



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

EFFECTO DEL ESTRÉS SALINO (NaCl) SOBRE EL METABOLISMO DE LA PROLINA (Pro) Y EL PAPEL DE ESTE aa SUPLEMENTADO DE MANERA EXÓGENA EN PLANTAS DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)

Tesis que presenta

Camilo Andres Escalante Magaña

En opción al título de

DOCTORADO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México
2020

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Camilo Andres Escalante Magaña** titulado “**Efecto del estrés salino (NaCl) sobre el metabolismo de la Prolina (Pro) y el papel de este aminoácido suplementado de manera exógena en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)**” fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de plantas, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del **Dr. Manuel Martínez Estévez**, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 14 de Enero de 2020

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

Nombre: M. en C. Camilo Andres Escalante Magaña

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y forma parte del proyecto titulado **Clonación y caracterización funcional de un transportador de potasio de alta afinidad de chile habanero (*C. chinense* Jacq.)**, bajo la dirección del Dr. Manuel Martínez Estévez.

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de este trabajo de tesis no lo puedo describir como algo que ha sido fácil, durante toda la realización de este proyecto de tesis disfrute cada momento con los compañeros de laboratorio, discusión de artículos científicos, intercambio de ideas con los compañeros del laboratorio y unidad, es difícil describir cada momento vivido a lo largo de estos cinco años, por eso agradezco a cada persona que participo en la realización de este estudio, con críticas que ayudaron a tener una mejor realización de este trabajo.

Primero doy gracias a dios por la vida, la salud y bienestar, por permitirme tener la familia tan especial donde me he formado.

Agradezco a mi familia, en especial a mis padres, Camilo y Socorro, por su apoyo incondicional, esfuerzo, dedicación, sus consejos y sobre todo doy gracias a su sacrificio y amor incansable que me han dado, les doy las gracias por educarme con buenos principios, por enseñarme los buenos valores, por enseñarme a valorar a las personas que me rodean a lo largo de esta vida, agradezco por estar a mi lado en los momentos difíciles y de felicidad. A mis hermanos, Jesús y Adán, por estar conmigo cuando los necesite. Familia, gracias por todo su amor y por todos esos buenos momentos que hemos pasado y que no cambiaría por nada del mundo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No. 242989, otorgada para poder realizar mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. por la formación académica otorgada y a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas por el uso de sus instalaciones para la realización de este trabajo.

A mi asesor el Dr. Manuel Martínez Estévez por permitirme estar en su grupo de trabajo, por su dedicación, consejos, amistad y sobre todo ser una excelente persona. Por sus conocimientos enseñados durante todos estos años. Le doy gracias por guiarme en la realización de este estudio ya que sin usted no hubiera sido posible. Le agradezco ser un padre adoptivo ya que sin sus consejos y sin su experiencia durante todos estos años, mi formación académica no hubiera sido la misma, le agradezco infinitamente por las pláticas

y por demostrarme su aprecio, siempre estaré agradecido de formar parte de su grupo de trabajo.

Gracias a la Dra. Ileana Echevarría Machado por su dedicación, paciencia al guiarme en las estrategias experimentales, así como por los buenos consejos para la mejora de este proyecto, le agradezco por todos aquellos consejos que me dio en los seminarios y por brindarme parte de su tiempo para ayudarme durante la realización de este trabajo, fue parte fundamental en mi formación.

A mi comité tutorial, a la Dra. Georgina Estrada Tapia y al Dr. Igor Pottosin, por todos conocimientos, propuestas y consejos brindados, así como sus críticas que ayudaron a una mejor realización del trabajo de doctorado, gracias.

Al Dr. Isaac Zepeda Jazo por permitirme realizar uso de todo su laboratorio de Genómica alimentaria de la Universidad de la Ciénega, por sus consejos e instrucciones para la utilización del MIFE, agradezco toda la ayuda prestada para la estancia, por ser una excelente persona, tan servicial, sin su ayuda no hubieran sido los mismos resultados.

Gracias a mi comité revisor de tesis, así como al comité pre doctoral, la Dra. Georgina Estrada Tapia, a la Dra. Ileana Echevarría Machado, el Dr. Igor Pottosin, Dr. Isaac Zepeda, Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata, Dra. Nancy Santana Buzzy y Dr. Felipe Vázquez Flota, por su tiempo dedicado a la revisión y corrección de la tesis.

A la M.C. Fátima Medina Lara, por compartir sus conocimientos, metodologías y consejos para la realización de esta tesis, gracias por su amistad.

Doy las gracias también al Dr. José Luis Andrade Torres y al técnico Robert Us Santamaría por permitirme utilizar el laboratorio de fisiología de la unidad de Recursos naturales para la medición y utilización de sus equipos de fisiología, muchas gracias

A la Dra. Georgina Estrada Tapia por donarme las cepas para la parte de clonación y secuenciación de este trabajo al igual que ser una excelente persona por los consejos para la mejora continua de este proyecto

A todos mis amigos que han formado parte del laboratorio 07, Emanuel, Enid, Nancy, Luis Fernando, Luis Garnica, Ricardo, Gladys, Neto, Ángel, Teresita, Any, Helberth, Manuel,

Fabiola, Fede, Alix, Jafet, Arnoldo, Eduardo, don Ramón y Ángel, gracias por todos los momentos agradables que pasamos en el laboratorio.

A todos mis amigos, que han formado parte de mi vida y han estado en todo momento, gracias por darme su amistad.

A mi esposa Marta, quien ha estado en todo momento conmigo, a la que ha sido mi mejor amiga, mi compañera de vida, mi cómplice en todo momento y quien ha estado cuando más lo he necesitado, gracias por ensayar conmigo a altas horas de la noche mis presentaciones para los tutorales y seminarios de grupo, le agradezco a Dios por cruzarla en mi camino, porque eres gran parte fundamental de mi vida.

DEDICATORIAS

Esta tesis se la dedico a toda mi familia, a mis padres, hermanos, sobrinos, cuñados y a mi compañera de vida y apoyo Marta. La realización de esta tesis no fue sencilla, pero a todas estas personas les doy gracias por ser un apoyo para continuar y terminar este trabajo. El camino no fue sencillo, pero termino contento con toda la experiencia adquirida, les agradezco y hago presente mi cariño hacia ustedes, gracias familia.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES GENERALES.....	3
1.1.1 ESTRÉS SALINO EN PLANTAS.....	4
1.1.2 ABSORCIÓN Y TRANSPORTE DE Na^+ EN PLANTAS	6
1.1.3 PRINCIPALES EFECTOS DE LA SALINIDAD	10
1.1.3.1 ESTRÉS OSMÓTICO	11
1.1.3.2 ESTRÉS IÓNICO.....	13
1.1.3.3 ESTRÉS OXIDATIVO	14
1.1.4 MECANISMOS DE TOLERANCIA.....	15
1.2 POTASIO (K^+).....	21
1.2.1 IMPORTANCIA Y FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL K^+	21
1.2.2 SÍNTOMAS DE DEFICIENCIA DE K^+	24
1.2.3 RETENCIÓN DE K^+ COMO PARÁMETRO DE TOLERANCIA	25
1.2.4 MANTENIMIENTO DE LA RELACIÓN K^+/Na^+ CITOSÓLICA COMO MECANISMO CLAVE PARA LA TOLERANCIA A LA SALINIDAD.....	25
1.3 CHILE HABANERO COMO MODELO DE ESTUDIO.....	26
1.3.1 IMPORTANCIA Y ORIGEN	26
1.3.2 ESTUDIOS EMPLEANDO CHILE HABANERO	27

1.3.3 LA SALINIDAD Y EL GÉNERO <i>CAPSICUM</i>	28
1.3.4 SALINIDAD Y CHILE HABANERO	30
HIPOTESIS	31
OBJETIVO GENERAL	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	32
CAPÍTULO II	33
CARACTERIZACIÓN DE LA TOLERANCIA Y SENSIBILIDAD ENTRE VARIEDADES DE CHILE HABANERO (<i>CAPSICUM CHINENSE</i> JACQ.) SOMETIDAS A UN ESTRÉS SALINO	33
2.1 INTRODUCCIÓN	33
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	34
2.2.1 MATERIAL VEGETAL.....	34
2.2.2 GERMINACIÓN Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....	34
2.2.3 SELECCIÓN DE LAS VARIEDADES SENSIBLES Y TOLERANTES A UN ESTRÉS POR NaCl ..	35
2.2.4 MEDICIÓN DE LA BIOMASA Y PARÁMETROS DE CRECIMIENTO	37
2.2.5 POTENCIAL OSMÓTICO (Ψ_s).....	38
2.2.6 CUANTIFICACIÓN DE SODIO Y POTASIO	38
2.2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
2.3 RESULTADOS	39
2.3.1 TOLERANCIA Y SENSIBILIDAD AL NaCl ENTRE CUATRO VARIEDADES DE CHILE HABANERO	39

2.3.2 BIOMASA.....	41
2.3.3 ÁREA FOLIAR Y RADICULAR.....	42
2.3.4 ALTURA DE LAS PLANTAS	44
2.3.5 NUMERO DE HOJAS.....	44
2.3.6 POTENCIAL OSMÓTICO U OSMOLARIDAD EN RAÍCES Y HOJAS.....	45
2.3.7 CONTENIDO DE K ⁺ Y NA ⁺	47
2.3.7.1 POTASIO	47
2.3.7.2 SODIO	48
2.4 DISCUSION	50
CAPÍTULO III	52
EFFECTO DEL ESTRÉS POR NaCl SOBRE EL METABOLISMO DE LA PROLINA EN DOS VARIETADES DE CHILE HABANERO	52
3.1 INTRODUCCIÓN	52
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
3.2.1 MATERIAL VEGETAL.....	54
3.2.2 GERMINACIÓN Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....	54
3.2.3 OBTENCIÓN Y CLONACIÓN DE LOS GENES <i>P5CS</i> , <i>P5CR</i> Y <i>PDH</i> (METABOLISMO DE LA PROLINA)	54
3.2.4 EVALUACIÓN DE LAS VARIETADES CONTRASTANTES A TIEMPOS CORTOS (0, 24, 36 Y 72HRS) Y A TIEMPOS LARGOS (SIETE DÍAS) EN PRESENCIA DE NaCl	57
3.2.5 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL Y SÍNTESIS DE ADNC	58

3.2.6 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE <i>CcP5CS</i> , <i>CcP5CR</i> Y <i>CcPDH</i> EN LAS DOS VARIETADES CONTRASTANTES AL ESTRÉS POR NaCl.....	59
3.2.7 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PRO EN RAÍCES Y HOJAS.....	60
3.2.8 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.....	61
3.2.9 ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS DEL METABOLISMO DE PRO.....	62
3.2.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	62
3.3 RESULTADOS.....	63
3.3.1 ESTABLECIMIENTO DE LOS TRATAMIENTOS EN CONDICIONES DE HIDROPONÍA.....	63
3.3.2 EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS CEBADORES SINTETIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE <i>CcP5CS</i> , <i>CcP5CR</i> Y <i>CcPDH</i>	63
3.3.2.1 ESPECIFICIDAD DE LOS CEBADORES DISEÑADOS PARA <i>CcP5CS</i>	63
3.3.2.2 ESPECIFICIDAD DE LOS CEBADORES DISEÑADOS PARA <i>CcP5CR</i>	64
3.3.2.3 ESPECIFICIDAD DE LOS CEBADORES DISEÑADOS PARA <i>CcPDH</i>	64
3.3.3 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DEDUCIDAS DE AMINOÁCIDOS DE P5CS, P5CR Y PDH DE <i>CAPSICUM CHINENSE</i> JACQ.....	65
3.3.4 PERFIL DE EXPRESIÓN DE TRANSCRITOS DE <i>CcP5CS</i> , <i>CcP5CR</i> Y <i>CcPDH</i> EN LA RAÍZ DE CHILE HABANERO.....	71
3.3.5 PERFIL DE EXPRESIÓN DE TRANSCRITOS DE <i>CcP5CS</i> , <i>CcP5CR</i> Y <i>CcPDH</i> EN LAS HOJAS DE CHILE HABANERO.....	72
3.3.6 EFECTO DEL ESTRÉS POR NaCl SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DE PROLINA EN AMBAS VARIETADES DE <i>CAPSICUM CHINENSE</i>	74
3.3.7 EFECTO DEL ESTRÉS POR NaCl SOBRE LA ACUMULACIÓN DE PRO EN LAS RAÍCES Y HOJAS DE AMBAS VARIETADES DE <i>CAPSICUM CHINENSE</i>	76

3.4 DISCUSION	78
CAPÍTULO IV	81
EFFECTO DE LA ADICIÓN DE PRO EXÓGENA SOBRE EL FLUJO DE K⁺ Y H⁺ EN LAS RAICES DE DOS DIFERENTES VARIEDADES DE CHILE HABANERO SOMETIDAS A ESTRÉS SALINO	81
4.1 INTRODUCCIÓN	81
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	83
4.2.1 MATERIAL VEGETAL	83
4.2.2 GERMINACIÓN Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	83
4.2.3 MEDICIÓN DE FLUJO IÓNICO EN RAÍCES POR LA TÉCNICA DE MIFE	84
4.2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	85
4.3 RESULTADOS	85
4.3.1 EFECTO DEL NaCl SOBRE EL FLUJO DE IONES DE K⁺ EN RAÍCES DE CHILE HABANERO .	85
4.3.2 EFECTO DEL NaCl SOBRE EL FLUJO DE IONES DE H⁺ EN RAÍCES DE CHILE HABANERO .	87
4.4 DISCUSION	89
CAPÍTULO V	91
ANALISIS REFLEXIVO SOBRE EL PAPEL DE LA PROLINA EN DIFERENTES TIPOS DE ESTRÉS ABIOTICOS: SALINIDAD Y SEQUIA	91
5.1 INTRODUCCIÓN	91
5.2 ANALISIS SOBRE EL PAPEL DE LA PRO EN LA SALINIDAD Y SEQUIA.....	93
CAPÍTULO VI.....	98

DISCUSIÓN GENERAL.....	98
CAPÍTULO VII.....	105
CONCLUSIONES GENERALES.....	105
PERSPECTIVAS.....	106
BIBLIOGRAFIA.....	108
ANEXO.....	140

LISTADO DE FIGURAS

Figura. 1.1 Diagrama de los probables candidatos que participan en la toma o flujo de entrada de Na ⁺ en las células de la raíz de la planta.....	9
Figura. 1.2 Principales efectos del estrés salino.....	11
Figura. 1.3 Principales vías en el metabolismo de la prolina	18
Figura. 1.4 Principales sistemas de transporte de Na ⁺ involucrados en la tolerancia a la salinidad.	21
Figura 1.5 Principales funciones del K ⁺	23
Figura 2.1 Diseño del experimento para el objetivo uno.....	36
Figura 2.2 Características morfológicas entre variedades de chile habanero	37
Figura 2.3 Diferencias morfológicas y sensibilidad a un estrés por NaCl (150 mM) en las diferentes variedades de chile habanero después de un periodo de recuperación (siete días), plántulas de 45 días de edad incubadas en solución H1/5.....	40
Figura 2.4 Peso fresco y seco de raíces (A y C) y hojas (B y D) de variedades de chile habanero (Chan y Ba´alche) en tres diferentes tiempos de evaluación.....	42
Figura 2.3 Osmolaridad en raíces y hojas de chile habanero en diferentes tiempos del experimento.....	46
Figura 2.4 Contenido de K ⁺ en raíces y hojas de diferentes variedades de chile habanero en diferentes tiempos del experimento	48
Figura 2.5 Contenido de Na ⁺ en raíces y hojas de diferentes variedades de chile habanero en diferentes tiempos del experimento.....	49
Figura 3.1. Diseño del experimento para el análisis del metabolismo de prolina en dos variedades (Mayan Chan y Mayan Ba´alche) de chile habanero en presencia de NaCl (150 mM).	58

Figura 3.1 Prueba de especificidad de cebadores y niveles de transcritos para el gen <i>CcP5CS</i>	64
Figura 3.2 Prueba de especificidad de cebadores y niveles de transcritos para el gen <i>CcP5CR</i>	64
Figura 3.3 Curva de $MgCl_2$ y expresión de transcritos para el gen <i>CcPDH</i>	65
Figura 3.4 Alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos de las cinco clonas elegidas de <i>CcP5CS</i>	66
Figura 3.5 Alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos de las cinco clonas elegidas de <i>CcP5CR</i>	67
Figura 3.6 Alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos de las cinco clonas elegidas de <i>CcPDH</i>	69
Figura 3.7 Efecto del NaCl sobre los niveles de expresión de los genes <i>CcP5CS</i> , <i>P5CR</i> y <i>PDH</i> en raíces	72
Figura 3.8 Efecto del NaCl sobre los niveles de expresión de los genes <i>CcP5CS</i> , <i>P5CR</i> y <i>PDH</i> en hojas	73
Figura 3.9 Actividad específica de la P5CS y PDH en raíces (A y C) y hojas (B y D) de dos variedades de Chile habanero sometidas a un estrés por NaCl	76
Figura 3.10 Contenido de Pro en raíces (A) y hojas (B) de las plantas testigo y plantas sometidas a una concentración de 150 mM de NaCl de Chan y Ba´alche.	77
Figura 4.1 Estimación de flujo neto de K^+ en raíces de dos variedades de Chile habanero (Chan y Ba´alche) bajo diferentes tratamientos	86
Figura 4.2 Estimación de flujo neto de H^+ en raíces de dos variedades de Chile habanero (Chan y Ba´alche) bajo diferentes tratamientos	88
Figura 6.1 Contenido de Pro en raíces (A) y hojas (B) de las plantas testigo y plantas sometidas a una concentración de 150 mM de NaCl de Chan y Ba´alche.	94

Figura 6.2 Concentraciones de prolina en hojas de *C. chinense* (variedades Génesis y Rex) y *C. annuum* (variedad Padrón) en etapa de estrés 95

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 2.1 Porcentaje de recuperación de las plántulas después de un estrés por NaCl.	39
Cuadro 2.2 Efecto del estrés salino sobre parámetros de crecimiento en la parte radicular y aérea de diferentes variedades de chile habanero.....	43
Cuadro 3.1 Posición de los cebadores para PCR sintetizados para <i>CcP5CS</i> , <i>CcP5CR</i> y <i>CcPDH</i>	56
Cuadro 3.2 Análisis de identidad de las clonas de P5CS de chile habanero con sus homólogos en <i>Solanaceaes</i>	66
Cuadro 3.3 Análisis de identidad de las clonas de P5CR de chile habanero con sus homólogos en <i>Solanaceaes</i>	68
Cuadro 3.4 Alineamiento de las clonas de PDH de chile habanero con sus homólogos en <i>Solanaceaes</i>	70
Cuadro A1 Solución modificada de Hoagland (Martínez-Cordero <i>et al.</i> , 2004).....	140
Cuadro A2 Efecto del estrés salino sobre la biomasa de raíces y hojas de diferentes variedades de chile habanero.....	141
Cuadro A3 Efecto del estrés salino sobre parámetros de crecimiento en la parte radicular y aérea de las cuatro diferentes variedades de chile habanero.....	142

ABREVIATURAS

Na ⁺	Sodio
K ⁺	Potasio
H ⁺	Protón
Ca ²⁺	Calcio
Cl ⁻	Cloro
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
MIFE	Estimación del flujo de iones por microelectrodos
mM	Milimolar
CE	Conductividad Eléctrica
dS m ⁻¹	DeciSiemens por metro
pH	Potencial de Hidrogeno
MPa	Mega pascales
FAO	Organización de las Naciones Unidad para la Alimentación y la Agricultura
K ⁺ /Na ⁺	Relación potasio/sodio
O ₂ ⁻	Anión superoxido
OH [·]	Radical hidroxilo
¹ O ₂	Oxígeno singulete
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato oxidasa
PCD	Muerte celular programada
Pro	Prolina
P5CS	Δ-pirrolina-5-carboxilato sintetasa
P5CR	Δ-pirrolina-5-carboxilato reductase
P5C	Pirrolina-5-carboxilato
PDH	Prolina deshidrogenasa
POX	Prolina Oxidasa
P5CDH	Pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa

Orn	Ornitina
Glu	Glutamato
HKT	Transportador de K ⁺ de alta afinidad
SOS	Ruta sal demasiado sensible
SOS1	Intercambiador Na ⁺ /H ⁺ de la membrana plasmática
NHX	Intercambiador intracelular Na ⁺ /H ⁺
AKT1	Transportador permeable a K ⁺ , Transportador de Arabidopsis 1, Canal permeable a K ⁺ , canal de K ⁺ de rectificación entrante (KIRC)
KUP/HAK/KT	Transportador de K ⁺ de alta afinidad
LCT1	Transportador catiónico de baja afinidad
CCC	Contransportador cloro catión
SOS2	Cinasa de serina/treonina
SOS3	Sensor de Ca ²⁺
PM-ATPasa	ATPasa de membrana plasmática
V-ATPasa	ATPasa vacuolar
HATS	Sistemas de transporte de alta afinidad
LATS	Sistemas de transporte de baja afinidad
ADP	Adenosin difosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleíco
ADNc	Ácido desoxirribonucleíco complementario
ARN	Ácido ribonucleico
<i>C. chinense</i>	<i>Capsicum chinense</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
KIRC o KIR	Canales de rectificación entrante de K ⁺
KORK o KOR	Canales de rectificación saliente de K ⁺
ATP	Adenosin trifosfato
<i>In vitro</i>	Fuera de organismo
H1/5	Solución Hoagland a un quinto de su fuerza iónica

μM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
Hrs o h	Horas u hora
mL	Mililitros
PF	Peso fresco
PS	Peso Seco
Seg	Segundos
nm	Nanómetros
CRA	Contenido relativo de agua
SE	Error estándar
P	P-valor
N	Muestra
B5/2	Medio Gamborg modificado a la mitad de su fuerza iónica
Cm	Centímetro
μL	Microlitros
Mmoles	Milimoles
g	Gramos
LIX	Intercambiador ion-liquido

RESUMEN

La salinidad es un factor ambiental que limita el crecimiento y productividad de los cultivos en el mundo. Este estrés perturba la homeostasis de iones conduciendo a una toxicidad de éstos y por otro lado conduce a otro tipo de estrés conocido como osmótico. Sin embargo, ante estos efectos tóxicos las plantas han desarrollado alternativas para disminuir el daño, como la acumulación de osmolitos que mantienen turgencia y activación de transportadores, cuya función es impedir el ingreso de Na^+ o aumentar un flujo de salida. A pesar de la importancia económica que tiene el chile habanero, son pocos o casi escasos los estudios en relación a la salinidad y los mecanismos de tolerancia en chiles. En este estudio se pudo concluir que de todas las variedades de chile habanero evaluadas, la variedad Chan fue la más tolerante mientras que Ba'alche su contraparte (sensible) a un tratamiento de 150 mM de NaCl, tanto en raíces y hojas Chan mostro mayores niveles de transcritos de *P5CS* y *P5CR* comparado con Ba'alche, respecto a la actividad de P5CS Chan mostro la mayor actividad a las 72 hrs de exposición con sal, por otro lado la PDH en Ba'alche tuvo una disminución conforme fue mayor el tiempo de exposición a la salinidad mientras que Chan mantuvo su actividad en los tres tiempos de evaluación. La variedad Chan mostro la mayor acumulación de Pro a los siete días de tratamiento con sal. Mediante la medición del flujo de iones (MIFE), se vio que la variedad Ba'alche fue la que presentó menos flujo de salida de K^+ en la mayoría de los tratamientos. Respecto al flujo de salida H^+ , Chan fue la que tuvo menos variaciones comparada con Ba'alche. La aplicación exógena de Pro favoreció en un menor flujo de salida de K^+ en la Ba'alche mientras que para Chan no tuvo cambios en los diferentes experimentos. Por último, se pudo realizar un análisis sobre el comportamiento de la Pro y se sugiere es fundamental ante estrés por sal y sequía, en salinidad su síntesis se da a partir de las 24 hrs mientras que en sequia es a los 14 días en ausencia de agua. Todos estos resultados sugieren que existe una combinación de varios mecanismos de tolerancia que ayudan a tolerar y evitar el estrés salino en chile habanero.

