, physiological characteristics, and photosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 112, 251-260. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.01.008>
- Yakhin, O.I., Lubyaynov, A.A., Yakhin, I.A. y Brown, P.H.** (2017). Biostimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in plant science*, 7, 2049. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>
- Yang, N., Wang, C.L., He, W.P., Qu, Y.Z. y Li, Y.S.** (2016). Photosynthetic characteristics and effects of exogenous glycine of *Chorispora bungeana* under drought stress. *Photosynthetica*, 54(3), 459-467. <https://doi.org/10.1007/s11099-016-0187-9>
- Yang, X., Cui, X., Zhao, L., Guo, D., Feng, L., Wei, S. y col.** (2017). Exogenous glycine nitrogen enhances accumulation of glycosylated flavonoids and antioxidant activity in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Frontiers in plant science*, 8, 2098. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02098>
- Yang, X., Feng, L., Zhao, L., Liu, X., Hassani, D. y Huang, D.** (2018). Effect of glycine nitrogen on lettuce growth under soilless culture: a metabolomics approach to identify the main changes occurred in plant primary and secondary metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(2), 467-477. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8482>
- Yaqoob, H., Akram, N.A., Iftikhar, S., Ashraf, M., Khalid, N., Sadiq, M. y col.** (2019). Seed pretreatment and foliar application of proline regulate morphological, physio-biochemical processes and activity of antioxidant enzymes in plants of two cultivars of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Plants*, 8(12), 588. <https://doi.org/10.3390/plants8120588>
- Yariyama, S., Ando, S., Seo, S., Nakaho, K., Miyashita, S., Kanayama, Y. y Takahashi, H.** (2019). Exogenous application of l-histidine suppresses bacterial diseases and enhances ethylene production in rice seedlings. *Plant Pathology*, 68(6), 1072-1078. <https://doi.org/10.1111/ppa.13037>

- Yoo, H., Widhalm, J.R., Qian, Y., Maeda, H., Cooper, B.R., Jannasch, A.S. y col.** (2013). An alternative pathway contributes to phenylalanine biosynthesis in plants via a cytosolic tyrosine: phenylpyruvate aminotransferase. *Nature communications*, 4(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/ncomms3833>
- Zaheer, I.E., Ali, S., Saleem, M.H., Arslan Ashraf, M., Ali, Q., Abbas, Z. y col.** (2020). Zinc-lysine supplementation mitigates oxidative stress in rapeseed (*Brassica napus* L.) by preventing phytotoxicity of chromium, when irrigated with tannery wastewater. *Plants*, 9(9), 1145. <https://doi.org/10.3390/plants9091145>
- Zeid, I.M.** (2009). Effect of arginine and urea on polyamines content and growth of bean under salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(1), 65. <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0201-3>
- Zemanová, V., Pavlík, M., Pavlíková, D. y Tlustoš, P.** (2014). The significance of methionine, histidine and tryptophan in plant responses and adaptation to cadmium stress. *Plant, Soil and Environment*, 60(9), 426-432. <https://doi.org/10.17221/544/2014-PSE>
- Zhang, C. y Huang, Z.** (2013). Effects of endogenous abscisic acid, jasmonic acid, polyamines, and polyamine oxidase activity in tomato seedlings under drought stress. *Scientia Horticulturae*, 159, 172-177. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.013>
- Zhang, H., Li, Y., Meg, Y.L., Cao, N., Li, D.S., Zhou, Z.G. y col.** (2019). The effects of soil moisture and salinity as functions of groundwater depth on wheat growth and yield in coastal saline soils. *Journal of Integrative Agriculture*, 18: 2472-2482. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62713-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62713-9)
- Zhang, Y.H., Wang, C.R., Liu, Y.M., Liu, Y.P., Liu, Z.Q., Zhang, C.B. y Huang, Y.C.** (2021). Foliar Application of L-Cysteine: Effects on the Concentration of Cd and Mineral Elements in Rice. *Huan Jing ke Xue= Huanjing Kexue*, 42(8), 4045-4052. <https://doi.org/10.13227/j.hj.kx.202101092>
- Zheng, Y., Sheng, J., Zhao, R., Zhang, J., Lv, S., Liu, L. y Shen, L.** (2011). Preharvest L-arginine treatment induced postharvest disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(12), 6543-6549. <https://doi.org/10.1021/jf2000053>
- Zhong, M., Yuan, Y., Shu, S., Sun, J., Guo, S., Yuan, R. y Tang, Y.** (2016). Effects of exogenous putrescine on glycolysis and Krebs cycle metabolism in cucumber leaves subjected to salt stress. *Plant Growth Regulation*, 79(3), 319-330. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0136-9>
- Zhu, J.K.** (2001). Plant salt tolerance. *Trends in plant science*, 6(2), 66-71. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01838-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01838-0)