ABSTRACT

Salinity is an environmental factor that limits the growth and productivity of crops in the world. This stress disturbs ion homeostasis leading to their toxicity and on the other hand leads to another type of stress known as osmotic. However, given these toxic effects, plants have developed alternatives to reduce damage, such as the accumulation of osmolytes that maintain turgidity and activation of transporters, whose function is to prevent the entry of Na^+ or increase an efflux. Despite the economic importance of habanero pepper, there are few or almost scant studies relation in salinity and tolerance mechanisms in pepper. In this study it was concluded that of all the varieties of habanero pepper evaluated, the Chan variety was the most tolerant while Ba'alche its counterpart (sensitive) to a treatment of 150 mM NaCl, both in roots and leaves Chan showed greater *P5CS* and *P5CR* transcript levels compared to Ba'alche, with respect to the activity of P5CS Chan showed the highest activity at 72 hrs of salt exposure, on the other hand the PDH in Ba'alche had a decrease as time increased of exposure to salinity while Chan maintained its activity in the three evaluation times. The Chan variety showed the greatest accumulation of Pro at seven days of salt treatment. By measuring the flow of ions (MIFE), it was seen that the Ba'alche variety was the one with the least K^+ efflux in most treatments. Regarding the H^+ efflux, Chan was the one with the least variations compared to Ba'alche. The exogenous application of Pro favored a lower K^+ efflux in the Ba'alche while for Chan it had no changes in the different experiments. Finally, it was possible to carry out an analysis on the behavior of the Pro and it is suggested that it is essential to stress due to salt and drought, in salinity its synthesis occurs after 24 hrs while in drought it is at 14 days in the absence of Water. All these results suggest that there combination of several tolerance mechanisms that help to tolerate and avoid saline stress in habanero pepper.

INTRODUCCIÓN

El exceso de sales solubles en el suelo, principalmente NaCl, así como su disponibilidad en los suelos ricos en sales pueden estar sujetos a una salinización progresiva (Munns y Tester, 2008). En las granjas y zonas de cultivo la continua irrigación con agua rica con sales, la salinización puede tender a un aumento en los niveles de las sales en la superficie del suelo (Corwin *et al.*, 2007). La salinidad limita el crecimiento de muchos cultivos sensibles a la sal (glicofitas) con ello llevando a pérdidas millonarias y de rendimiento (Horie *et al.*, 2012). El impacto que tiene la salinización sobre el crecimiento vegetal resulta de una serie de estreses primarios o una combinación de un estrés hiperosmótico y la toxicidad iónica (estrés iónico), causando la acumulación de sales, mayormente de NaCl en casi todos los órganos de las plantas (Munns y Tester, 2008; Waters *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2017). El crecimiento vegetal en los suelos salinizados por altas concentraciones de iones de sodio (Na^+) puede resultar en un daño a la membrana celular, alterar los niveles de reguladores de crecimiento, inhibir enzimas, desorganizar la fotosíntesis, interferir con la homeostasis iónica, dar como resultado una sobre producción de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) y por ultimo muerte vegetal (Munns y Tester, 2008; Julkowska y Testerink, 2015). Una alta concentración de Na^+ puede inhibir los efectos en la absorción de los nutrientes esenciales con similares propiedades físico-químicas, tal como potasio (K^+) (Hamamoto *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2017).

Ante las consecuencias deteriorantes que produce el estrés salino en las plantas, estos organismos han desarrollado alternativas que puede contrarrestar los efectos dañinos de la sal, uno de estos mecanismos es la acumulación de compuestos no tóxicos llamados solutos compatibles, tal es el caso del aminoácido prolina (Pro) (Zhang *et al.*, 2016; Rana *et al.*, 2016; Annunziata *et al.*, 2017). La acumulación de Pro en el crecimiento vegetal bajo condiciones salinas contribuye en la protección contra el estrés a través de numerosos mecanismos, por ejemplo: molecular osmótica, estabilizador de membranas y macromoluculas, inductor de genes involucrados en la tolerancia al estrés salino (Hayat *et al.*, 2012). Muchos de los procesos en el metabolismo de la Pro asi como su catabolismo contribuyen en el balance del potencial redox (Szabados y Savoure, 2010). La biosíntesis de Pro ocurre por dos vías, una por el glutamato y otra por la vía de la ornitina, pero la vía de glutamato es probablemente la vía que predomina bajo

condiciones de estrés (Hu *et al.*, 1992; Delauney y Verma, 1993). Sin embargo, la acumulación de Pro inducida por estrés es variable en los cultivos y depende mucho de la especie, el estado vegetativo y la concentración de sal (Annunziata *et al.*, 2017). Así mismo, la Pro puede aplicarse de manera exógena en plantas estresadas, esto con el fin de incrementar los niveles endógenos del aminoácido *in planta*, para minimizar el daño y un restablecimiento en la tolerancia a la sal (Roy *et al.*, 1993; Hoque *et al.*, 2007) y para mejorar la retención de agua, crecimiento y la activación de defensa antioxidante. Muchos estudios han mostrado efectos benéficos con la aplicación exógena de Pro como es el caso de trigo y otros cultivos que están sujetos a moderado estrés por sal (100 mM de NaCl) (Mahboob *et al.*, 2016); aunque también la tolerancia relativa a la salinidad no correlaciona con los contenidos endógenos de Pro en trigo (Plazek *et al.*, 2013). Sin embargo, la tolerancia a la salinidad es una característica compleja que es controlada por muchos genes y en la cual participan varios mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares. De hecho, es necesario la combinación de varios de ellos para lograr un incremento considerable en la tolerancia a salinidad (Zhang y Shi, 2013; Adem *et al.*, 2014). Los chiles (*Capsicum spp.*) son un género económicamente importante de la familia de las Solanaceas. También, los chiles son sensibles a patógenos y factores abióticos como sequía y salinidad. De hecho, son considerados como moderadamente sensibles, sensibles o muy susceptibles a este último factor abiótico (Maas y Hoffman 1977; Aktas *et al.*, 2006). Sin embargo, a pesar de su importancia económica se tiene poca información sobre los mecanismos de tolerancia a salinidad en este género. Con el fin de contribuir al conocimiento del estrés por sal en especies hortícolas como son los chiles, en este trabajo se caracterizó el efecto de NaCl y la sensibilidad a la salinidad entre varias variedades de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Así mismo, se tomaron dos variedades contrastantes en su tolerancia y sensibilidad a la sal, se pudo analizar el metabolismo de Pro a través de sus genes que codifican para enzimas que participan en la biosíntesis y degradación de Pro y por último mediante la utilización de estudios electrofisiológicos usando microelectrodos selectivos (MIFE) se analizó el comportamiento de las dos variedades contrastantes con la aplicación exógena de Pro y sin este aminoácido, sobre el flujo de iones tanto de K⁺ como H⁺.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES GENERALES

1.1 LA SALINIDAD

En el mundo existe un amplio rango de ambientes estresantes (altas y bajas temperaturas, sequía, alcalinidad, salinidad, estrés por luz ultravioleta e infección por patógenos) que son potencialmente dañinos para las plantas (Van Breusegem *et al.*, 2001). Así mismo, la salinidad ha demostrado ser uno de los principales factores de estrés abiótico, especialmente en regiones áridas y semi-áridas, y que puede afectar severamente el crecimiento, rendimiento y calidad de los cultivos agrícolas, limitando con ello la producción de alimentos de origen vegetal (Serrano *et al.*, 1999; Allakhverdiev *et al.*, 2000; Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2001; Cramer, 2002; Aktas *et al.*, 2005; Koca *et al.*, 2007). A nivel mundial hay más de 800 millones de hectáreas (ha) afectadas por la salinidad (FAO, 2008), esta cantidad representa más del 7 % del área total de la superficie terrestre y se ha visto que el continuo aporte de sales con las aguas de riego y las altas tasas de evapotranspiración en las plantas originan la acumulación de sales en los suelos agrícolas (Munns y Tester, 2008). Por consiguiente la mayor parte de las tierras han sido afectadas por causas naturales, como la acumulación de sales en zonas áridas y semi-áridas durante largos periodos de tiempo (Rengasamy, 2002) o la erosión de las rocas que liberan sales solubles y que pueden ser de varios tipos, entre las principales sales que contribuyen a esta salinidad, se encuentran el carbonato de sodio (Na_2CO_3), los sulfatos de sodio (Na_2SO_4), magnesio (MgSO_4) y calcio (CaSO_4); los cloruros de magnesio (MgCl_2), potasio (KCl) y sodio (NaCl), siendo esta última sal y el ion sodio (Na^+) los más abundantes en los suelos (Szabolcs, 1989; Alemán-Guillén, 2009). El cloruro de sodio (NaCl) es la sal más soluble y abundante en los suelos salinos, la otra causa de la acumulación es la deposición de sales oceánicas acarreadas por el viento y lluvia. El agua de lluvia contiene de 6-50 mg/kg de NaCl, estas concentraciones disminuyen a mayor distancia de la costa, sin embargo, podría depositar cerca de 10 kg/ha de sal por cada 100 mm de precipitación por año (Munns y Tester, 2008).

De las 1500 millones de hectáreas de tierra seca cultivada en la agricultura, 32 millones

de hectáreas (2 %) se ven afectadas por la salinidad en diferentes grados. Consecuentemente de las 230 millones de ha de tierras regadas o de regadío, 45 millones de ha (20%) son afectadas por la salinidad (FAO, 2008).

La salinidad es una condición de los suelos caracterizada por una alta concentración de sales solubles. Los suelos son clasificados como salinos cuando su conductividad eléctrica (CE) es mayor de 4 dS/m (USDA-ARS., 2008), que es aproximadamente equivalente a 40 mM NaCl y genera una presión osmótica de aproximadamente -0.2 MPa. Esta definición de salinidad deriva de la CE que reduce significativamente la productividad de la mayoría de los cultivos agrícolas. Como se mencionó anteriormente la sal más soluble y abundante es el NaCl, por lo tanto, es necesario conocer que el sodio (Na^+) es el sexto elemento más abundante en la corteza terrestre, que comprende cerca del 2.8% (Lutgens y Tarbuck, 2003), y después del cloro (Cl^-) es el segundo soluto más abundante en los océanos. En este último, el Na^+ típicamente prevalece en concentraciones de 470 mM (Harris, 1996; Epstein y Bloom, 2005); la salinidad puede ser resultado de la escasez de lluvias, la alta evaporación, el mal manejo del agua y por último el uso indiscriminado de enormes cantidades de fertilizantes químicos que aumentan las concentraciones de sales en la rizosfera (Mahjan y Tuteja, 2005).

1.1.1 Estrés salino en plantas

Es interesante reflexionar sobre la evolución de los primeros años de la vida en el entorno denominado salino, y que, por lo tanto, no es una sorpresa que los organismos marinos, desde los protistas a los animales, son altamente tolerantes a la sal, de hecho, requieren Na^+ para mantener su turgencia celular y metabolismo. Incluso en los animales terrestres, el Na^+ juega un papel de nutriente esencial. En mamíferos, las concentraciones de Na^+ en el torrente sanguíneo se mantienen altos, esto en virtud de estrictos mecanismos homeostáticos (Grinstein y Rothstein, 1986) y sus concentraciones están de 135 a 145 mM, por otro lado, en el sistema renal y la orina se ha visto que existen concentraciones aún más altas (Segen y Stauffer, 1998).

Por el contrario, en la mayoría de las plantas terrestres, cuando son expuestas a concentraciones similares a las que se encuentran en el torrente sanguíneo de los

mamíferos, mucho menores que la de los océanos, las plantas sufren síntomas de toxicidad de moderados a severos. Sin embargo, tales concentraciones frecuentemente son encontradas y superadas en los suelos, aunque también rara vez presenta una distribución homogénea pero esto está asociado a la heterogeneidad espacial (Bazihizina *et al.*, 2012).

Las plantas se clasifican como halófitas o glicófitas de acuerdo a la capacidad de crecer y desarrollarse en ambientes ricos en sales o bajos contenidos de sales respectivamente (Sairam y Tyagi, 2004). Las halófitas son consideradas plantas que pueden ser parte de la flora nativa en los suelos salinos, sobrevivir y completar su ciclo de vida a altas concentraciones de sal; se les han llamado plantas amantes de la sal o del agua salada (Ruan *et al.*, 2010). Para su óptimo crecimiento, las plantas halófitas requieren de altas concentraciones de sal y pueden crecer en suelos con NaCl que presentan concentraciones mayores de 400 mM (Flowers *et al.*, 1977; Hawighorst, 2007). Así mismo, las plantas glicófitas tienen una limitada capacidad para alojarse en presencia de sales y su desarrollo puede ser extremadamente reducido a bajos niveles relativos de sales (Alemán-Guillén, 2009). Las glicófitas son definidas como plantas que son sensibles a la salinidad (Flowers, 2004; Göl, 2006) o tolerantes a bajas concentraciones de sal. Sin embargo, el crecimiento de las glicófitas no es estimulado por la sal en ningún rango de concentraciones (Maas y Nieman, 1978; Zafar, 2008).

Las glicófitas pueden tener un amplio rango de respuestas dependiendo del tipo de cultivo y su desarrollo durante todo su ciclo de crecimiento, donde la respuesta a la salinidad puede cambiar en relación a diversos factores, como por ejemplo: el ambiente de cultivo, la etapa de desarrollo de la planta y la magnitud (concentración de sal y tiempo de exposición) del estrés experimentado en el tiempo (Munns, 2002). Los efectos tóxicos de la salinidad en el crecimiento de la plantas pueden estar asociados con: 1) bajo potencial hídrico del medio en contacto con la raíz que causa o provoca un déficit de agua dentro de la planta; 2) los efectos tóxicos de iones, principalmente por Na^+ , Cl^- y SO_4^{2-} ; y por ultimo 3) el desbalance nutricional causado por la reducción en la toma de nutrientes (por ejemplo, K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) y su transporte a los brotes (Munns y Termaat, 1986; Ashraf, 1994; Marschner, 1995; Serrano *et al.*, 1999; Hasegawa *et al.*, 2000).

En general, las plantas expuestas a salinidad pueden presentar los siguientes efectos:

estrés hídrico, toxicidad por iones, desordenes nutricionales, estrés oxidativo, alteración de procesos metabólicos, desorganización de la membrana, genotoxicidad, reducción de la expansión y división celular (Hasegawa *et al.*, 2000; Munns, 2002; Zhu, 2007). A la vez, estos efectos reducen el crecimiento, desarrollo y supervivencia de las plantas.

Durante el inicio y desarrollo del estrés salino, dentro de la planta se ven afectados procesos de gran importancia tales como la fotosíntesis, la síntesis de proteínas y el metabolismo de lípidos (Parida y Das, 2005). Durante una exposición inicial a la salinidad, como se mencionó anteriormente las plantas reducen su expansión foliar. El efecto osmótico del estrés salino puede ser observado inmediatamente después de la aplicación de NaCl y se cree que puede continuar durante la exposición, resultando en una inhibición en la división y expansión celular, así como en un cierre estomático (Flowers, 2004; Munns, 2002). Durante una exposición a la salinidad a largo plazo, las plantas experimentan estrés iónico, que puede conducir a la senescencia prematura de hojas adultas y así, a la reducción de la disponibilidad del área fotosintética la cual puede servir de base para un crecimiento continuo (Cramer y Nowak, 1992). De hecho, un exceso de Na^+ y Cl^- han mostrado una potencial afectación para las enzimas en las células vegetales y también pueden causar incremento en el tamaño celular, resultando en una reducción en la producción de energía y otros cambios fisiológicos (Larcher, 1980). El estrés iónico como se mencionó tiene como resultado la senescencia prematura en las hojas más viejas y se muestran los síntomas de toxicidad (clorosis y necrosis) en hojas maduras debido a altas concentraciones de Na^+ este ion desorganiza la síntesis de proteínas debido a que desplaza o disminuye la concentración de K^+ en el citosol el cual juega un papel importante en el acoplamiento de los ribosomas, así mismo, el Na^+ causa una disminución de la actividad enzimática (Munns y Termaat, 1986; Hasegawa *et al.*, 2000; Munns, 2002).

1.1.2 Absorción y transporte de Na^+ en plantas

Las células epidérmicas constituyen la primera barrera para el movimiento de los iones en la raíz (Plett y Moller, 2010). Esta barrera proporciona una regulación de la entrada hacia el xilema (cerca del 2 %) así como la exclusión de sales (alrededor del 98 %) a la solución del suelo (Munns *et al.*, 2005). Por otro lado, los iones y solutos pueden viajar a partir de

la epidermis hacia el xilema por vía simplástica, esto puede darse mediante la introducción en las células de la raíz y de esta manera moverse de célula en célula a través de los plasmodesmos o por vía apoplástica, es decir, transportándose a través de la membrana plasmática (White *et al.*, 2002).

Muchos trabajos han postulado los mecanismos de transporte de Na⁺ tanto en su absorción como en su exclusión en la célula vegetal (Munns y Tester, 2008; Zhang *et al.*, 2010; Kronzucker y Britto, 2011; Cheeseman, 2013). Existe una discrepancia y no ha surgido un consenso respecto a la relación real en cuanto al papel de los diversos componentes de la planta. Por otro lado, no existe ningún candidato molecular identificado y demostrado de manera convincente que sea el que transporte el Na⁺ en el flujo de entrada a la célula bajo condiciones tóxicas. Dentro de todos los estudios, el candidato más fuerte que se ha reportado en la actualidad, son ciertas subclases de canales catiónicos no selectivos (NSCCs, por sus siglas en inglés), insensibles a voltaje IV-NSCCs, que participan de manera crítica y la mayoría de la evidencia se ha derivado de estudios electrofisiológicos (Figura 1.1), en los cuales se demuestra de manera concreta que los NSCCs pueden conducir corrientes de Na⁺. Ciertamente, la mayoría de estos estudios electrofisiológicos se realizaron utilizando la técnica de patch-clamp, en membranas de protoplastos los cuales carecen de pared celular, en ellos se midieron los flujos de Na⁺ así como su acumulación (Kronzucker y Britto, 2011).

Otras proteínas transportadoras han recibido atención como candidatas potenciales para el flujo de entrada de Na⁺ en las células de la raíz, estos son los transportadores de cationes de baja afinidad (LCT1, por sus siglas en inglés) que permiten la toma de Na⁺ (Schachtman *et al.*, 1997; Amtmann *et al.*, 2001) y tanto los transportadores de alta afinidad de K⁺ como los transportadores pertenecientes a la familia multigénica de los KUP/HAK/KT. Por otro lado, existen casos especiales en algunas especies como *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) y arroz (*Oryza sativa*) se ha visto que canales de rectificación entrante permeables a K⁺ que pertenecen a la familia Shaker, cuyo nombre son AKT participan permitiendo la entrada de Na⁺ al citosol, sin embargo estas proteínas para las demás plantas muestran una perfecta selectividad para K⁺ aunque sufren despolarización permanente, de manera que se impide la entrada de Na⁺ (Santa-Maria *et al.*, 1997; Amtmann y Sanders, 1999; Blumwald *et al.*, 2000; Gollidack *et al.*, 2003; Nieves-

Cordones *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). Otro estudio donde se muestra que AKT podría estar involucrado en el flujo de entrada de este ion fue realizado en la planta halófila *S. marítima* (Wang *et al.* 2007), en este se muestra evidencia sobre de la participación de AKT cuando se somete a las plantas a 150 mM de NaCl, pero no existió entrada de Na⁺ a concentraciones de 25 mM por tal motivo los autores sugieren que AKT podría estar implicado en la toma del ion. Hasta cierto punto la evidencia relacionada con la función de AKT como mediador en el flujo de entrada de Na⁺ es relativamente limitada y es claro que este tipo de canales debe recibir mayor atención para futuras investigaciones.

Por último, se encuentran los miembros de los transportadores de la familia HKT. Los miembros de la subfamilia HKT1 se propone que operan mayormente en la regulación y translocación de Na⁺ de las raíces a los brotes (Sunarpi *et al.*, 2005; Moller *et al.*, 2009), mientras que los de la subfamilia HKT2 han sido implicados en el flujo de entrada primario de Na⁺, al menos a bajas concentraciones de Na⁺ y principalmente en cereales (Horie *et al.*, 2001; Laurie *et al.*, 2002; Munns y Tester, 2008; Hauser y Horie, 2010; Horie *et al.*, 2011; Schulze *et al.*, 2012).

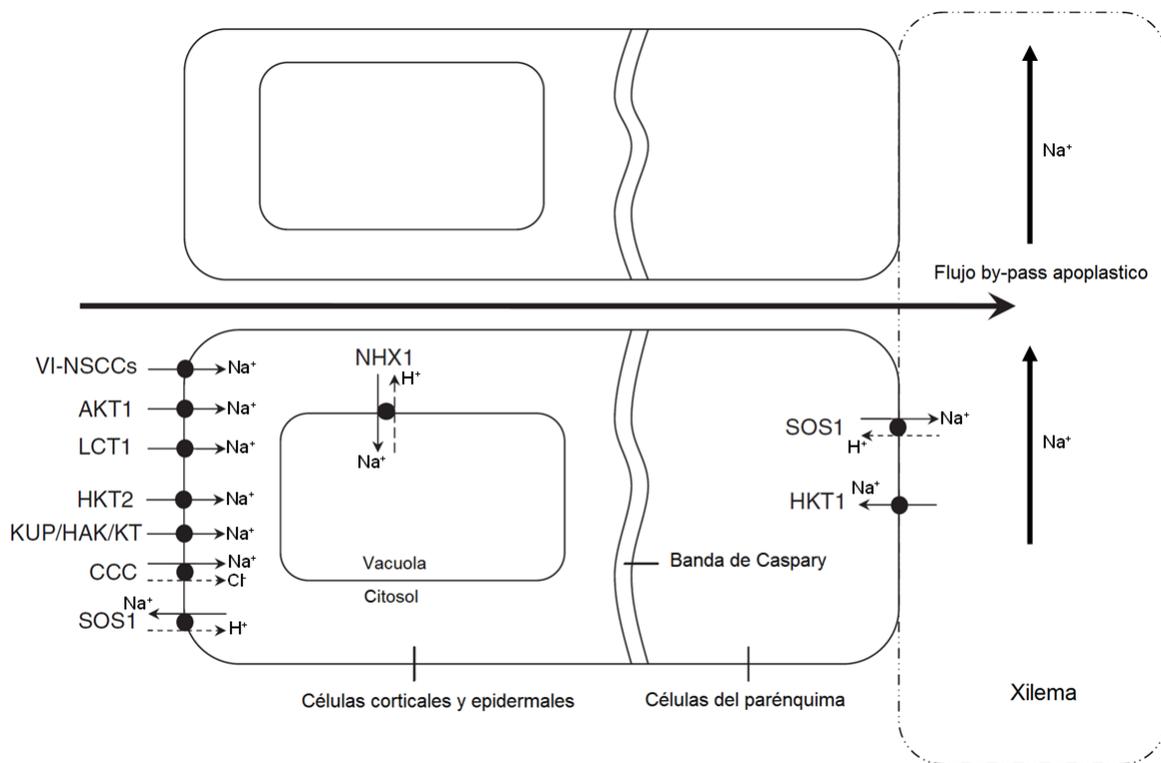


Figura. 1.1 Diagrama de los probables candidatos que participan en la toma o flujo de entrada de Na^+ en las células de la raíz de la planta. Las flechas solidas indican la dirección del flujo de Na^+ , las flechas discontinuas indican la dirección del flujo de protones (para el caso de los NHX1 o SOS1) o pueden estar acompañados de iones (este caso para los cotransportadores cloro-cación (CCCs), para el caso de los canales AKT1 solo se ha visto su participación en ciertas especies (Arroz y Arabidopsis) y halofitas; LCT, Transportadores Catiónicos de Baja Afinidad; VI-NSSC, Canales Catiónicos No Selectivos Insensibles a Voltaje (modificado de Kronzucker y Britto, 2011).

Otra potencial vía de entrada de Na^+ a la célula, y que ha recibido menos atención, pero no deben ser descartados, son los transportadores que llevan a cabo transporte del tipo simporte, en particular estos que simultánea y electroneutralmente pueden transportar Na^+ o K^+ junto con el Cl^- , son los conocidos Cotransportadores Cloro-Cación (CCCs, por sus siglas en inglés) (Haas y Forbush, 1998; Colmenero-Flores *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010). Dada la típica co-presencia de Na^+ y Cl^- en altas concentraciones en suelos salinos, esta posibilidad es particularmente atractiva para la toma de Na^+ . Se ha visto que en células animales, los CCCs juegan un papel importante en la osmoregulación (Gamba *et al.*, 1993; Hoffmann y Dunham, 1995; Gillen *et al.*, 1996; Haas y Forbush, 1998) y su presencia en plantas ha sido comprobada por Harling *et al.*, (1997) donde demostraron que los CCCs participan en el control de la división celular independiente de auxinas. Más recientemente, un miembro de la familia de los CCC en *A. thaliana*, AtCCC, fue caracterizado en ovocitos de *Xenopus*, para ello se realizaron micro inyecciones de ARNm (ácido ribonucleico mensajero) y se observó un incremento en el influjo de $^{22}\text{Na}^+$, $^{86}\text{Rb}^+$ y $^{36}\text{Cl}^-$ simultáneamente en dichos ovocitos (Colmenero-Flores *et al.*, 2007).

Por otra parte, la identificación de los sistemas antiportes de Na^+/H^+ se ha establecido de manera clara (Figura 1.1), uno de estos es el sistema SOS1 (de Salt Overly Sensitive), este es responsable de exclusión del citosol hacia fuera de la célula, por lo que se encarga de la salida de Na^+ a través de la membrana plasmática, esto se observó en plántulas de *A. thaliana* (Shi *et al.*, 2000), el otro es el sistema NHX1, el cual se ha sugerido que participa en la compartimentalización de Na^+ en la vacuola y es mayormente localizado en el tonoplasto, sin embargo estos dos tipos de transportadores se sugiere que son los encargados de regular la tolerancia al NaCl y regular las

concentraciones de Na^+ dentro de la célula (Apse *et al.*, 1999).

1.1.3 Principales efectos de la salinidad

De manera general, en cuanto al crecimiento, ciertamente los cultivos responden a la salinidad en dos fases: la primera es una fase continua o también llamada fase de estrés osmótico y este estrés se da como consecuencia del bajo potencial hídrico y presión osmótica que ejercen las soluciones con altas concentraciones de sales, la cual baja su energía potencial (el agua siempre se mueve de un alto a un bajo nivel de potencial de energía), que dificulta la entrada de agua a la planta; la segunda fase o tipo de estrés que se desarrolla en presencia de la salinidad es el estrés iónico, tiene un tiempo lento y se da cuando hay una acumulación de iones específicos en la planta durante un periodo de tiempo que conduce a la toxicidad por el desequilibrio de iones (Munns y Tester, 2008).

Estudios realizados por Munns *et al.* (2006), sugieren que la respuesta de las plantas ante la salinidad está dada tanto por un estrés osmótico como por un estrés iónico; se menciona que estos efectos ocurren secuencialmente. Usando los modelos que sugieren Munns *et al.* (2006) y Rengasamy (2010), se evaluó el crecimiento de trigo utilizando un sistema hidropónico, en este se utilizaron recipientes que contenían solución nutritiva Hoagland, a esta solución se le adicionó diferentes concentraciones de NaCl, concluyen lo siguiente: (1) a bajos niveles de salinidad (7 dSm^{-1}), el efecto osmótico fue continuo durante todo el periodo de crecimiento evaluado. Sin embargo, después de ~25 días de tratamiento, hubo una diferencia entre NaCl y la solución Hoagland, mostrando el efecto iónico de Na^+ que se vio reflejado en la reducción del crecimiento. Esto concuerda con las conclusiones publicadas por Munns *et al.* (2006); (2) no obstante, a concentraciones mucho más altas en la solución salina (30 dSm^{-1}), el efecto osmótico fue predominante y el efecto iónico del Na^+ fue mínimo. Por lo tanto, parece ser que cuando se está por encima del “valor umbral de conductividad eléctrica (CE) en la solución salina”, el efecto osmótico es el mecanismo más dominante y el efecto iónico puede ser insignificante a altos niveles en la CE. Recientemente, Tavakkoli *et al.* (2010), han confirmado estos resultados usando dos variedades de cebada.

Finalmente, la salinidad produce tanto estrés osmótico como iónico, a estos se les conoce

como factores de estrés primarios, sin embargo, el estrés salino y otros factores ambientales pueden causar un estrés secundario, el estrés oxidativo (Figura 1.2), este tipo de estrés se presenta por el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), tales como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). Estas son altamente reactivas y se ha visto que alteran el metabolismo celular normal a través del daño oxidativo en lípidos, ácidos nucleicos y proteínas (Adly, 2010), éstas últimas pueden sufrir modificaciones en aminoácidos, fragmentación de la cadena peptídica e incremento en la susceptibilidad a sufrir proteólisis y de manera general la célula puede tener un desbalance metabólico lo que conlleva a un deterioro celular (Ahmad *et al.*, 2010).

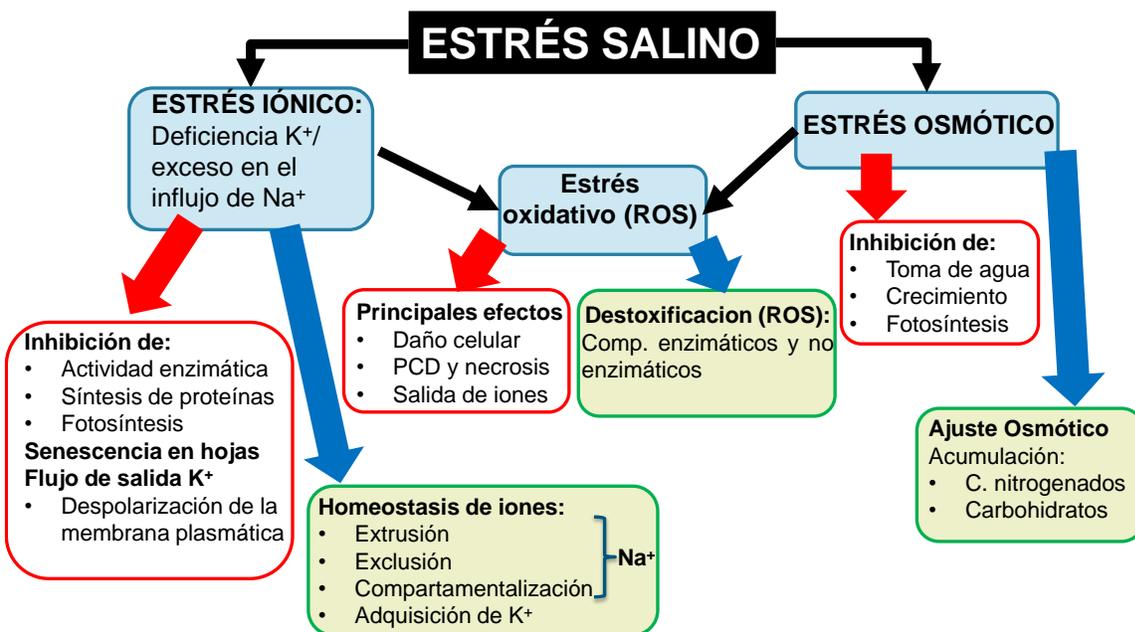


Figura. 1.2 Principales efectos del estrés salino. En flechas rojas se muestran los principales daños en la célula, en flechas azules se muestran los mecanismos de tolerancia al estrés salino (tomado de Horie *et al.*, 2012; Munns y Tester, 2008; Shabala y Pottosin, 2014).

1.1.3.1 Estrés osmótico

Los efectos de la salinidad en plantas son generalmente resumidos como estrés hídrico, estrés salino y el desequilibrio iónico. El estrés hídrico (disminución del potencial hídrico a

valores más negativos) surge como resultado de la evaporación del agua usado por las plantas y la acumulación de sal. El exceso de las cantidades solubles de sales en el suelo limita la disponibilidad de agua y de esta manera disminuye el potencial hídrico de las plantas, que es la respuesta más común bajo condiciones de salinidad. El potencial hídrico y osmótico de las plantas puede convertirse en valores de potenciales más negativos con el incremento de las concentraciones de NaCl, mientras que la presión de turgor se incrementa en presencia de NaCl. Entonces a manera de resumen, la salinidad induce el estrés osmótico (Figura 1.2) el cual reduce la toma de agua en la zona radicular de la planta. Las plantas regulan su transporte de agua bajo condiciones de estrés salino, esto sucede debido a que las células necesitan de una proporción de agua indispensable para mantener el crecimiento y las funciones celulares vitales tales como la fotosíntesis y el metabolismo. En el transporte de agua a larga distancia de las raíces a los brotes, la evaporación es una de las principales fuerzas motrices para el movimiento del agua, especialmente en la vía apoplástica. El estrés osmótico inducido por salinidad por un lado induce el cierre estomático, lo que conduce a una reducción en la evaporación y el transporte de agua en general (Yeo *et al.*, 1985) y por otro se induce la acumulación de ácido abscísico (ABA, por sus siglas en inglés) en raíces, mientras que en hojas se reduce la capacidad de acumular ABA por las condiciones de deshidratación que produce el Na⁺ causando un efecto tóxico por la poca disponibilidad de agua (Jia *et al.*, 2002).

Junto con las vías apoplásticas, las vías simplásticas o transcelulares, son importantes en el transporte de agua en las plantas. En estas vías, cuando el agua es transportada a través de la membrana, el potencial hídrico juega un papel central en la fuerza motriz para el movimiento del agua (Kramer y Boyer, 1985). Cuando los iones salinos están disueltos, estos disminuyen el potencial osmótico extracelular, el estrés salino reduce inmediatamente la diferencia del potencial hídrico en el flujo de entrada de agua. Si el gradiente de potencial hídrico es revertido esto puede deberse a al estrés osmótico inducido por la salinidad (excesiva cantidad de iones disueltos que disminuyen notablemente el potencial osmótico extracelular), aunque también puede conducir a un flujo de salida de agua de las raíces (deshidratación), por lo tanto, las plantas pierden su turgencia, lo que conlleva a una disminución en la expansión celular (Xiong y Zhu, 2002).

En este efecto se observa una disminución en el crecimiento de las hojas y raíces, incluso

cuando las concentraciones de iones (Na^+ y Cl^-) en la célula son bajas (Hawighorst, 2007). Además, se ha visto que el estrés salino por NaCl provoca también la pérdida de conductancia estomática, disminución en la fotosíntesis, toma de agua, así como nutrientes, estos efectos se le han atribuido en su mayoría al efecto osmótico causado por dicha sal (Munns, 1993; Xiong y Zhu, 2002; Tester y Davenport, 2003).

1.1.3.2 Estrés iónico

Existe toxicidad por sales en las plantas, como resultado de la absorción y la acumulación de ciertos iones tóxicos disueltos en el agua que se aplica en el riego dentro de un cultivo en especial. Estos constituyentes tóxicos incluyen principalmente al Na^+ , Cl^- y SO_4^{2-} . Estos iones pueden reducir la productividad de los cultivos y eventualmente pueden causar pérdidas en la producción. Sin embargo, aunque no todos los cultivos son susceptibles en la misma medida, la mayoría de los cultivos de interés comercial y alimenticio son sensibles a concentraciones elevadas de estos iones (Abrol *et al.*, 1988). Ante los efectos tóxicos que produce Na^+ , una posible teoría es que la célula no tenga la suficiente capacidad para que una vez que el Na^+ se encuentre en el citosol ésta lo pueda compartamentalizar en la vacuola y de esta manera destoxificarse. Aunque también se ha visto que Na^+ puede acumularse en las paredes celulares y conducir a una deshidratación celular (Munns, 2005).

Finalmente, el principal efecto de importancia se presenta en las células a altas concentraciones de Na^+ , es el desplazamiento de K^+ de sitios blanco donde la función es vital, esto es debido a que ambos iones muestran gran similitud química, comúnmente se les conoce como “los gemelos”, de esta manera las proteínas transportadoras que se encuentran en la membrana plasmática tienen la dificultad para distinguir entre alguno de estos dos iones. Tan es así que bajo condiciones de altas concentraciones externas de Na^+ , puede existir una toma substancial de Na^+ sobre K^+ en transportadores o canales (Blumwald *et al.*, 2000). El primer punto de interacción entre el Na^+ y K^+ es que ingresan a la raíz por vía simplástica. Sin embargo, altas concentraciones de Na^+ inhiben directamente los sistemas de transporte de K^+ , además, el Na^+ se ha visto que causa una despolarización del potencial electroquímico de la membrana, lo que repercute en una disminución en la absorción de K^+ . En consecuencia, en condiciones de estrés salino, la

deficiencia de K^+ puede ocurrir como se ha reportado en maíz, melón y chile (Botella *et al.*, 1997; Kaya y Higgs, 2003; Kaya *et al.*, 2007; Aleman-Guillén, 2009).

Cuando se acumula Na^+ en las hojas en concentraciones tóxicas para la célula, esta toxicidad está dada por el efecto iónico específico (estrés iónico) (Figura 1.2) (Munns, 2005). El Na^+ es transportado a las hojas, especialmente en hojas maduras se incrementa la concentración de Na^+ , y se ha observado una disminución en la concentración de K^+ sobre Na^+ (K^+/Na^+) que es producida por la interacción de estos iones. Por el contrario, a bajas concentraciones citosólicas de la relación K^+/Na^+ se ha observado que existe una inhibición en la actividad de numerosas enzimas en el citoplasma, esto se debe a que el K^+ activa a más de 50 enzimas (Hawighorst, 2007). Además, el K^+ se requiere en altas concentraciones para la síntesis de proteínas (alrededor de 130 mM de K^+), esto se debe a que en el proceso de traducción, incluyendo los pasos de unión del ARNt (ARN de transferencia) a los ribosomas el K^+ juega un papel muy importante, por ello que cuando se tienen altas concentraciones de Na^+ en el citoplasma la síntesis de proteínas se ve afectada (Wyn Jones *et al.*, 1979; Blaha *et al.*, 2000; Hawighorst, 2007).

1.1.3.3 Estrés oxidativo

La exposición de plantas a un estrés salino conduce tanto a estrés osmótico como iónico, pero a su vez estos pueden dar lugar a un estrés secundario conocido como estrés oxidativo (Figura 1.2) en donde la célula puede verse afectada por una sobre regulación y dar lugar a una sobre producción de ROS tales como H_2O_2 (peróxido de hidrogeno), $O_2^{\cdot-}$ (radical superóxido), 1O_2 (oxígeno singlete) y $\cdot OH$ (radical hidroxilo). Este exceso de ROS, se ha visto que causa reacciones fitotóxicas tales como peroxidación de lípidos, degradación de proteínas y mutaciones en el ADN (ácido desoxirribonucleico) (McCord, 2000; Wang *et al.*, 2003; Vinocur y Altman, 2005; Pitzschke *et al.*, 2006). En células vegetales, las ROS responsables del estrés oxidativo son H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ y $\cdot OH$ y son producidos en el citosol, cloroplastos, mitocondrias y en el espacio apoplástico (Bowler y Fluhr, 2000; Mittler, 2002). Diversos estudios han mostrado y sugerido que las ROS desempeñan un papel clave como moléculas señalizadoras las cuales están involucradas en la transducción de señales para contrarrestar diversos factores como por ejemplo: la infección por patógenos, ambientes estresantes, muerte celular programada y

estimulación en el desarrollo (Mittler *et al.*, 2004; Torres y Dangl, 2005).

El daño causado en la membrana, inducido por el estrés salino puede ocurrir por el aumento o sobreproducción de altos niveles tóxicos de ROS (Shalata *et al.*, 2001). Un aumento en la producción de ROS puede resultar en el cierre estomático, causando de esta manera la disminución en la concentración de CO₂ dentro de los cloroplastos. Esto a su vez provoca el descenso en las concentraciones de NADP⁺ con un aumento concomitante de ROS (Foyer y Noctor, 2003). El incremento en la concentración de ROS daña las proteínas D1 del fotosistema II (PSII, por sus siglas en inglés) que conducen a una fotoinhibición. El estrés aumenta la fotorespiración y la actividad de NADPH que también contribuye en un incremento en la acumulación de H₂O₂, que puede inactivar enzimas mediante la oxidación de grupos -tiol. Esta toxicidad de H₂O₂ no es debida a su sola reactividad, porque requiere de la presencia de un metal reductor para formar el altamente reactivo radical hidroxilo ([•]OH), que tiene la habilidad de reaccionar con todas las moléculas biológicas (Halliwell y Gutteridge, 1989).

1.1.4 Mecanismos de tolerancia

La capacidad para tolerar una concentración elevada de sales es un ejemplo cierto de la adaptación genética en plantas. Aunque la vida surgió en el mar, las células vegetales evolucionaron en una condición pobre en Na⁺. Por esta razón, la mayoría de las plantas terrestres han perdido la capacidad para tolerar una cantidad de sal elevada. El problema puede ser planteado a nivel celular, haciendo hincapié en el motivo por el cual las células de las raíces de las plantas terrestres no son capaces de excluir Na⁺ y concentrar K⁺ de forma tan eficaz a como lo hacen las células de animales o de hongos (Rodríguez-Navarro *et al.*, 1994, Yeo, 1998, Benito y Rodríguez-Navarro, 2003). El incremento de Na⁺ en el citoplasma provoca a nivel celular reducción de la síntesis proteica, daños osmóticos relacionados con la pérdida de agua en las células, la inhibición del transporte de nutrientes y como consecuencia la muerte celular; en la planta completa se observa la pérdida de hojas o la inhibición del crecimiento de las raíces (Hasegawa *et al.*, 2000; Tester y Davenport, 2003).

No obstante, las plantas han desarrollado ciertos mecanismos que les confieren tolerancia

a elevadas concentraciones externas de Na^+ . Estos mecanismos se manifiestan en un amplio rango de adaptaciones, que comprenden desde el nivel celular hasta el de la planta completa (Yeo, 1998; Hasegawa *et al.*, 2000; Tester y Davenport, 2003). Las plantas han mostrado mecanismos para disminuir los efectos negativos del estrés salino, por ejemplo:

OSMOTOLERANCIA

Una de las mayores consecuencias del estrés por NaCl es la pérdida de agua intracelular. Ante esto, las plantas han mostrado mecanismos involucrados en la disminución de la toxicidad por NaCl. Las plantas acumulan muchos metabolitos que son también conocidos como “solutos compatibles (orgánicos)” en el citoplasma, éstos se sintetizan para incrementar la tolerancia hiperosmótica contra la pérdida de agua celular inducida por el estrés salino. Este proceso es también requerido para el balance del potencial osmótico de Na^+ y Cl^- que son secuestrados en la vacuola (Wyn Jones *et al.*, 1977).

En cuanto al componente osmótico, para superar los problemas de absorción de agua, las plantas requieren acumular solutos compatibles a nivel de citosol y organelos sin afectar la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo. Algunos de estos son iones esenciales como el K^+ , pero la mayoría son solutos orgánicos de bajo peso molecular como azúcares simples (principalmente glucosa y fructosa), alcoholes derivados de azúcares (glicerol e inosítoles metilados) y azúcares complejos (trehalosa, resinosa y fructanos). También se incluyen derivados de aminoácidos cuaternarios (prolina, glicina betaína, β -alanina betaína, prolina betaína), aminas terciarias (1,4,5,5-tetrahidro-2-metil-4-carboxil pirimidina) y compuestos sulfónicos (o-sulfato de colina, propionato dimetil sulfónico). Con este tipo de compuestos, las plantas logran disminuir o mitigar el potencial osmótico, hecho que facilita el movimiento del agua hacia el interior de las células de las raíces (Yokoi *et al.*, 2002).

Prolina

La acumulación de prolina (Pro) se da para mejorar la adaptación tanto al estrés salino como a la sequía (Smirnov y Cumbes, 1989; Chen y Dickman, 2005). Esta acumulación se da bajo condiciones de deshidratación y esto es debido al incremento en su biosíntesis

y una disminución en la degradación. La Pro es sintetizada en los plastidios y citoplasma, mientras que su degradación a L-glutamato es un proceso que se lleva a cabo en la mitocondria. Existen dos diferentes precursores de la Pro en plantas; el glutamato y la ornitina (Orn). La L-prolina es sintetizada y su vía proviene a partir de L-glutamato por dos reacciones sucesivas de reducción (Figura 1.3), que son catalizadas por Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C) sintasa (P5CS) y P5C reductasa (P5CR) respectivamente (Delauney y Verma, 1993).

El otro precursor involucrado en la biosíntesis de la Pro es la Orn (Figura 1.3), que es transaminado para dar lugar a P5C, esta reacción es llevada a cabo por la enzima Orn- δ -aminotransferasa (OAT) mitocondrial (Verbruggen y Hermans, 2008). Las distintas vías de glutamato y Orn contribuyen de forma diferente para la acumulación de Pro inducida por estrés en diferentes plantas. Bajo condiciones de estrés salino, la vía de glutamato es dominante en *Vigna aconitifolia* (Delauney *et al.*, 1993). En plántulas jóvenes de *A. thaliana*, la vía de la Orn trabaja en conjunto con la vía de glutamato para promover la acumulación de Pro durante el estrés salino, pero cuando se evaluaron plantas adultas se obtuvo que solo en la vía de glutamato tienen mayor actividad las enzimas relacionadas con esta vía (Roosens *et al.*, 1998). Ambas vías parecen contribuir para la acumulación de Pro inducida por salinidad en *M. truncatula* en cualquier etapa de desarrollo de la planta (Armengaud *et al.*, 2004). De igual manera se ha reportado que en estrés salino existe un aumento en la acumulación de Pro en hojas de dos cultivares de arroz, difiriendo en su tolerancia, entonces esto sugiere la implicación de este aminoácido en su acumulación contribuye en gran medida en el ajuste osmótico durante estrés por salinidad (Demiral y Türkan, 2006).

Se ha visto que plantas de tomate (*S. lycopersicum* cv. Radja) sometidas a estrés salino en presencia de concentraciones de 140 mM de NaCl acumulan significativamente prolina en el citoplasma celular de las raíces primarias y secundarias. Por otro lado, a concentraciones de 70 mM NaCl solo se observaron diferencias significativas de acumulación de Pro en raíces primarias. Por lo tanto, estos resultados sugieren que a nivel de raíces, la acumulación de Pro puede ser considerada como indicador de sensibilidad al estrés salino en tomate, además de contribuir como respuesta adaptativa a la disminución del potencial osmótico en el citoplasma (Pérez-Alfocea *et al.*, 1996).

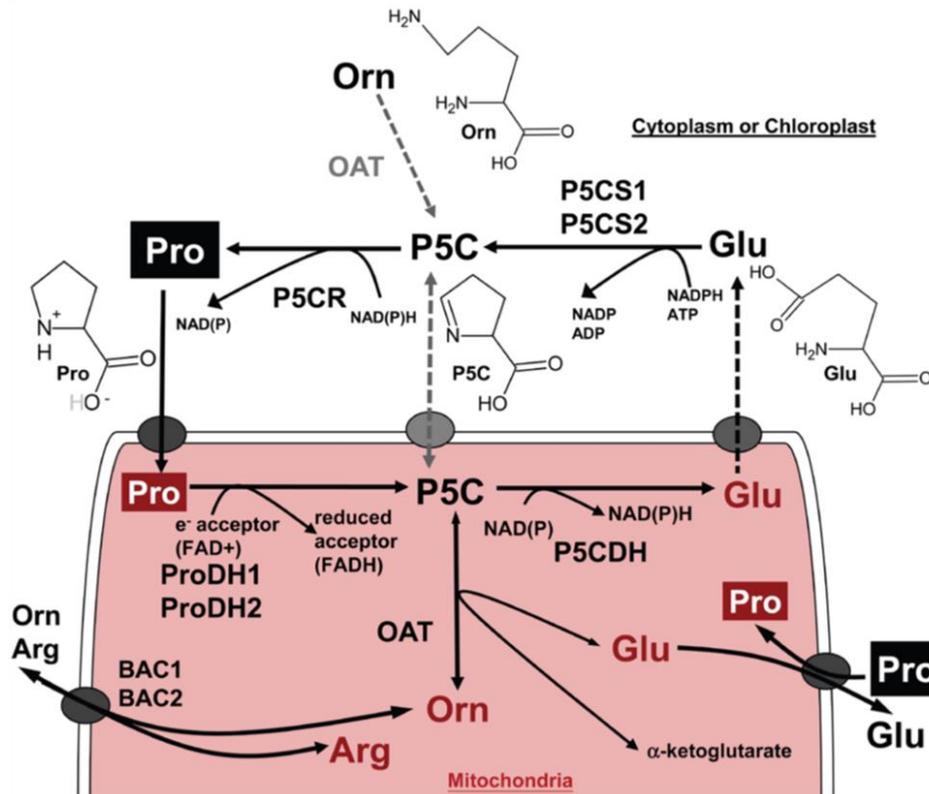


Figura. 1.3 Principales vías en el metabolismo de la prolina (Szabados y Savoure, 2010; Verslues y Sharma, 2010).

SISTEMA ANTIOXIDANTE

Se conoce que la salinidad y el estrés hídrico inducen estrés secundario, y como consecuencia del estrés iónico y osmótico se produce un estrés secundario conocido como “estrés oxidativo”. Durante el estrés oxidativo inducido por salinidad, la disponibilidad de CO_2 atmosférico se ve reducido debido a un incremento en el cierre estomático y se reduce el consumo de NADPH por el ciclo de Calvin. Cuando la ferredoxina es reducida durante la transferencia de electrones fotosintéticos, los electrones pueden ser transferidos del fotosistema I (PS-I) al oxígeno para dar lugar a radicales superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) esto en el proceso llamado reacción Mehler, la cual inicia una reacción en cadena donde se producen radicales de oxígeno más dañinos para la célula (Hsu y Kao, 2003). Cuando se producen en exceso estas ROS citotóxicas, que son continuamente generadas durante procesos metabólicos normales en la mitocondria, peroxisomas y citoplasma, pueden destruir el metabolismo normal a través de un daño oxidativo en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (McCord, 2000). Las plantas al ser organismos sésiles, son más vulnerables a estos daños oxidativos causados por factores

ambientales (Foyer *et al.*, 1994; Hippeli y Elstner, 1996). Consecuentemente, existe la necesidad constante de mecanismos eficientes para mitigar el daño oxidativo en los componentes celulares. Por otro lado, las plantas han desarrollado sistemas eficientes para remover ROS, que incluyen enzimas antioxidantes específicas que son depuradoras de ROS y también se producen pequeñas moléculas no enzimáticas que actúan en la depuración de ROS, tales como: ascorbato, glutatión, α -tocoferol, flavonoides, antocianinas, componentes polifenólicos y carotenoides.

Para mitigar el daño ocasionado por el estrés oxidativo inducido por salinidad, las plantas destoxifican las ROS por una alta regulación de enzimas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1), ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11), catalasa (CAT; EC 1.11.1.6), glutatión reductasa (GR; EC 1.6.4.2) y glutatión peroxidasa (GPX; EC 1.11.1.9). Las actividades armonizadas de estas múltiples enzimas en diferentes compartimentos subcelulares, logran un balance entre la tasa de formación y eliminación de las ROS, y mantienen el H_2O_2 en niveles requeridos para la señalización celular. Es ampliamente aceptado que el grado de daño oxidativo celular en plantas expuestas a estrés abiótico es controlado por la capacidad de los sistemas antioxidantes (McKersie *et al.*, 1996; Noctor y Foyer, 1998; Acar *et al.*, 2001; Türkan *et al.*, 2005). De igual manera, se ha reportado que existe correlación entre la capacidad antioxidante y la tolerancia a la salinidad, además, ha sido estudiado en diversas especies de plantas, tales como algodón (Gossett *et al.*, 1994), cítricos (Gueta-Dahan *et al.*, 1997), arroz (Dionisio-Sese y Tobita, 1998; Demiral y Türkan, 2004, 2005), trigo (Meneguzzo *et al.*, 1999), chícharo (Hernández *et al.*, 1995, 2000), remolacha (Bor *et al.*, 2003), mijo (Sreenivasula *et al.*, 2000), tomate silvestre (Shalata *et al.*, 2001; Mittova *et al.*, 2003; Koca *et al.*, 2006), ajonjolí (Koca *et al.*, 2007), verdolaga (Yazici *et al.*, 2007) y plantago (Sekmen *et al.*, 2007).

Además, en plantas transgénicas que sobreexpresan enzimas depuradoras de ROS, tales como SOD (Breusegem *et al.*, 1999; Alscher *et al.*, 2002), APX (Wang *et al.*, 1999), GR (Foyer *et al.*, 1995) y GPX (Roxas *et al.*, 1997, 2000) mostraron un aumento en la tolerancia a estrés osmótico, temperatura, foto inhibición y estrés oxidativo. Por último, se ha observado que la sobreexpresión de SOD en plantas de tabaco, induce un incremento en la defensa contra el estrés oxidativo inducido por alta luminosidad y bajas

temperaturas, por lo tanto, estas plantas mantuvieron su tasa fotosintética bajo estas condiciones de estrés (Gupta *et al.*, 1993).

MECANISMOS DE FLUJO DE SALIDA, COMPARTAMENTALIZACIÓN VACUOLAR Y REMOVILIZACIÓN DE Na⁺

A nivel celular, se minimiza la entrada de Na⁺, esto con el objeto de mantener una elevada relación de K⁺/Na⁺ en el citoplasma (Amtmann y Sanders, 1999; Maathuis y Sanders, 1999; Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001; Ragel *et al.*, 2019); así mismo, se potencia la extrusión de Na⁺ desde el citoplasma, hacia el exterior celular o hacia el lumen de la vacuola, a través de transportadores antiportadores Na⁺/H⁺ de tipo SOS1 o NHX1, respectivamente (Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001; Zhu, 2001, 2003; Ward *et al.*, 2003). A nivel de planta completa, las plantas tolerantes a ambientes salinos suelen minimizar el transporte de Na⁺ al xilema (especialmente las glicófitas; Hasegawa *et al.*, 2000) o maximizar, una vez alcanzado el tallo, la recirculación a través del floema, hacia zonas especializadas de la planta donde se produce la acumulación de Na⁺, como ocurre en hojas maduras o células secretoras (Tester y Davenport, 2003).

En la Figura 1.4 se muestra un modelo acerca de los procesos de transporte de Na⁺, a nivel celular y de planta completa, implicados en la tolerancia a elevadas concentraciones de Na⁺ en plantas vasculares.

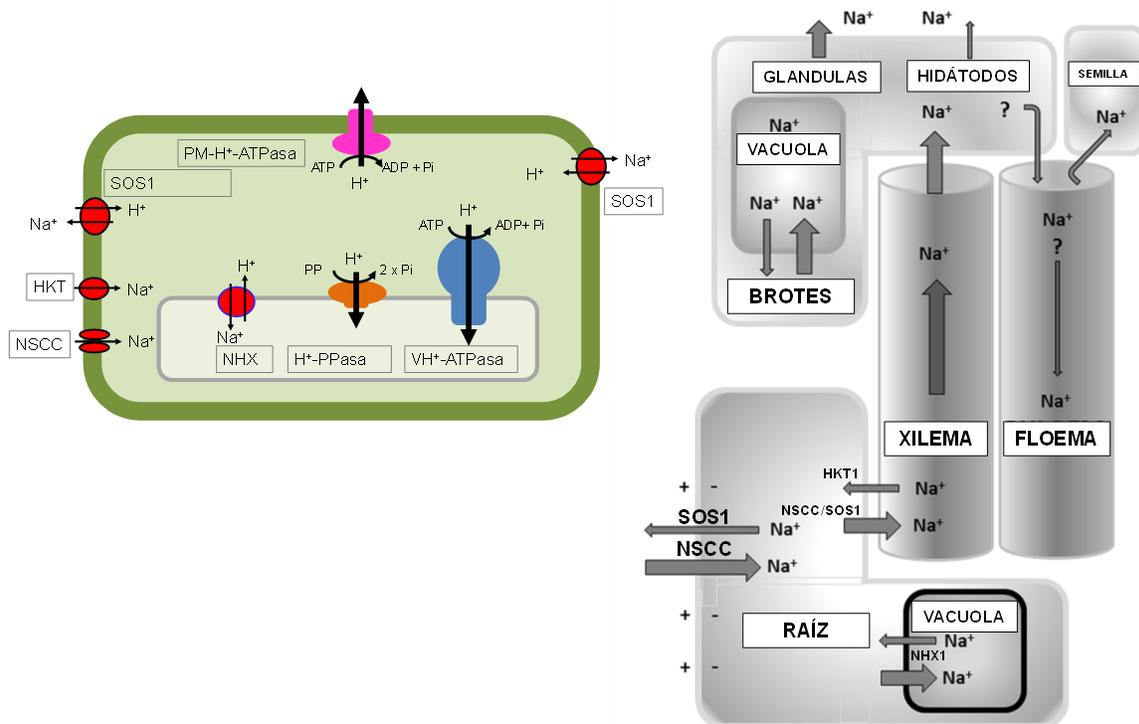


Figura. 1.4 Principales sistemas de transporte de Na^+ involucrados en la tolerancia a la salinidad (modificado de Maathuis *et al.*, 2014).

1.2 POTASIO (K^+)

Se sabe que la corteza terrestre contiene alrededor de 2.6% de K^+ . Así mismo el K^+ es absorbido por las plantas como el catión K^+ , que es fácilmente soluble en el suelo. Es el catión más abundante en el citoplasma, debido a que no es metabolizado, el K^+ y otros aniones contribuyen significativamente al potencial osmótico de las células. En los suelos, la mayoría del K^+ está en forma deshidratada y coordinada con átomos de oxígeno los cuales no están disponibles para las plantas. Las concentraciones típicas en la solución de suelo varían entre el 0.1 a 6 mM de K^+ . Se ha visto que la deficiencia de K^+ es rara pero para el crecimiento de plantas es generalmente estimulado por la adición de K^+ y fertilización a base de potasa, esto es una práctica común en muchas zonas productoras (Maathuis, 2009).

1.2.1 Importancia y funciones biológicas del K^+

El K^+ es un componente imprescindible de las células vivas y todas deben conservar niveles adecuados del mismo para crecer y mantenerse con vida. La selección de K^+ en

lugar del Na⁺ sucedió al principio de la evolución de la vida desde el medio marino y ha sido conservada con muy pocas excepciones incluso en la mayoría de especies halófilas. El continuo aporte de K⁺ a la célula desde el medio marino, en el que la concentración de Na⁺ es elevada, ha dado forma a los mecanismos de homeostasis iónica. Esto es también aplicable a las especies terrestres, ya que han evolucionado de las especies marinas que estaban continuamente en contacto con el agua de mar (Rodríguez-Navarro, 2000; Garcíadeblas *et al.*, 2007). Las células vegetales siguen el modelo general descrito anteriormente, siendo el K⁺ un elemento esencial para las plantas tanto para el crecimiento como para el desarrollo, es el catión más abundante en los tejidos vegetales, representa entre el 1 y al 10% del peso seco de la planta (Leigh y Jones, 1984).

La concentración citosólica de K⁺ está sometida a un control homeostático muy estricto, el cual se mantiene en valores entre 100 y 200 mM (Leigh y Jones, 1984). Por el contrario, la concentración de K⁺ en los compartimentos subcelulares es altamente variable y refleja el estado de la planta respecto a este macronutriente. El K⁺ vacuolar compartimentalizado dependiendo de los requerimientos se ha visto que es muy dinámico, puede existir una ganancia o pérdida en la concentración de este K⁺ almacenado y pueden estar en función de los requerimientos de la célula para mantener la homeostasis en el citosol.

Se ha comprobado que la concentración vacuolar de K⁺ oscila entre 10 y 200 mM, por otro lado, se han encontrado concentraciones de hasta 500 mM en las células guarda de los estomas. En el apoplásto las concentraciones son normalmente bajas, a excepción de células o tejidos especializados, como por ejemplo en los estomas, donde se puede alcanzar una concentración de 100 mM de manera transitoria. (Leigh y Jones, 1984; Marschner, 1995; Ashley *et al.*, 2006).

El K⁺ participa en una serie de procesos fisiológicos y bioquímicos muy importantes para la planta, llevando a cabo funciones vitales en el metabolismo celular, en el crecimiento vegetal y en la adaptación a diferentes tipos de estrés. Estas funciones se pueden clasificar en dos tipos: aquellas basadas en el mantenimiento de una concentración estable de K⁺ (entorno de 100 mM) en compartimentos metabólicamente activos, tales como citoplasma, núcleo, estroma de cloroplastos y matriz de mitocondrias; y aquellas basadas en la alta movilidad en la planta a todos los niveles (celular, tisular y transporte a larga distancia a través del xilema y el floema) (Marschner, 1995).

La primera clase de funciones incluye activación enzimática, síntesis proteica, mantenimiento del aparato fotosintético, neutralización de cargas negativas en proteínas, ácidos orgánicos y mantenimiento de la homeostasis del pH citoplasmático (Figura 1.5). La segunda clase de funciones comprende fenómenos relacionados con la osmoregulación y mantenimiento del potencial de membrana, tales como expansión celular, desarrollo del tubo polínico, crecimiento vegetal, apertura y cierre de estomas, movimientos de órganos inducidos por luz y movimientos sismonásticos (Figura 1.5) (Marschner, 1995; Amtmann *et al.*, 2004; Britto y Kronzucker, 2008; Maathuis, 2009; Wakeel *et al.*, 2011).

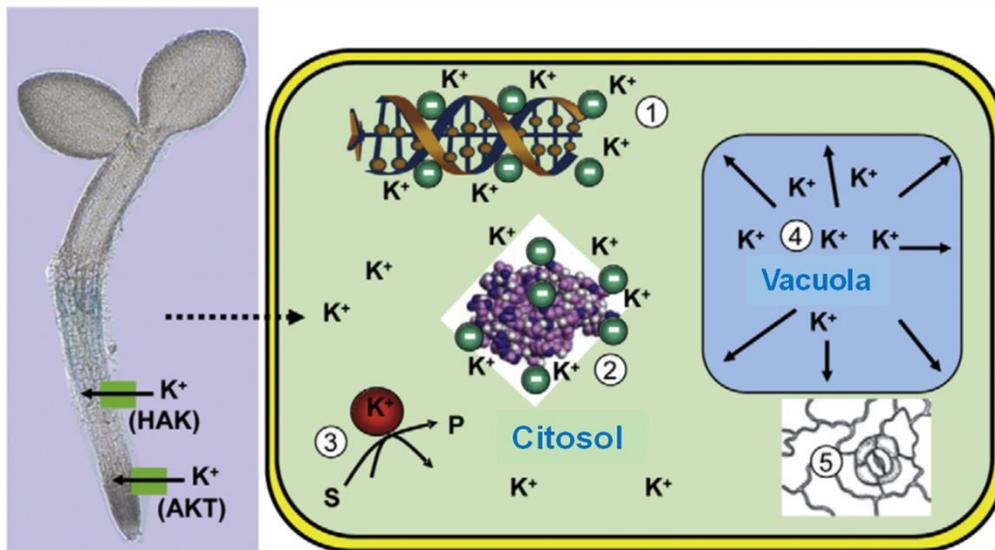


Figura 1.5 Principales funciones del K^+ . El K^+ se absorbe a través de los transportadores (HAK) y canales (AKT). Dentro de la planta, las características intrínsecas del K^+ lo hacen idóneo para neutralizar las cargas negativas de los ácidos nucleicos (1) y las proteínas (2). Además, El K^+ activa enzimas específicas (3) actuando como cofactor en reacciones enzimáticas entre el sustrato (S) y el producto (P). Al ser el principal catión en las vacuolas (4), el K^+ genera presión de turgor al arrastrar agua, para proporcionar una estructura definida y conducir la expansión celular el crecimiento de la planta y los movimientos de ésta, como la regulación de la apertura y cierre de los estomas (5). Modificado de Maathuis, 2009.

1.2.2 Síntomas de deficiencia de K⁺

Un contenido de K⁺ inferior a 10 g/Kg de peso seco provoca síntomas de deficiencia en la mayoría de las especies vegetales. Algunos de los trastornos ocasionados por la deficiencia de K⁺ son: extensión celular limitada, reducción de la fotosíntesis, alteración en la regulación de la transpiración, disminución de la translocación de los azúcares a la raíz y acumulación de compuestos orgánicos que contienen nitrógeno (Marschner, 1995; Gierth y Mäser, 2007). Debido a la gran cantidad de funciones esenciales que desempeña este catión en el crecimiento vegetal y el metabolismo, las plantas deficientes en K⁺ muestran un fenotipo que se caracteriza por un crecimiento reducido, especialmente de las partes aéreas y de las raíces laterales.

Los síntomas visibles de la deficiencia comienzan con el amarillamiento y clorosis de las áreas con nervaduras de las hojas más viejas, que se vuelven necróticas con la progresión de la deficiencia y bajo condiciones severas tiene lugar la muerte de meristemas laterales y terminales (Marschner, 1995; Amtmann *et al.*, 2004). Por lo tanto, la deficiencia de K⁺ es uno de los factores más importantes que afectan al rendimiento de los cultivos, provocando una reducción de la cantidad y calidad de la producción, y afectando al procesado de los productos recolectados (Marschner, 1995), ya que el K⁺ es importante para mantener la firmeza y textura del fruto, así como el contenido de azúcar de tubérculos y de otros órganos de almacenamiento.

Las plantas deficientes en K⁺ presentan una mayor susceptibilidad al ataque por hongos, insectos y otros organismos patógenos. Esto es debido a que se produce una alteración de la síntesis de compuestos de alto peso molecular (proteínas, almidón y celulosa), acumulándose mayormente compuestos de bajo peso molecular como azúcares solubles, ácidos orgánicos, aminoácidos y nitrato, lo que crea un ambiente beneficioso para el desarrollo y la alimentación de patógenos e insectos (Marschner, 1995; Amtmann *et al.*, 2008). Estas plantas también son más susceptibles a los daños por helada y sequía, lo cual a nivel celular se relaciona con la deficiencia de agua (Marschner, 1995).

1.2.3 Retención de K⁺ como parámetro de tolerancia

Las plantas han desarrollado mecanismos de tolerancia a la salinidad en los cuales, uno de los más importantes es la habilidad para retener K⁺ en las células de raíces y hojas. Se ha visto y se sugiere que puede existir una correlación negativa entre la magnitud de fuga de K⁺ y la tolerancia a la salinidad. Por tal motivo los diferentes grupos de investigación que estudian los mecanismos de tolerancia a la salinidad sugieren que esta característica podría utilizarse como un parámetro para la selección de nuevos cultivares resistentes, tolerantes y sensibles ante el estrés salino, con la excepción de *O. sativa* (Chen *et al.*, 2005; 2007b,c; Smethurst *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2013; Coskun *et al.* 2013; Wu *et al.*, 2013; Bonales-Alatorre *et al.*, 2013a; Adem *et al.*, 2014). Sin embargo, se ha visto que cuando existe aplicación exógena de compuestos orgánicos y cationes divalentes se podría evitar el flujo de salida de K⁺ en las células epidérmicas de la raíz, por lo tanto, esta alternativa sería viable pero costosa para los productores que podrían cultivar en suelos ricos en NaCl (Cuin y Shabala, 2005; Chen *et al.*, 2007b; Zhao *et al.*, 2007; Zepeda-Jazo *et al.*, 2008; Shabala *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2009).

1.2.4 Mantenimiento de la relación K⁺/Na⁺ citosólica como mecanismo clave para la tolerancia a la salinidad

La relación K⁺/Na⁺ citosólica a menudo se confunde con la relación K⁺/Na⁺ del tejido (partes aérea u hojas), lo cual resulta erróneo, puesto que es la homeostasis citosólica de K⁺ y no su acumulación vacuolar, lo que resulta esencial en los procesos metabólicos, al igual que este mismo ion contribuye en el potencial osmótico celular por lo que tiene un papel importante en ajuste osmótico (Maathuis y Amtmann, 1999; Shabala y Cuin, 2008). Al respecto, existen evidencias en plantas modelo como *A. thaliana* y *O. sativa*, estos estudios han sugerido la idea de que la homeostasis del K⁺ a nivel de planta completa bajo condiciones de salinidad tiene lugar, en gran medida, a través de la regulación de las concentraciones internas de Na⁺ en los diferentes tejidos. Esto es llevado a cabo a través de diferentes proteínas transportadoras las cuales se encargan de controlar la selectividad de K⁺ sobre la de Na⁺, mediante la extrusión de Na⁺ al medio externo, su compartamentalización vacuolar, así como la carga y descarga en el xilema (Zhu *et al.*,

1998; Tester y Davenport, 2003; Horie y Schroeder, 2004; Ren *et al.*, 2005; Rus *et al.*, 2005; Sunarpi *et al.*, 2005; Apse y Blumwald, 2007). En otra medida, la célula tiene como función impedir y evitar el flujo de salida de la K^+ al medio extracelular (Shabala y Cuin, 2008).

A nivel celular, la toma de Na^+ puede estar restringida, dado que cuando ingresa a la célula puede existir una exclusión de manera activa a la solución del suelo de nuevo, esto es dado mayormente a través del antiportador Na^+/H^+ de la membrana plasmática conocida como el sistema SOS1 (Zhu, 2003). De igual manera, una vez que el Na^+ ingrese a la célula se puede dar la compartimentalización del exceso de este catión en la vacuola a través del transportador Na^+/H^+ de tonoplasto NHX1 (Zhang y Blumwald, 2001), estos tipos de transportadores se consideran claves para la tolerancia a la salinidad.

A nivel de la planta completa, la adaptación a la salinidad puede llevarse a cabo mediante la reducción de la carga de Na^+ hacia la parte aérea, la recirculación de Na^+ en el floema, la compartimentalización específica de tejido y órgano en algunas especies, tales como carga preferencial de Na^+ en estructuras menos sensibles como son las hojas senescentes, epidermis, entre otras, y mediante la secreción de sal desde la hoja a través de glándulas de sal o vesículas (Tester y Davenport, 2003). Un mecanismo importante es sin duda, la recirculación de Na^+ desde los órganos fotosintéticos hacia las raíces.

Existen importantes indicios de que este proceso está mediado por transportadores de K^+ de alta afinidad conocidos como HKT (Rus *et al.*, 2004; Davenport *et al.*, 2007). Debido a que estos transportadores están implicados en la toma de K^+ en los tejidos vegetales (Rubio *et al.*, 1995) se han convertido en el principal objetivo de las estrategias para la mejora de la tolerancia a la salinidad (Byrt *et al.*, 2007).

1.3 CHILE HABANERO COMO MODELO DE ESTUDIO

1.3.1 Importancia y origen

La familia de las Solanáceas agrupa a las especies hortícolas de mayor importancia que se cultivan en Yucatán. Dentro de las Solanáceas, el cultivo del chile es de particular

importancia para el estado por su gran demanda para la condimentación de platillos regionales y por su demanda actual en los mercados nacional e internacional. Todos los chiles cultivados pertenecen al género *Capsicum*, dentro del cual se han reconocido cinco especies domesticadas (*C. baccatum* L., *C. pubescens* R., *C. annuum* L., *C. chinense* Jacq. y *C. frutescens* L.). El chile habanero es un cultivo de gran importancia económica para los productores de hortalizas del estado de Yucatán, ocupando el segundo lugar después del cultivo del tomate (Tun, 2001).

La importancia económica del chile se basa principalmente en el aumento en la utilización de sus frutos que ha experimentado desde hace algunos años. Según datos de la FAO, el chile es a nivel mundial el quinto producto hortícola, atendiendo a su superficie cultivada. La mayor superficie de cultivo se encuentra en el norte del estado y contribuye con más de un 90 % al volumen de producción estatal (Borges-Gómez *et al.*, 2008).

Generalmente, su fruto se comercializa en fresco para consumo directo o como una materia prima para procesamiento industrial. Sin embargo, la demanda por frutos de alta calidad, el polvo, las pastas, las salsas y otros derivados, excede la oferta actual de los productores, procesadores e industriales del chile habanero de Yucatán (Leyva-Morales *et al.*, 2005). El interés por este cultivo no se centra únicamente en su importancia económica; se ha demostrado que el chile es una fuente excelente de colorantes naturales, vitaminas como la C, E y A y minerales (Guzmán *et al.*, 2004).

Las investigaciones botánicas confirman el origen y domesticación del género *Capsicum* en el Nuevo Mundo. No hay evidencia de su existencia en otros continentes antes del descubrimiento de América (Long-Solís, 1998).

1.3.2 Estudios empleando chile habanero

Entre la gran diversidad del género *Capsicum*, el chile habanero es un símbolo cultural que destaca por su picor, debido al alto contenido de capsaicina en el fruto (Laborde y Pozo, 1984). Por esta razón, el chile habanero tiene gran importancia comercial para las industrias farmacéuticas, de armas, cosmética, de pinturas, etc. (Salazar-Olivo y Silva-Ortega, 2004). El chile habanero de la península de Yucatán se cultiva y se produce

principalmente en los tres estados que la conforman: Campeche, Quintana Roo y Yucatán. Debido a su importancia económica como producto hortícola e industrial, el mejoramiento de chile habanero ha impulsado la investigación básica y aplicada desde el punto de vista fisiológico, bioquímico y molecular.

Debido a la facilidad para cultivarlo en condiciones *in vitro* e invernadero, se ha usado como modelo de estudio para evaluar la respuesta a diferentes condiciones de estrés tanto biótico como abiótico. Existen diferentes investigaciones de entre las cuales se usa como modelo de estudio el chile habanero, en un estudio realizado por Celis-Arámulo *et al.* (2011), observó que en plántulas de chile habanero al estar en presencia de NO_3^- , estas modificaron el crecimiento y el desarrollo de su sistema radicular, aumentando el crecimiento o proliferación de raíces laterales. En trabajos recientes se ha reportado el efecto que tiene el estrés hídrico sobre el crecimiento de plantas y metabolismo de capsaicinoides en frutos de chile habanero (Zamudio-Moreno *et al.*, 2013). Recientemente, se ha reportado que las variedades de chile habanero además de diferir en sus características morfológicas, difieren en su crecimiento y respuesta bajo condiciones de ausencia de nitrógeno (Santiago-Antonio *et al.*, 2014). Además, se han realizado estudios con elementos tóxicos como aluminio sobre el crecimiento del sistema radicular de plántulas de chile habanero en condiciones *in vitro* (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014). En otro estudio llevado a cabo en chile habanero, se pudo observar que cuando las plántulas estuvieron en un periodo de estrés hídrico por 21 días, la prolina fue el osmolito que se acumuló predominantemente en comparación de la glicina betaína y se sugiere que solo la prolina podría estar involucrada en el ajuste osmótico durante un periodo de estrés hídrico (Escalante-Magaña *et al.*, 2019).

1.3.3 La salinidad y el género *Capsicum*

De acuerdo con el departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) en 2011, el chile (*C. annuum*) y tomate (*S. lycopersicum*) son dos de los mayores cultivos de consumo diario y que se han clasificado como cultivos moderadamente sensibles a la salinidad (de la Peña y Hughes, 2007). Así mismo, otros autores consideran que el chile es susceptible o muy susceptible a la salinidad (Navarro *et al.*, 2002, 2006; Aktas *et al.*, 2006), pero existe poca información acerca de los efectos de

la salinidad en el género *Capsicum* en general.

En *C. annuum*, la salinidad afecta el crecimiento de las plantas, su germinación, altura, longitud del sistema radicular y en general la biomasa se ve reducida significativamente. En cuanto a la productividad esta también se ve reducida, al igual que el rendimiento, presentando frutos pequeños con poco peso al igual que el número de frutos por planta se va afectado (Chartzoulakis y Klapaki, 2000; Rubio *et al.*, 2009; Kumar y Gothandam, 2014). Además, se ha visto que en algunos genotipos de *C. annuum* son tolerantes a concentraciones de 150 mM de NaCl en la solución nutritiva por un periodo de diez días para seleccionar los genotipos tolerantes a la salinidad, las plantas fueron expuestas a 100 mM de NaCl y la severidad del estrés fue evaluada en las hojas (Aktas *et al.*, 2006).

En trabajos realizados por Kumar y Gothandam, (2014), evaluaron los efectos del estrés salino (25, 50, 100, 150 y 200 mM de NaCl) sobre caracteres morfológicos y hormonas endógenas de tres variedades de *Capsicum*, variedad CO1 (sensible), variedad K2 (moderadamente tolerante) y variedad G4 (tolerante), los resultados claramente mostraron una disminución en el tamaño de las hojas, peso del fruto, altura de la planta y contenido de clorofila en todas las variedades a concentraciones de 150 y 200 mM NaCl. por otro lado, al evaluar el contenido de hormonas endógenas se observó una disminución en los contenidos de zeatina, auxinas y giberelinas, esto tuvo una alta correlación con el daño en el tejido y por último se pudo apreciar que a concentraciones de 200 mM de NaCl se encontró que la variedad CO1 tuvo mayor porcentaje de muerte al día 35 comparada con las otras variedades evaluadas. En estudios realizados por Zhani *et al.* (2012b; 2013), evaluaron el efecto del estrés por NaCl (34, 68, 102, 136, 170 y 205 mM) en diferentes cultivares de chile (*C. frutescens* L), entre los resultados obtenidos se menciona que los daños ocasionados por la salinidad se detectaron en el sistema radicular (longitud, peso fresco y seco) y hojas (número y área) además, se pudo cuantificar un mayor contenido de prolina en las hojas en la mayoría de las variedades evaluadas. Los resultados mostraron que con el incremento de la salinidad, el contenido de K⁺ y Ca²⁺ se vio disminuido. Por otro lado, al cuantificar el contenido de Na⁺ en raíces este mostró un incremento al igual que la biosíntesis de proteínas y azúcares solubles en las hojas.

1.3.4 Salinidad y chile habanero

Existen pocos o escasos reportes acerca de la salinidad y el chile habanero, en gran parte ya que, en la península de Yucatán, por el momento no existen reportes de cultivos de esta especie en suelos con problemas de salinidad. Sin embargo, una alternativa para conocimiento básico sería evaluar los diferentes cultivares utilizando agua de riego y con ello poder observar si presentan cambios en morfología, metabolismo en respuesta al agua de riego.

Entre los reportes que han utilizado a chile habanero como modelo están los estudios realizados en nuestro grupo de trabajo donde se evaluaron, se seleccionaron y caracterizaron dos variedades de chile habanero que difieren en sensibilidad a NaCl, también se comparó su respuesta a estrés salino. La variedad Rex fue la que mostro más tolerancia, mientras que la variedad Chichén-Itzá fue la más sensible. Bajo estrés salino (7 días a 150 mM NaCl), la variedad Rex acumuló más prolina en las raíces que la variedad Chichén-Itzá, por lo tanto se sugiere que la prolina podría estar jugando un papel importante en la tolerancia y ajuste osmótico en esta variedad (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014b).

En resumen, se conoce que el chile habanero es una especie de gran importancia para la península de Yucatán a nivel de producción y a nivel mundial ha mostrado una mayor demanda con el paso de los años, sin embargo, esta especie tiene una gran variabilidad genética y es uno de los cultivos que presentan mayor sensibilidad a estrés por sal. Por lo tanto, es importante realizar estudios relacionados con los mecanismos de tolerancia a la salinidad, ya que existen pocos reportes con respecto al tema, sobre todo comparando diferentes variedades, esto sería de gran importancia para seleccionar genotipos que muestren mayor tolerancia a este tipo de estrés. Por lo tanto, en este trabajo se utilizará como modelo de estudio al chile habanero, se compararon cuatro variedades expuestas a diferentes concentraciones de NaCl y durante un periodo determinado (siete días), este trabajo se enfoca en conocer y sugerir la manera de regulación de genes y enzimas relacionadas con el metabolismo de prolina, y el papel que tiene este aminoácido si se le adiciona de manera exógena a las plántulas a través de la medición de flujo de iones.

HIPOTESIS

Si el estrés por NaCl modifica el metabolismo de prolina, provocando su acumulación y facilitando la retención de K^+ , entonces si suplementamos de manera exógena este aminoácido esperaríamos los mismos resultados en variedades susceptibles a chile habanero.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del estrés salino (NaCl) sobre el metabolismo de la Prolina y su efecto de este aminoácido aplicado de manera exógena sobre el flujo de iones en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar el grado de tolerancia a estrés por NaCl en variedades de chile habanero.
- 2) Evaluar el metabolismo de la prolina en dos variedades de chile habanero que difieran en tolerancia y sensibilidad al estrés por NaCl.
- 3) Determinar el efecto de la adición de prolina exógena sobre el flujo de K^+ y H^+ , en las raíces de variedades de chile habanero sometidas a NaCl.
- 4) Realizar una reflexión crítica sobre el papel de la prolina en el estrés hídrico y salino.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para evaluar el efecto de la salinidad en diferentes variedades de chile habanero e identificar la regulación metabólica de la prolina, y el flujo de iones, se diseñó la siguiente estrategia experimental (Figura 1.6). Se evaluaron plántulas de cuatro variedades de chile habanero (Mayan Chan, Mayan Ba'íche, Mayan Kisin y la variedad comercial Génesis (seminis) con una edad de 45-50 días y se cultivaron en hidroponía (vermiculita), estas plántulas se sometieron a diferentes concentraciones de NaCl en la solución nutritiva y se realizó una curva dosis respuesta. Se determinaron los niveles de transcritos de los genes que codifican para las diferentes enzimas involucradas en el metabolismo de la prolina, así mismo, se midieron las actividades de las enzimáticas relacionadas con el metabolismo de este aminoácido y por último, para la medición de flujos de iones K^+ y Na^+ se realizó por electrofisiología.

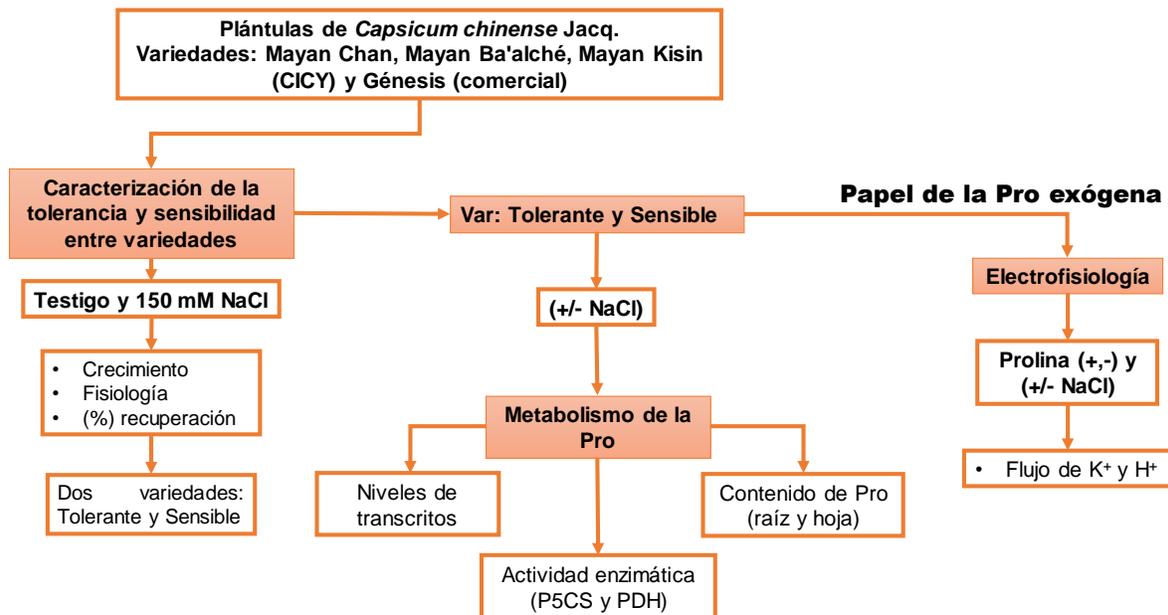


Figura 1.6 Estrategia Experimental

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN DE LA TOLERANCIA Y SENSIBILIDAD ENTRE VARIETADES DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.) SOMETIDAS A UN ESTRÉS SALINO

2.1 INTRODUCCIÓN

La salinidad es un estrés abiótico que reduce la productividad de los cultivos de origen vegetal en las regiones áridas y semiáridas del mundo (Foolad, 2007). Se ha estimado que en el mundo cerca de 800 millones de hectáreas (ha) así como 32 millones Ha de la tierra cultivable son afectadas por la salinidad (FAO, 2015). Un suelo salino o con salinización inhibe la toma de agua en las plantas, causando un desbalance iónico y por lo consiguiente conduce a un estrés iónico y osmótico (Munns y Tester, 2008). Por un lado, el estrés osmótico desencadena potenciales osmóticos bajos, que con esto limitan la absorción de agua del suelo a las raíces; para el caso del estrés iónico este es causado por una sobre acumulación de iones tóxicos de sales dentro de las células.

Estos dos tipos de estrés, provocan un desbalance nutricional afectando de manera negativa el estatus fisiológico y son los responsables de causar un deterioro en el crecimiento y desarrollo de la planta (Santos *et al.*, 2001; Meringer *et al.*, 2016). Para hacer frente a estas condiciones ambientales desfavorables, las plantas han desarrollado diferentes mecanismos para protegerse y preservar su metabolismo celular con normalidad, también para prevenir lesiones celulares, dentro de los mecanismos está la de la capacidad de las plantas para acumular y recircular iones (Gratao *et al.*, 2015; Kolupaev *et al.*, 2016). Así mismo, la tolerancia a la salinidad comprende de una serie de mecanismos complejos y actualmente la combinación de los mecanismos se ha visto que se incluyen: la compartimentalización de iones para un ajuste osmótico; acumulación de nutrientes esenciales particularmente el K^+ ; la síntesis de solutos compatibles u osmolitos, que tienen la habilidad de limitar la entrada de iones salinos a la corriente transpiratoria y también la habilidad de ser depuradores de especies reactivas de oxígeno (ERO) que son generadas por la toxicidad del Na^+ (Colmer y Flowers, 2008, Bojórquez-Quintal *et al.*, 2016).

Los chiles (*Capsicum* spp.) es un género de importancia económica dentro de la familia de las solanáceas, que también incluyen a los tomates y papas. Cerca de 32 especies son nativas de América, las que se se cultivan principalmente son: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. frutescens*, *C. pubescens* y *C. chinense* (Moscone *et al.*, 2007; Perry *et al.*, 2007). Sin embargo, estas plantas son sensibles tanto a estrés biótico y abiótico, este último como sequía y salinidad. De hecho, las plantas de chile son consideradas moderadamente sensibles, sensibles o altamente sensibles al estrés por salinidad (Aktas *et al.*, 2006). En la especie *C. chinense*, comúnmente conocido como chile habanero, ha sido evaluado y se ha encontrado que dentro de la misma especie las variedades pueden diferir en cuanto a su respuesta ante un estrés por sal, mientras una especie puede acumular y compartamentalizar los iones de Na^+ en las vacuolas y también tener una mayor acumulación de K^+ (Variedad Rex-tolerante), la especie sensible mostro un mecanismo diferente el cual era excluir el Na^+ y presentaba posiblemente un mayor gasto energético por una actividad constante de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014b). Por lo tanto, el objetivo de este capítulo es evaluar el efecto del NaCl sobre diferentes variedades de chile habanero, con el fin de determinar la variedad más sensible y tolerante para futuros experimentos.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal

Se utilizaron plántulas de chile habanero que se obtuvieron de semillas de diferentes variedades: Mayan Chan, Mayan Ba'alche, Mayan Kisín, obtenidas en el CICY, y Génesis (variedad comercial).

2.2.2 Germinación y condiciones de crecimiento

Las semillas de las diferentes variedades se desinfectaron con etanol al 80 % (v/v) por 5 min y se realizaron lavados continuos con agua estéril. Posteriormente se incubaron con hipoclorito de sodio de la marca comercial (Cloralex, 5 % NaOCl) al 30 % (v/v) por 15 min, de nueva cuenta se realizaron lavados continuos y se dejaron embebiendo con agua estéril durante 48 horas a una temperatura de 4 °C en condiciones de oscuridad.

Después de un tiempo de estratificación, las semillas fueron incubadas en condiciones de oscuridad en cajas de Petri con papel filtro humedecido con agua estéril y se esperó hasta la aparición de la radícula. Una vez que las semillas germinaron, estas fueron transferidas a recipientes de plástico que contenían vermiculita humedecida con solución Hoagland a 1/5 (H1/5) de su fuerza iónica. En estos recipientes estuvieron por un tiempo aproximado de 45 días y se regaron tanto con agua estéril como con solución nutritiva, esto en intervalos de 7 días. Antes de que las plántulas fueran puestas en tratamiento con NaCl, se retiraron de la vermiculita y se lavaron con agua estéril. Cabe mencionar que esto se realizó para evitar el estrés mecánico por manipulación y para homogenizar el tamaño de las plántulas, estas se cultivaron por un periodo de 7-15 días en solución nutritiva con aireación. Las condiciones de crecimiento de las plántulas, así como los tratamientos con NaCl se llevaron a cabo en un cuarto de cultivo a 25°C y un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad. La solución nutritiva Hoagland a un quinto de su fuerza iónica (H1/5) en el anexo (cuadro A1).

2.2.3 Selección de las variedades sensibles y tolerantes a un estrés por NaCl

Para evaluar la tolerancia y sensibilidad entre las variedades de chile habanero (*Capsicum chinense*) se seleccionaron tres variedades del CICY y una comercial, estas fueron: Mayan Chan (fruto rojo), Mayan Kisín (fruto rojo), Mayan Ba'alche (fruto naranja) y Génesis (fruto naranja). En el cuadro 2.1 se muestran las características generales de las variedades de chile habanero seleccionadas. Se tomaron 48 plántulas por variedad de 30-45 días de edad, para los tratamientos con NaCl fueron 6 plántulas por recipiente por duplicado y de igual manera para las condiciones sin NaCl (testigo), para este experimento se evaluaron en tres tiempos, uno que corresponde al tiempo cero de donde se partió para las evaluaciones, otra evaluación fue al tiempo en periodo de estrés por NaCl que fue por siete días en donde cada recipiente contenía 300 mL de solución H1/5 adicionada con 150 mM de NaCl y sin este compuesto y por último un tiempo de recuperación a los siete días después del estrés, en donde las plántulas se enjuagaron con solución H1/5 y se dejaron en los recipientes adicionando solución H1/5 nueva, en este último tiempo se evaluó el porcentaje de recuperación por variedad después de un estrés por salinidad, la selección de las variedades tolerantes y sensibles se realizó mediante la determinación de diferentes parámetros de crecimiento, bioquímicos y fisiológicos. En la figura 2.1 se presenta el diseño del experimento para cumplir el objetivo

uno. Se tomaron 48 plantas por cada variedad, para el tiempo cero se cosecharon diez plántulas, se seccionaron en raíz, tallo y hoja, para los parámetros de crecimiento como la altura de la plántula, número de hojas, área radicular y foliar.

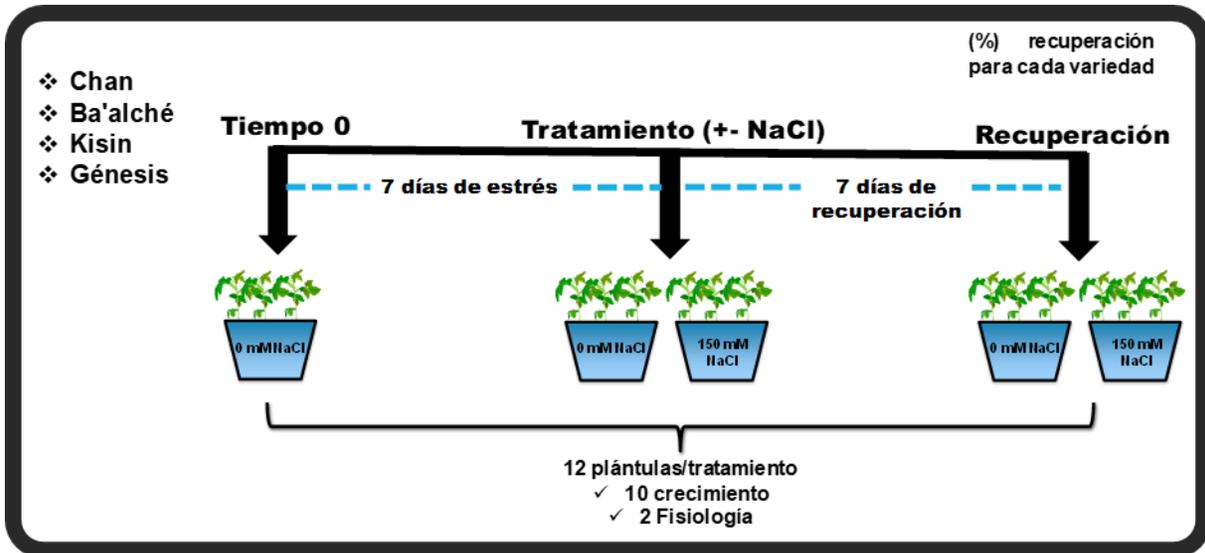


Figura 2.1 Diseño del experimento para el objetivo uno, se establecieron tres tiempos de cosecha o evaluación (tiempo cero, tratamiento y recuperación), el número de plántulas por evaluación fue de 12 y al final del experimento se determinó el porcentaje de recuperación entre todas las variedades.

A su vez, en este tiempo se tomaron otras dos plántulas para el potencial osmótico, con esto para el tiempo cero fueron un total de 12 plántulas que se evaluaron. Para el tiempo o periodo de estrés que fue de siete días se tomaron 12 plántulas para las condiciones testigo y 12 plántulas para la condición de estrés a 150 mM de NaCl, con ello se llevó la determinación de los diferentes parámetros ya mencionados con anterioridad. Por último para el periodo de recuperación después del estrés, todas las plántulas fueron lavadas y colocadas en solución nutritiva H1/5 por un periodo de siete días, se tomaron un total de 24 plántulas evaluadas como se mencionó en el tiempo de estrés.

Seguidamente, se procedió a seleccionar las plántulas más homogéneas en crecimiento que posteriormente serían evaluadas por variedad se prosiguió a escanear cada variedad con el fin de observar las características fenotípicas y morfológicas por cada variedad, los resultados se pueden observar en la figura 2.2, cabe mencionar que estas plántulas tenían una edad de 30 a 45 días después de ser germinadas y crecidas en condiciones de

hidroponía. Se puede observar ciertas diferencias marcadas entre cada variedad a simple vista, por ejemplo, la variedad Kisín tiene abundante follaje a comparación de las otras tres, también la variedad Chan muestra mayor longitud de la raíz al igual que un mayor grosor del tallo, comparada con las dos variedades naranjas. Con esto se tuvo el primer acercamiento para conocer de manera general las diferencias entre todas las variedades, que al momento de ponerlas en periodos de estrés y recuperación su comportamiento fue diferente.



Figura 2.2 Características morfológicas entre variedades de chile habanero, en las imágenes que se muestran plántulas de 45 días de ser crecidas.

2.2.4 Medición de la biomasa y parámetros de crecimiento

Al término de cada tiempo de evaluación, las plántulas fueron cosechadas y lavadas con agua estéril para remover el exceso de NaCl en las plántulas tratadas, así mismo se determinó el peso fresco (PF), peso seco (PS), así como diversos parámetros de crecimiento en raíces y hojas. A otro lote de plántulas se les cosecho y secciono en los diferentes órganos evaluados, posteriormente las muestras se guardaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análisis posteriores (niveles de transcritos, Pro y actividad enzimática).

Para el análisis de los parámetros de crecimiento se utilizó el programa WinRHIZO 2012b (Regent Instruments Canadá Inc.) y un escáner EPSON Perfection V700 photo (Seiko Epson Corporation). Se tomaron 5 plántulas por variedad, estas fueron escaneadas y se evaluó el fenotipo entre las diferentes variedades a nivel de planta completa y de igual manera parámetros de crecimiento específicos: área foliar y radicular, altura de la planta y

el número de hojas por planta.

2.2.5 Potencial osmótico (Ψ_s)

El potencial osmótico fue medido a partir de 0.5 g de muestras de hojas y raíces de las diferentes variedades de chile habanero, estas muestras se colectaron en cada tiempo de evaluación. Las muestras fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y fueron guardadas a 5 °C en el laboratorio. Posteriormente las muestras fueron maceradas en un mortero, se colectó el líquido del tejido macerado utilizando discos de papel filtro y se determinó la presión osmótica utilizando un osmómetro de presión de vapor (VAPRO 5520, Wescor, Logan, Utah, USA) y las mediciones se realizaron en el laboratorio de fisiología vegetal a cargo del Dr. José Luis Andrade del CICY.

2.2.6 Cuantificación de sodio y potasio

En cada tiempo de cosecha las plántulas fueron seccionadas en raíces y hojas; ambos tejidos fueron pesados y secados durante 72 h en una estufa a 65 °C hasta tener peso constante; se pesó 0.25 g de la muestra, se colocaron en crisoles de porcelana y se llevaron a calcinar a 250 °C por una hora y a 500 °C por tres horas más. La determinación del contenido de K^+/Na^+ en hojas y raíces se realizó mediante la digestión ácida de los tejidos con 5 mL de HCl al 40 % sobre una placa de calentamiento, posteriormente se le adiciona un mL de HCl al 100 % y se afora a 25 mL de agua desionizada hasta su posterior lectura. Las concentraciones de los cationes se determinaron en un espectrofotómetro de absorción atómica modelo 2380 Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA).

2.2.7 Análisis estadístico

Los datos se evaluarán mediante ANOVAs de un solo factor o vía (Sigma plot, versión 12). Posteriormente se compararon las medias por cada condición de tratamiento, la comparación se realizó aplicando una prueba de rango múltiple de Tukey ($P < 0.05$).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Tolerancia y sensibilidad al NaCl entre cuatro variedades de chile habanero

Como parte del primer objetivo se evaluaron cuatro variedades de chile habanero sometidas a estrés por NaCl a una concentración de 150 mM, en los resultados se obtuvo que al final del experimento el porcentaje de recuperación por cada variedad fue como se muestran en el cuadro 2.1. Se puede observar que después de un periodo de siete días en presencia de 150 mM de NaCl las variedades que fueron más tolerantes fueron Chan, Kisín y Génesis. Por el contrario, la variedad que fue más sensible ante este estrés fue la variedad naranja que tiene por nombre Ba´alche, mostrando cerca del 60 % de recuperación. Con esto se obtuvo que las variedades de chile habanero que se evaluaron tienen un comportamiento similar (variedades rojas) y contrastantes (variedades naranjas), este tipo de comportamiento entre el mismo género ya ha sido probado en variedades de *Capsicum annum* por Aktas *et al.*, (2006) en donde evaluaron 102 genotipos de chile sometidas a salinidad.

Cuadro 2.1 Porcentaje de recuperación de las plántulas después de un estrés por NaCl.

Variedad	(%) Recuperación
Chan	100 ±0a
Kisín	100 ±0a
Génesis	91.67 ±9.62a
Ba´alche	58.34 ±9.62b

La medición fue hecha a los siete días después de un estrés por salinidad (150 mM NaCl). Los datos representan las medias y \pm desviación estándar (cuatro replicas biológicas con seis plántulas). Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.005$; Tukey).

Luego de un tratamiento con NaCl y el periodo de recuperación (siete días) de las plántulas, se pueden observar a simple vista las diferencias que existen entre variedades de chile habanero en lo que respecta a la sensibilidad ante el NaCl (figura 2.3). La

variedad Ba'alche fue la más afectada seguida de la variedad comercial Génesis, por el contrario, las variedades que muestran más tolerancia son la Chan y Kisín.



Figura 2.3 Diferencias morfológicas y sensibilidad a un estrés por NaCl (150 mM) en las diferentes variedades de chile habanero después de un periodo de recuperación (siete días), plántulas de 45 días de edad incubadas en solución H1/5.

PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

Como parte del objetivo uno, se tomaron las dos variedades que contrastaron en la tolerancia y sensibilidad a la salinidad y los resultados que se presentan a continuación son las comparaciones entre la variedad Chan y Ba'alche que fueron las que contrastaron en comportamiento. Sin embargo, todos los datos de todas las variedades se muestran en el anexo (cuadro A2 y A3), se evaluaron tanto la parte radicular así como la parte aérea en la mayoría de los parámetros medidos, se midió: biomasa (peso fresco y seco), área foliar y radicular, altura de las plántulas y número de hojas, esto se realizó al final del periodo de recuperación. En el cuadro 2.1 se muestran las 4 variedades evaluadas. Por lo tanto, a manera de resumen a continuación solo se muestran los resultados comparando las variedades que más contrastaron en su comportamiento a la salinidad, los cuales en los objetivos siguientes solo nos centramos en estas dos variedades, Chan (variedad roja) y Ba'alche (variedad naranja).

2.3.2 Biomasa

En lo que respecta a la determinación de biomasa este fue realizado tanto en raíces como en hojas y las mediciones se realizaron en los tres diferentes tiempos del experimento (inicio, tratamiento y 7 días). En la figura 2.4 se muestran los resultados de las dos variedades que resultaron contrastantes en lo que respecta a la tolerancia y sensibilidad a la salinidad, en esta figura se muestran los resultados de la biomasa en raíces y hojas. Cabe mencionar que la comparación estadística de medias se realizó por cada tiempo en el experimento, en lo que respecta a al peso fresco en raíces, se observa que en el inicio ambas variedades no presentaron diferencias estadísticas. Sin embargo, cuando estuvieron en presencia de sal (siete días de tratamiento) Ba'alche mostro diferencia significativa con respecto a Chan, en el periodo de recuperación ambas variedades tuvieron valores similares y claramente se observa que aquellas plantas que estuvieron en sal mostraron los valores más bajos con respecto al testigo.

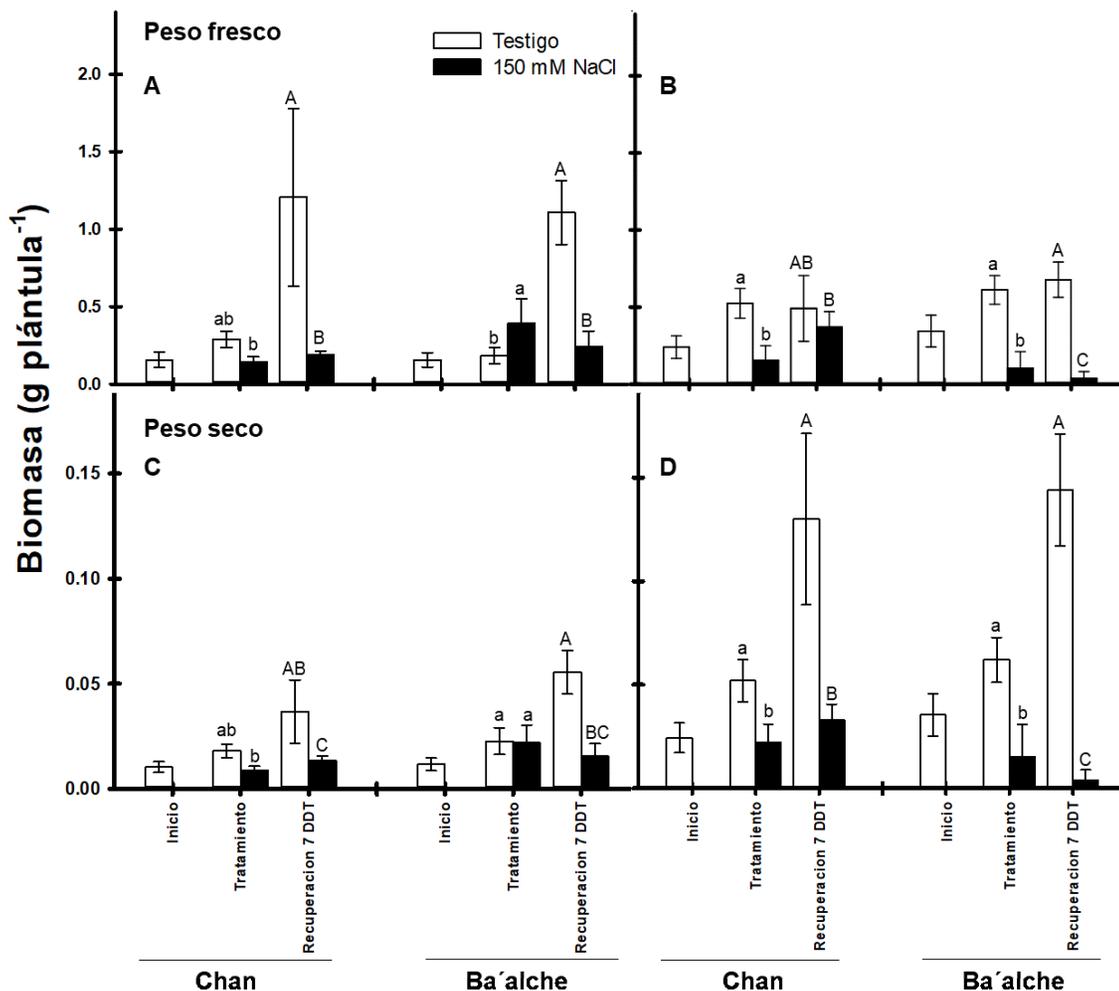


Figura 2.4 Peso fresco y seco de raíces (A y C) y hojas (B y D) de variedades de chile habanero (Chan y Ba'alche) en tres diferentes tiempos de evaluación, tiempo cero (inicio), tratamiento con salinidad (siete días) y el tiempo de recuperación sin NaCl (recuperación), las barras blancas representan las plantas testigo y las barras negras representan las plantas que fueron sometidas a NaCl. Los datos representan las medias y \pm desviación estándar (cuatro replicas biológicas con seis plántulas). Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.005$; Tukey).

En las hojas, en el inicio ambas variedades no tuvieron diferencia. En el tiempo de tratamiento de igual manera ambas variedades mostraron el mismo comportamiento ya que en aquellas plantas que están en sal, muestran diferencia con valores más bajos con respecto a las plantas testigo. Sin embargo, en el periodo de recuperación la variedad que mostró mayor biomasa fue Chan con respecto a la variedad Ba'alche esto en aquellas plantas que estuvieron en presencia de sal, esta diferencia se puede observar de igual manera en la figura 2.3 ya que Ba'alche muestra una mayor abscisión de hojas (uno de los primeros síntomas de toxicidad por salinidad). Con referencia al peso seco de igual manera la estadística se realizó por cada tiempo (inicio, tratamiento y recuperación) respecto al panel C se observó que en el inicio del experimento los resultados fueron similares a los mostrados en el peso fresco (A y B). Sin embargo, donde existieron cambios visibles y diferencia estadística fue en las hojas (panel D) de manera cualitativa se observa que la variedad Ba'alche fue la que mostro más daño después de un estrés por sal, dado que en el periodo de recuperación después de la salinidad fue donde existió menor cantidad de biomasa. Se puede puntualizar que tomando en cuenta el peso seco, la única variedad que tiende a ganar peso fue Chan post-estrés por salinidad, mientras que la variedad Ba'alche tiene una tendencia a disminuir su biomasa seca.

2.3.3 Área foliar y radicular

Con la ayuda del software winRHIZO se logró determinar el área foliar y radicular de todas las plántulas evaluadas, los resultados se muestran en el cuadro 2.2 Cuando analizó de manera estadística el área foliar en cada tiempo del experimento y por separado, se encontró que en el tiempo cero no existió diferencia significativa entre ambas variedades; por otro lado, cuando se evaluó el tiempo de tratamiento, las plantas testigo mostraron

valores similares en ambas variedades. Sin embargo, en presencia de sal, ambas variedades fueron afectadas por la salinidad sin presentar diferencia significativa. Así mismo, durante el tiempo de recuperación es donde se pudo apreciar el daño causado por el tipo de estrés en cuestión, las plántulas que no estuvieron en presencia de salinidad fueron las que tuvieron mayor área foliar en los tres tiempos de evaluación, mostrando valores alrededor de 92.85 y 73.54 cm² para Chan y Ba'alche respectivamente. Ahora basándonos en aquellas plantas que estuvieron estrés previamente, aquella variedad que mostro menor daño fue Chan con 18.15 cm² (valor similar a las plantas testigo en el tiempo cero). La variedad Ba'alche fue aquella que mostro menor área foliar, presentando 3.65 cm², mostrando una diferencia significativa comparada con las plantas testigo y con la variedad Chan.

Cuadro 2.2 Efecto del estrés salino sobre parámetros de crecimiento en la parte radicular y aérea de diferentes variedades de chile habanero.

Cultivar	Condición o tratamiento	Área (cm ²)		Altura /planta (cm)	# hojas /planta
		Foliar	Radicular		
Chan	Testigo t0 (-NaCl)	13.85 (3.40)	14.90 (4.08)	5.74 (0.40)	7.67 (0.58)
	Testigo (-NaCl) (7d)	34.50 (4.70)	20.79 (3.62) ^{ab}	10.06 (5.45)	10.0 (1.73) ^a
	+ NaCl (7d)	9.196 (2.98)*	12.70 (0.86) ^b	5.81 (0.04)	5.0 (2.65) ^b
	Testigo (-NaCl) (R)	92.85 (28.49) ^a	42.15 (15.04) ^{AB}	9.22 (0.63) ^a	13.67 (1.16)
	+ NaCl (R)	18.15 (1.44) ^b	18.09 (0.90) ^c	7.33 (0.69) ^b	11.0 (1.0)
Ba'alche	Testigo t0 (-NaCl)	22.27 (5.73)	15.56 (3.03)	7.84 (1.22)	9.67 (0.58)
	Testigo (-NaCl) (7d)	41.92 (4.93)	24.29 (4.15) ^{ab}	8.10 (0.20)	10.33 (1.16) ^a
	+ NaCl (7d)	10.15 (4.17)*	29.40 (8.60) ^a	6.76 (0.84)	1.67 (1.53) ^b
	Testigo (-NaCl) (R)	73.54 (7.40) ^a	46.47 (7.78) ^A	9.69 (0.51) ^a	13.33 (1.16)
	+ NaCl (R)	3.650 (2.43) ^c	21.43 (0.77) ^{BC}	8.54 (0.67) ^{ab}	4.0 (3.61)*

• 7d (7 días de tratamiento)
• R (recuperación)

* (P<0.05; prueba de Tukey).

Seguidamente se analizó el área radicular y los resultados de igual manera se muestran en la cuadro 2.2, al analizar los datos en el tiempo cero se obtuvo que las plantas presentan valores similares y sin diferencia entre ellas, así mismo, en el tiempo de tratamiento se observó algo muy particular y nos podría sugerir algún mecanismo de tolerancia por parte de la variedad Chan, ya que las plantas que estuvieron en tratamiento fueron las que presentaron la menor área radicular en todos los tiempos de evaluación, este fue 12.70 cm², por el contrario la variedad Ba'alche tuvo un crecimiento en el área y el valor que presento fue similar a las plantas testigo con 29.40 cm², entonces esto nos pudiera sugerir que la variedad Chan detiene su crecimiento para tratar de sobrellevar el

estrés mientras que la variedad Ba'alche tiende a desarrollar más área radicular para tratar de cubrir una mayor área de absorción; respecto al tiempo de recuperación, se obtuvo que ambas variedades en las plantas testigo presentaron valores similares al igual que na mayor área de este órgano, sin embargo, en las plantas que estuvieron previamente con NaCl, Chan fue la que presento los valores más bajos con 18.09 cm² por otro lado Ba'alche presento un aumento ligero de 21.43 cm² con respecto a Chan, sin embargo no tuvo diferencia significativa.

2.3.4 Altura de las plantas

De igual forma, con la utilización del software winRHIZO se determinó la altura de las plántulas de ambas variedades de chile habanero y los resultados se muestran en el cuadro 2.2 Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa estadístico mencionado en los materiales y métodos, las comparaciones se realizaron por cada tiempo, en el tiempo cero los datos obtenidos confirman que la variedad que presenta más altura es la Ba'alche mientras que la variedad más pequeña fue Chan, posteriormente al someter las plántulas a un estrés por NaCl y sin él (testigo), se obtuvo que no existió significancia en ambas variedades en este tiempo puesto que tanto las plantas testigo como las que estuvieron en presencia de 150 mM de NaCl mostraron valores semejantes, al evaluar el tiempo de recuperación se logró observar que las plantas de la variedad Chan que estuvieron previamente tratadas con NaCl disminuyo su altura mostrando diferencia significativa con respecto a las testigo. Cabe mencionar que se puede observar que las plántulas que estuvieron en presencia de NaCl y posteriormente solo en solución H1/5 mostraron tendencia para aumentar su altura o mantuvieron su altura como es el caso de Ba'alche.

2.3.5 Numero de hojas

Después del tratamiento con NaCl y el periodo de recuperación, se cuantificó el número de hojas por plántula y posteriormente se realizó el análisis estadístico correspondiente, así como la comparación de medias, en este parámetro se lograron apreciar marcadas diferencias en la sensibilidad o tolerancia entre ambas variedades evaluadas. Las comparaciones estadísticas se realizaron por cada tiempo como en los anteriores parámetros evaluados, en el tiempo cero o inicio tanto Chan como Ba'alche partieron de un numero de hojas similares de entre siete a nueve hojas por plántula. Para el tiempo de

tratamiento se pudo ver que aquellas plantas que estuvieron sometidas a la sal fueron las que mostraron diferencia significativa, por lo tanto, un menor contenido de hojas debido a una mayor abscisión de hojas (uno de los primeros síntomas ante un estrés por salinidad); durante el periodo de recuperación aquella variedad que mostro diferencia significativa fue Ba'alche, este dato podría relacionarse con el área foliar antes medida, donde se pudo observar que esta variedad es la que presento más daño y no tuvo una recuperación ante un estrés por NaCl.

2.3.6 Potencial osmótico u osmolaridad en raíces y hojas

Como parte de toda la caracterización que se realizó en el objetivo uno, con el material cosechado en los diferentes tiempos, se logró medir la osmolaridad en raíces y hojas en los tres diferentes tiempos del experimento. Esto se realizó en ambas variedades de chile habanero evaluadas, los resultados se muestran en la figura 2.3. En el órgano de la raíz, tanto en el tiempo cero como en el tiempo de tratamiento no existió diferencia significativa entre las dos variedades. Se puede observar que ambas presentan valores muy similares, alrededor de 180 hasta los 250 mmoles en este órgano; por último, en el tiempo de recuperación se puede observar que aquellas plantas que estuvieron en presencia de sal con anterioridad presentaron un aumento en la cantidad de osmolitos totales, esto con respecto a las plantas testigo. Por otro lado, en los brotes de igual manera se midieron las cantidades de osmolitos totales en los tiempos mencionados anteriormente.

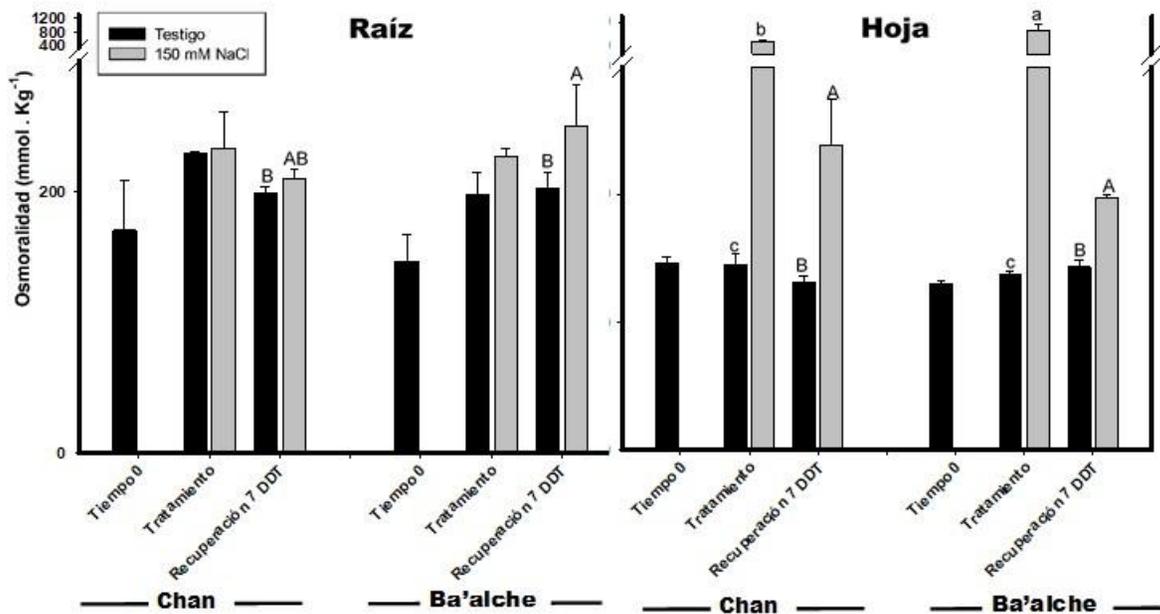


Figura 2.3 Osmolaridad en raíces y hojas de chile habanero en diferentes tiempos del experimento, las barras blancas representan raíces sin NaCl y barras negras representan raíces durante siete días con NaCl y durante un periodo de recuperación sin sal ($P < 0.05$; prueba de Tukey).

En resumen se observa que en las plantas testigo de todos los tiempos evaluados, las concentraciones fueron las mismas y no se encontró diferencia significativa, sin embargo cuando se analizaron las plantas que estuvieron en presencia de NaCl y un periodo sin este compuesto (recuperación), se obtuvo que las concentraciones más altas en el tiempo de tratamiento con NaCl, siendo Ba'alche la que logro acumular más osmolitos aunque Chan parece ser que tiene un mayor tiempo de acumulación para tratar de sobreponerse al estrés que estuvo con anterioridad ya que en el periodo de recuperación se observa un ligero aumento pero que no tiene diferencia con Ba'alche; cabe mencionar que en el periodo de recuperación se observa una disminución de la osmolaridad y esto podría estar dado como parte del ajuste osmótico de la plantas en estrés y esto está ampliamente documentado que después de un periodo de estrés las plantas degradan compuestos implicados en el ajuste osmótico para ser utilizados como fuente de energía para procesos de desarrollo o formación de nuevos órganos como las hojas.

2.3.7 Contenido de K⁺ y Na⁺

Por medio del equipo de absorción atómica se pudo determinar las concentraciones de estos iones tanto en raíces como en hojas, los resultados se muestran en la figura 2.4, esto como parte de la búsqueda de parámetros que ayuden a caracterizar y conocer la diferencia entre variedades y el grado de tolerancia entre las variedades, en cuanto a la capacidad que muestren de retener más K⁺ e impedir la entrada de Na⁺ como parte de los mecanismos iónicos de tolerancia.

2.3.7.1 Potasio

Al cuantificar la concentración de este ion en raíces, se observa que en las plantas testigo en los tres tiempos de evaluación los contenidos de este ion estuvieron entre 1.9 y 3.1 mg.g⁻¹ de PS, mostrando patrones de comportamiento similar, de igual manera se observó que aquellas plantas que estuvieron en estrés y durante el periodo de recuperación ambas variedades tuvieron comportamientos similares, se aprecia que los contenidos de este ion siempre se encontraron en concentraciones menores en las plantas que estuvieron en tratamiento.

En el órgano de la hoja se observaron los mayores contenidos de este ion en la variedad roja Chan, en el tiempo cero mostro una mayor acumulación de este nutriente con aproximadamente 4 mg.g⁻¹ de PS comparada con Ba'alche que tuvo valores aproximados a 3.1 mg.g⁻¹ de PS; por otro lado, al evaluar las plantas en periodo de tratamiento se tuvo como resultado que la variedad Chan fue la que tuvo mayor contenido de K⁺ en aquellas plantas testigo, seguida de las plantas con Na⁺ y las plantas testigo de Ba'alche, aquí se pudo notar que de nueva cuenta la parte aérea de esta variedad fue la más dañada ya que presento el menor contenido de este ion de todos los tiempos evaluados con un promedio de 0.5 a 0.7 mg.g⁻¹ de PS. Para el tiempo de recuperación, como se mencionó anteriormente Chan fue la que tuvo mayores contenidos en este tiempo en las plantas testigo, en las plantas que fueron tratadas con anterioridad los valores fueron los mismos para ambas variedades. Dado que este ion juega un papel fundamental como nutriente esencial, fue importante conocer los contenidos bajo diferentes escenarios, este fue el principal objetivo para evaluar este ion. En resumen, de nueva cuenta la variedad roja fue aquella que tuvo contenidos favorables comparados con la naranja.

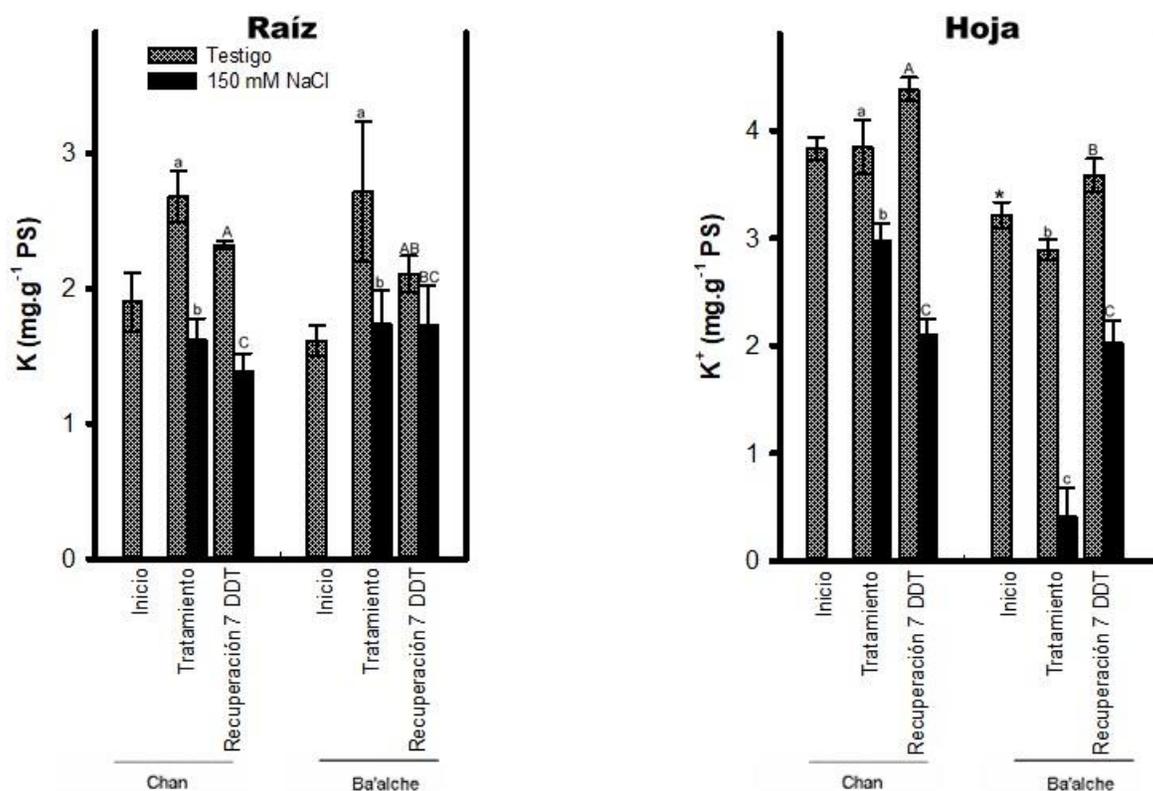


Figura 2.4 Contenido de K^+ en raíces y hojas de diferentes variedades de Chile habanero en diferentes tiempos del experimento, las barras blancas representan raíces sin NaCl y barras negras representan raíces durante siete días con NaCl y durante un periodo de recuperación sin sal ($P < 0.05$; prueba de Tukey).

2.3.7.2 Sodio

Otro ion evaluado fue Na^+ y este se cuantificó tanto en raíces como en hojas en los diferentes tiempos o condiciones de tratamiento, los resultados se muestran en la figura 2.5, esto se realizó con el fin de determinar qué variedad es capaz de impedir la entrada de este ion, re direccionarlo a la parte aérea o compartimentarlo en vacuola, por lo tanto identificar qué mecanismos ayudan a tolerar este tipo de estrés, en contexto y analizando la raíz, se determinó que en las plantas testigo de las tres evaluaciones, los contenidos de Na^+ siempre fueron por debajo de 0.3 mg.g^{-1} de PS, esto podría deberse a que la solución nutritiva aporta una pequeña concentración de este ion, cabe mencionar que de manera general las plantas que fueron tratadas con sal o en periodo de recuperación, la raíz es el órgano que presenta menor contenido de Na^+ comparado con los contenidos en hoja,

donde en periodo de estrés alcanza hasta el doble de contenido que en raíces, en la raíz Ba'alche fue la que mostro la mayor cantidad de este ion en periodo de estrés, mientras que Chan tuvo menor cantidad.

En hojas, la variedad Chan mostró cantidades aproximadas a 2.0 mg. g⁻¹ de PS, pero en periodo de recuperación los contenidos de este ion aumentaron hasta cerca de 2.2 mg. g⁻¹ de PS, por el contrario, en la variedad Ba'alche en estrés se determinó el menor contenido, esto podría estar dado puesto que esta variedad fue la que tuvo mayor abscisión de hojas y esto se observó anteriormente en el cuadro 2.2 Mientras que en periodo de recuperación los contenidos fueron similares (alrededor de 2.5 mg.g⁻¹ de PS) y sin diferencia significativa cuando se les aplico un análisis de varianza.

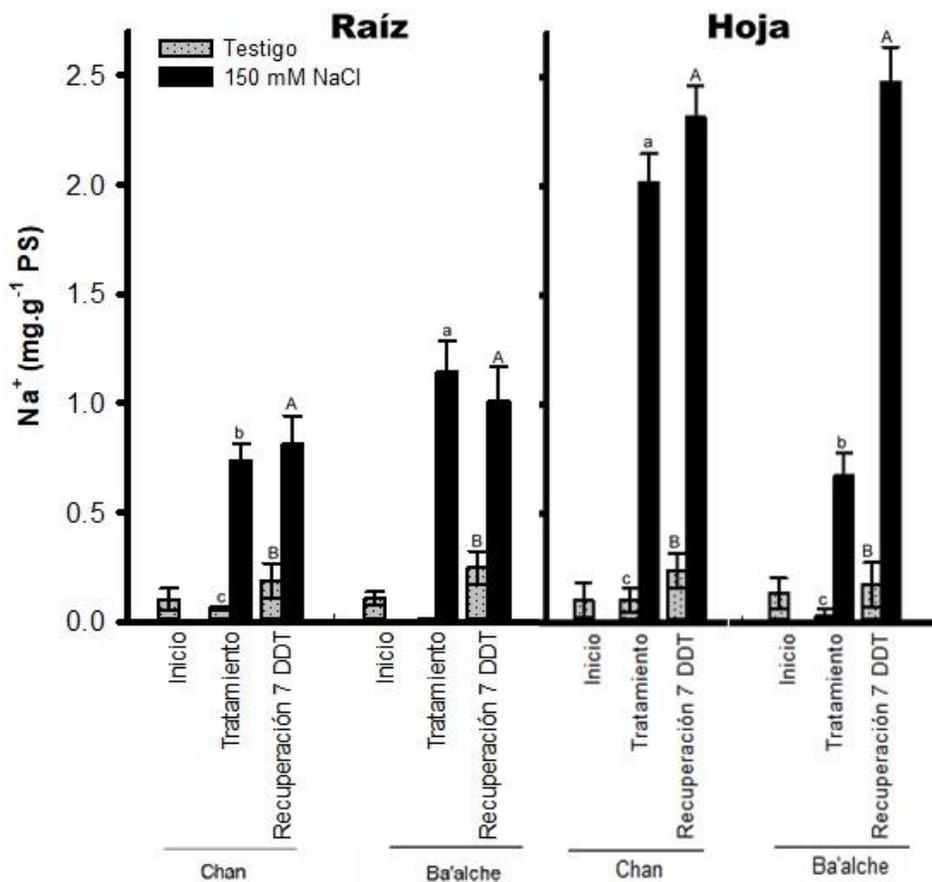


Figura 2.5 Contenido de Na⁺ en raíces y hojas de diferentes variedades de chile habanero en diferentes tiempos del experimento, las barras blancas representan raíces sin NaCl y barras negras representan raíces durante siete días con NaCl y durante un periodo de recuperación sin sal (P<0.05; prueba de Tukey).

2.4 DISCUSION

La mayoría de todas las plantas cultivables en el mundo sirven como alimento para la población mundial, en su mayoría son plantas glicofitas que son las más sensibles cuando están en presencia de altas concentraciones de sal en el suelo, principalmente por NaCl; de acuerdo a muchos estudios este compuesto es el principal factor abiótico que limita el crecimiento, rendimiento y calidad de los cultivos. Por otro lado, los chiles (*Capsicum* ssp.) son uno de los principales cultivos hortícolas y de acuerdo a muchos reportes no se ven exentos a padecer toxicidad por salinidad a lo largo de su ciclo vegetativo (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2012). En este estudio se obtuvieron diferencias entre la tolerancia y sensibilidad a la salinidad en las diferentes variedades evaluadas de chile habanero (cuadro 2.1 y figura 2.3) y para estudios posteriores se seleccionaron dos variedades de chile habanero como modelo de estudio y en este trabajo se demostró que las más contrastantes ante este estrés fueron Mayan Chan y Mayan Ba'alche a una concentración de 150 mM de NaCl, similar a reportes previos en *Capsicum* (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014b), reportan que diferentes genotipos de chile fueron incubados en una solución nutritiva con la adición de 150 mM de NaCl y sin este compuesto por un periodo de siete días de tratamiento, en el estudio los autores concluyen que la parte aérea fue la más afectada a esta concentración de NaCl, estos resultados concuerdan nuestros estudios puesto que en la figura 2.3 la parte aérea fue la más dañada siendo la variedad Ba'alche la que mostro mayor abscisión de hojas y menor área en las hojas a comparación de la variedad Chan que mostró mejor comportamiento.

Estos resultados sugieren que a una concentración de 150 mM de NaCl es la más toxica para la mayoría de las especies de chile, siendo esta concentración la más empleada para el estudio de la salinidad y ha sido empleada para la mayoría de las plantas glicofitas *A. thaliana*, *S. lycopersicum* y *S. tuberosum* (Apse *et al.*, 1999; Rodríguez-Rosales *et al.*, 2008; Jaarsma *et al.*, 2013). De manera similar a previos reportes realizados por Aktas *et al.* (2006) en plántulas de *C. annuum*, concluyen que a una concentración de 150 mM de NaCl es donde se observó un mayor impacto negativo sobre el crecimiento en plantas que presentaron tolerancia y sensibilidad a un estrés por sal.

Como se mencionó con anterioridad para estudios posteriores, se tomaron las dos variedades que mostraron comportamiento contrastante ante un estrés por sal, estas variedades fueron Chan y Ba'alche, cabe mencionar que ambas variedades mostraron

daño al estar en presencia de NaCl; sin embargo, la variedad Chan fue la menos afectada en cuanto a la cantidad de biomasa en la parte aérea, área foliar y número de hojas (figura 2.4 y cuadro 2.2), incluso en el porcentaje de sobrevivencia (cuadro 2.1) la variedad Baálche presentó 58.34 % con respecto a la Chan que tuvo 100 % de sobrevivencia. Por lo tanto, estos resultados nos sugieren la posible existencia de mecanismos de tolerancia intrínsecos en la variedad Chan que le permiten sobre llevar el efecto tóxico que causa la salinidad en donde posiblemente Pro podría jugar un papel importante basándonos en lo reportado por Bojórquez-Quintal *et al.* (2014b) donde la Pro tuvo un mayor contenido en la variedad tolerante. De manera general, a pesar de que los chiles tienen una importancia en la economía de México, se tienen pocos estudios o son casi nulos sobre el efecto de la salinidad en este cultivo.

CAPÍTULO III

EFFECTO DEL ESTRÉS POR NaCl SOBRE EL METABOLISMO DE LA PROLINA EN DOS VARIEDADES DE CHILE HABANERO

3.1 INTRODUCCIÓN

Los suelos salinos constituyen uno de los mayores ambientes estresantes afectando de manera importante la producción de los cultivos. Globalmente, cerca de 950 millones de hectáreas de suelos arables son afectados por la salinidad, al igual que aproximadamente 250 millones de hectáreas de los suelos cultivables (Ruan *et al.*, 2010). El resultado se ve reflejado en una pérdida de ingresos anuales por \$27.3 billones (Qadir, 2014). Por el contrario de otros tipos de estrés “drástico” tales como la sequía o la inundación, el impacto de la salinidad tiene un efecto negativo mucho mayor, el cual es menos evidente. Combinado con una mayor tasa de urbanización y el uso de la tierra para la producción primaria de fuentes no comestibles (ejemplo, fibras y biocombustibles) se espera que la producción agrícola sea forzada aún más en áreas marginales no aptas para cultivos modernos o con condiciones extremas (Shabala, 2013). En consecuencia, para lograr el reto de alimentar a cerca de 9.3 billones de personas para el año 2050 se requiere de avances en el mejoramiento genético y caracterizar cultivos tolerantes, en este caso, a la salinidad.

Los efectos de la salinidad en plantas incluyen efectos primarios como el estrés osmótico, efectos tóxicos por iones de Na⁺ y por último un estrés adicional que es consecuencia de los antes mencionados, el estrés oxidativo (Flowers, 2004; Munns y Tester, 2008; Shabala, 2013). El estrés osmótico es proporcional a la concentración externa de sal en la solución, usualmente con presiones osmóticas encima de 1 MPa. El efecto iónico por Na⁺ es el resultado de un aumento en la concentración de este ion en el citoplasma de la célula vegetal. Por último, el desarrollo de las células vegetales se ve afectado por el estrés oxidativo producido por la salinidad en la mayoría de las plantas (Munns y Tester, 2008).

El estrés por salinidad causa daños en el desarrollo de las plantas al afectar de manera negativa a una serie de procesos bioquímicos y fisiológicos tales como la fotosíntesis, metabolismo antioxidante, homeostasis en los nutrientes minerales, acumulación de

osmolitos y la señalización hormonal (Misra y Gupta, 2005, Khan *et al.*, 2012).

Correspondientemente, las plantas han evolucionado de manera compleja mecanismos fisiológicos y moleculares involucrados para soportar y defenderse por sí mismas de los entornos adversos a los que puedan estar expuestas (Yamaguchi-Shinozaki y Shinoaki, 2006). Una de las más comunes respuestas de las plantas a diferentes tipos de estrés abiótico, es la acumulación de osmolitos celulares que han sido ampliamente identificados en muchas especies de plantas.

Entre muchos osmolitos, la Pro es el osmolito que más se acumula en plantas bajo condiciones de estrés, el cual ha sido es objeto de estudio en gran cantidad. El papel de la Pro y su metabolismo bajo condiciones estresantes han recibido una considerable atención en diversas plantas y ahora es generalmente aceptado que la Pro juega un papel multifuncional. Además de su funcionamiento como osmolito, se ha visto que contribuye como depurador de ROS, estabilizando estructuras subcelulares, modulando la homeostasis redox celular, funcionando como abastecedor o donador de energía y funcionando como molécula señal para interactuar con otras vías metabólicas bajo condiciones estresantes (Kavi-Kishor *et al.*, 2005; Verbruggen y Hermans, 2008; Szabados y Savouré, 2010; Sharma *et al.*, 2011). Por lo que ha sido de gran importancia estudiar este osmolito con el fin de comprender su regulación a nivel genético, así como su metabolismo, para generar plantas que mantengan una mayor biosíntesis de este aminoácido para favorecer su acumulación y por lo tanto para poder mejorar la resistencia a un tipo de estrés.

En plantas superiores, existen dos vías involucradas en la biosíntesis de Pro: la vía del glutamato (Glu) y la Ornitina (Orn) (Hu *et al.*, 1992; Roosens *et al.*, 1998). La vía del Glu normalmente se lleva a cabo en el citosol y cloroplastos. El Glu es reducido a glutamato-semialdehído (GSA) por la Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS) y de manera espontánea es convertida a Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C). La P5C es también reducida a prolina y la reacción es llevada a cabo por Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR). Por otro lado, en la vía de la Orn se lleva a cabo en la mitocondria. La Orn es transaminada para dar lugar a P5C y la enzima encargada de dicha reacción es la Ornitina- δ -aminotransferasa (δ -OAT), P5C es transportada hacia el citosol y convertida a Pro por la P5CR. La vía del Glu generalmente ocurre bajo condiciones de estrés, mientras que la ruta de la Orn está mayormente involucrada en el desarrollo de plántulas

(Armengaud *et al.*, 2004). Así mismo, la degradación de Pro toma lugar en la mitocondria a través de la acción secuencial de la Pro deshidrogenasa (PDH) y la Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (P5CDH), que producen P5C y Glu respectivamente. El aumento en la síntesis y una disminución en la degradación puede suponer que la acumulación de la Pro bajo condiciones de estrés puede tener grandes beneficios para las plantas (Chaitanya *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2011). Así mismo, la manipulación genética de las enzimas claves en la ruta de biosíntesis ha dado lugar a importantes aportaciones respecto al aumento en la tolerancia a diferentes tipos de estrés y de igual manera al apagar la ruta de degradación de este osmolito se han observado resultados positivos para mejorar la acumulación, esto se ha visto en la planta modelo de *Arabidopsis thaliana*, tabaco y otro gran número de plantas (Ribarits *et al.*, 2007; Parida *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2011).

Por lo tanto, nuestro objetivo en esta parte del trabajo fue evaluar el efecto de estrés por NaCl sobre el metabolismo de prolina (transcritos, actividad de las enzimas y el contenido de Pro).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal

Se utilizaron plántulas de chile habanero de las variedades Mayan Chan y Mayan Ba'alche, las cuales se obtuvieron a partir de semillas provenientes del Centro de Investigación Científica de Yucatán.

3.2.2 Germinación y condiciones de crecimiento

Se siguió el protocolo descrito en el apartado 2.2.3 del capítulo II.

3.2.3 Obtención y clonación de los genes *P5CS*, *P5CR* y *PDH* (metabolismo de la prolina)

Para la obtención de las secuencias de los genes involucrados en el metabolismo de la

Pro (*P5CS*, *P5CR* y *PDH*), se llevó a cabo la búsqueda de estos genes en tres diferentes bases de datos, Solgenomics (<https://solgenomics.net/>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y Pepper genome (<http://peppergenome.snu.ac.kr/>). Como criterio de selección se utilizaron únicamente secuencias reportadas para estos genes en la familia de las solanáceas. Para tal propósito se empleó la herramienta online BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Para la obtención de las secuencias correspondientes a estos genes, se utilizaron como secuencias de referencia a *P5CS* (CA06g06110), *P5CR* (Capana02g001203) y *PDH* (FJ911549) de *Capsicum annuum*.

Para la clonación del ADNc de las secuencias de los genes involucrados en el metabolismo de la Pro, se diseñaron cebadores que permitieron la amplificación de un determinado segmento de cada uno de estos genes, con un tamaño de 517 pb, 323 pb y 874 pb para *P5CS*, *P5CR* y *PDH*, respectivamente. Estas secuencias fueron tomadas como base para el diseño de los cebadores.

El diseño de los cebadores se realizó empleando el programa Oligo 4 (Molecular Biology Insights, Inc. <http://oligo.net/>), el tamaño fijado fue de 20 nucleótidos y se tomaron como base las tres secuencias de *Capsicum annuum* *P5CS* (CA06g06110), *P5CR* (Capana02g001203) y *PDH* (FJ911549), cuyos genes codifican para las enzimas involucradas en el metabolismo de la Pro. Antes de comenzar con el diseño de los cebadores para *Capsicum chinense* Jacq., se realizó un alineamiento entre solanáceas para analizar y tomar los sitios conservados en las secuencias y de ahí partir para el diseño de los cebadores.

Con base a todo lo anterior se realizó el diseño buscando que estos tengan un porcentaje de GC (contenido de guanina y citosina) mayor o igual a 50%, que no formen estructuras de horquillas ni dímeros, de igual manera mediante una PCR *in silico* se corroboró que haya un correcto pegado de los cebadores, así como su temperatura de alineamiento para la PCR. Al tener todos los posibles candidatos, estos se mandaron a sintetizar en la empresa IDT (Integrated Dna Technologies). Las secuencias de los cebadores se muestran en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1 Posición de los cebadores para PCR sintetizados para *CcP5CS*, *CcP5CR* y *CcPDH*.

GEN	Posición de los cebadores	Tm (°C)	%GC
P5CS	F_359	62	55
	R_680	58	45
	R_856	62	55
P5CR	F_312	58	45
	R_615	58	45
	R_700	64	60
PDH	F_312	56	40
	F_501	60	50
	R_1355	56	40
	R_1465	60	50

*El tamaño de los cebadores fue de 20 pb.

Como molde se usó el ARN total extraído de las raíces de plántulas de chile habanero (0.1 gr) creciendo en condiciones de 150 mM de NaCl, anteriormente descritas en el capítulo II. El ARN total fue extraído usando la metodología de TRIZOL (Invitrogen) y tratado con Tubo DNAsa (2U/ μ l) (Invitrogen). La concentración y calidad del ARN fueron analizados con el NANODROP 2000 (Thermo SCIENTIFIC) y con un gel de agarosa al 1 % (p/v), respectivamente.

La primera hebra de ADNc fue sintetizada a partir del ARN total (1 μ g) mediante transcripción reversa usando el Kit de la enzima Superscrip III (Invitrogen) y siguiendo la metodología del proveedor. Posteriormente, se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para obtener los niveles de transcritos de *P5CS*, *P5CR* y *PDH* usando cebadores específicos sintetizados previamente.

La mezcla de reacción para *P5CS*, *P5CR* y *PDH* contenía 2.5 μ l del amortiguador de la reacción 10X; 1 μ l de dNTP's (10 mM); 2 μ l de MgCl₂ (50 mM); 2 μ l del cebador en sentido (10 mM); 2 μ l del cebador en anti sentido (10 mM); 0.2 μ l de la enzima Taq Platinum (5 U/ μ l) (Invitrogen); 1 μ l de ADNc. El programa de PCR fue el siguiente: para

P5CS, 95 °C por 1 min., 32 ciclos de 94 °C por 30 seg., 54 °C por 45 seg. y 72 °C por 1 min., 72 °C por 10 min; para *P5CR*, 95 °C por 1 min., 32 ciclos de 94 °C por 1 min., 53 °C por 1 min, y 72 °C por 1 min., 72 °C por 10 min; y para *PDH*, 95 °C por 2 min., 32 ciclos de 95 °C por 45 seg., 53.5 °C por 1 min. y 72 °C por 30 seg., 72 °C por 5 min y éste se desarrolló en un termociclador My Cyclor (BIO-RAD). Para visualizar los fragmentos amplificados, las muestras respectivas se fraccionaron en un gel de agarosa al 1% (p/v) en 30 ml de TAE 1X, teñido con bromuro de etidio.

Una vez que se identificaron en el gel las bandas que correspondían a los fragmentos esperados, se procedió a su extracción y purificación de acuerdo al protocolo que proporciona el proveedor del kit QIAEX II Agarosa Gel Extraction Protocol (*QIAGEN*). Para verificar la pureza de los fragmentos, una alícuota de cada uno se aplicó en un gel de 1% (p/v) de agarosa teñido con bromuro de etidio.

Se procedió a la ligación de éstos al plásmido pGEM-T Easy (Promega), siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor. La mezcla de reacción para los tres genes se realizó de la siguiente manera: 1µl del vector pGEM-T Easy; 3 µl del producto de ADNc de *CcP5CS*, *CcP5CR* y *PDH* purificados; 1 µl de la enzima T4 ligaza (3 U/µl) (Promega); 5 µl amortiguador 2X.

Para la verificación de la ligación se realizó una reacción de PCR para *P5CS*, *P5CR* y *PDH*. Las mezclas y las condiciones del PCR fueron las mismas que las utilizadas anteriormente.

Una vez comprobado que se obtenían únicamente las bandas deseadas de aproximadamente 517 pb, 323 pb y 874 pb para *P5CS*, *P5CR* y *PDH*, respectivamente, se procedió a su purificación mediante el kit QIAprep Spin (*QIAGEN*). Para confirmar las identidades, los ADNc insertados en el plásmido pGEM- T Easy, fueron secuenciados en ambos extremos por la compañía Macrogen, utilizando los cebadores universales SP6 y T7; así como también los cebadores específicos para *P5CS*, *P5CR* y *PDH*.

3.2.4 Evaluación de las variedades contrastantes a tiempos cortos (0, 24, 36 y 72hrs) y a tiempos largos (siete días) en presencia de NaCl

Para los tratamientos de estrés, las plántulas de las dos variedades se transfirieron a

contenedores de plástico y se les adicionó 400 mL de solución Hoagland modificada (Richard-Morland *et al.*, 2008) a 1/5 de su fuerza iónica (FI) conteniendo 150 mM de NaCl, pH 6.8, durante tiempos cortos (0, 24, 36 y 72 hrs) y tiempos largos (siete días). Las plantas testigo estuvieron únicamente en presencia de la solución Hoagland modificada (Richard-Morland *et al.*, 2008) a 1/5 de su FI, pH 6.8. Para llevar a cabo el análisis de la expresión diferencial, en cada tiempo las plantas fueron cosechadas en raíces y hojas (0.1 gr), posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

El experimento se muestra en la siguiente figura:

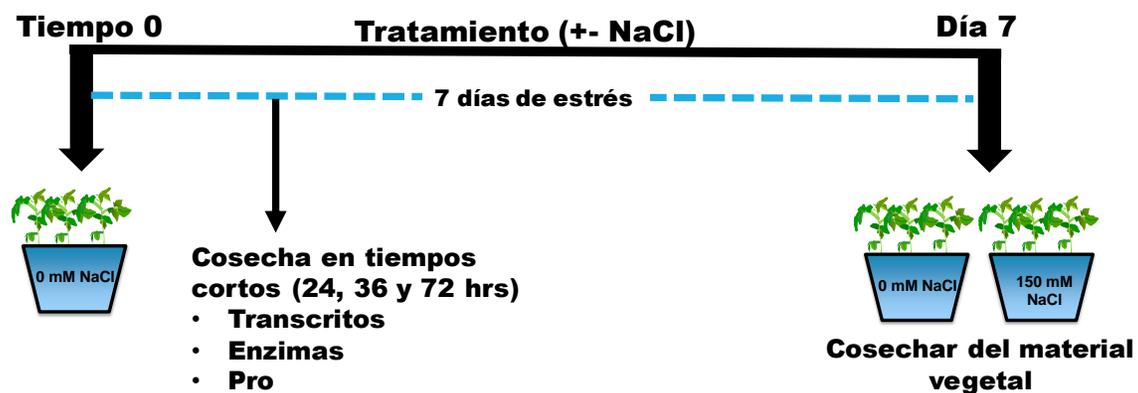


Figura 3.1. Diseño del experimento para el análisis del metabolismo de prolina en dos variedades (Mayan Chan y Mayan Ba'alche) de chile habanero en presencia de NaCl (150 mM).

3.2.5 Extracción de ARN total y síntesis de ADNc

Se utilizaron tejidos de raíz y hojas (0.1 gr) de plántulas de las diferentes variedades de chile habanero (*C. chinense* Jacq.), que se encontraban bajo las condiciones mencionadas en el apartado (3.2.4).

Para la extracción del ARN total de los diferentes tratamientos, se utilizó la metodología del TRIZOL, en la cual se tomó 0.1 gr de tejido de raíz pulverizado, se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se le añadió 1 ml del reactivo de TRIZOL (Invitrogen). Posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 12 000 g (10700 rpm) a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf y se le adicionó 200 µl de cloroformo, se agitó manual y vigorosamente y se incubó por 2-3 min a temperatura ambiente. Las

muestras se centrifugaron a 12 000 g por 15 min a 4 °C. A la fase acuosa se le adicionó 500 µl de isopropanol y las muestras se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Después de centrifugar a 12 000 g por 10 min a 4 °C, se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 7 500 g (8 500 rpm) por 5 min a 4 °C. La pastilla se dejó secar de 60 a 120 min. Se resuspendió el ARN total en 30-50 µl de agua con DEPC (dietilpirocarbonato) estéril. Para evitar posibles contaminaciones con ADN genómico, el ARN total fue tratado con Turbo DNAsa (2 U/ µl) (Invitrogen) a 37 °C por 1hr y la reacción de detuvo a 65 °C por 30 min.

Para la cuantificación las muestras de ARN de cada tratamiento, se leyeron a 260 nm en el equipo NANODROP 2000 (Thermo SCIENTIFIC). La integridad del ARN fue evaluada por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio.

Posteriormente, se procedió a realizar la síntesis de la primera cadena de ADNc mediante transcripción reversa. Cada reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl, el cual contenía 1 µg/µl de ARN, 1 µl de oligo dT (25µM) y 1 µl de dNTP'S (10 mM). La mezcla se homogenizó y incubó a 65 °C durante 5 min, colocándose posteriormente a 4 °C durante 3 min. Para la reacción se adicionó 4 µl del amortiguador 5X de la enzima Superscrip III (Invitrogen), 2µl de DTT (0.1M) y 1µl de ARNsa aout (400 U/µl) (Invitrogen); seguidamente se homogenizó y se incubó a 42 °C durante 5 min. Por último, a la mezcla se le adicionó 1µl de la enzima Superscrip III (Invitrogen) y se dejó reaccionar a 42 °C durante 50 min. Para detener la reacción, la mezcla fue incubada a 70 °C durante 15 min.

3.2.6 Análisis de los niveles de transcritos de *CcP5CS*, *CcP5CR* y *CcPDH* en las dos variedades contrastantes al estrés por NaCl

Una vez obtenida la primera cadena de ADNc se procedió a evaluar los niveles de transcritos de *CcP5CS*, *CcP5CR* y *CcPDH* que se encontraban bajo el tratamiento con 150 mM de NaCl, a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos sintetizados previamente, los cuales fueron diseñados con base a la secuencia de ADNc de *CcP5CS*, *CcP5CR* y *CcPDH*.

La secuencia de los cebadores para *CcP5CS* fue: F_359: 5' GTCAGCGGCTTCGATATAGG 3' y R_856: 5' ATACCCCTCTTCCCACTCT 3'. La

mezcla de reacción contenía 2.5 µl del amortiguador de la reacción 10X; 1 µl de dNTP (10 mM); 1 µl de MgCl₂ (50 mM); 2 µl del oligo F_359 (10 µM); 2 µl del oligo R_856 (10 µM); 1 µl de la enzima Taq. Platinum (5 U/µl) (Invitrogen); 1 µl de ADNc. Para *CcP5CR*, la secuencia de los cebadores fue: F_312: 5' CAGGTGGTTGAAGATAGTGA 3' y R_615: 5' GCATCAAACAGCTTCTCATC 3'. La mezcla de reacción se preparó con 2.5 µl del amortiguador de la reacción 10X; 1µl de dNTP's (10 mM); 1.5 µl de MgCl₂ (50 mM); 2 µl del cebador F_312 (10 mM); 2 µl del cebador R_615 (10 mM); 0.2 µl de la enzima Taq Platinum (5 U/µl) (Invitrogen); 1 µl de ADNc. El PCR se realizó según lo reportado por Rivero *et al.*, (2014) para *CcP5CS* y *CcP5CR*, las condiciones fueron las siguientes: 95 °C por 1 min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 54 °C por 45 seg y 53 °C por 1 min. para *P5CS* y *P5CR* respectivamente., 72 °C por 1 min, 72 °C por 10 min. Para *CcPDH*, la secuencia de los cebadores fue: F_501: 5' GTCGAACATGCCACGGAAAA 3' y R_1355: 5' ACTTGCTCACTTGAAATCCT 3'. La mezcla de reacción se preparó con 2.5 µl del amortiguador de la reacción 10X; 1 µl de dNTP's (10 mM); 1.5 µl de MgCl₂ (50 mM); 2 µl del cebador F_501 (10 mM); 2 µl del cebador R_1355 (10 mM); 0.2 µl de la enzima Taq Platinum (5 U/µl) (Invitrogen); 1 µl de ADNc. El PCR se llevó a cabo siguiendo lo reportado por Kubala *et al.* (2015), las condiciones fueron las siguiente: 95 °C por 2 min., 35 ciclos de 95 °C por 45 seg, 53.5 °C por 30 seg, 72 °C por 25 seg, 72 °C por 5 min. Todas las PCR's se desarrollaron en un termociclador My Cycler (BIO-RAD).

Para visualizar los posibles fragmentos amplificados por PCR, las muestras respectivas se fraccionaron en un gel de agarosa al 1 % en 50 ml de TAE 1 X, adicionado con 1.3 µl de bromuro de etidio. Como testigo de carga, se amplificó el gen de la tubulina, usando los cebadores obtenidos a partir de la secuencia reportada para *Capsicum annuum* (EF495257.1). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95 °C por 1.5 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg, 75 °C por 30 seg, 72 °C por 10 min.

3.2.7 Determinación del contenido de Pro en raíces y hojas

Para determinar el contenido de Pro se siguió la metodología descrita por Bates *et al.* (1973) modificada y el protocolo reportado por Abraham *et al.* (2010). El material vegetal (peso fresco) de raíz y hoja (0.1 gr) se maceró y se homogenizó con 1 mL de ácido sulfosalicílico (3%), posteriormente se colectó el extracto y se centrifugó a 14,600 x g (13,000 rpm) por 10 min. En un tubo nuevo se adicionaron 200 µL de ácido acético glacial,

200 μ L de ninhidrina ácida y 200 μ L del sobrenadante del extracto vegetal (mezcla de reacción), los cuales se incubaron a 96-100 °C por 60 min., al terminar la incubación los tubos se pusieron en hielo para detener la reacción. La extracción de la muestra se realizó adicionando 1 mL de tolueno a la mezcla de reacción, la cual se agitó vigorosamente por un tiempo de 20 seg y se esperó hasta la separación de las fases orgánica y acuosa. En una cubeta de cuarzo se colectó la fase orgánica que contenía al cromóforo y se prosiguió a realizar la lectura a una absorbancia a 520 nm. Se usó tolueno como blanco. La concentración de prolina se determinó a partir de una curva de concentración estándar y se calculó con base al peso fresco (usualmente expresado como microgramo por gramo o micromol por gramo de peso fresco, respectivamente) de donde se partió.

3.2.8 Extracción y cuantificación de proteínas totales

Las proteínas totales se extrajeron según lo reportado por Kumar (2008) y Wang *et al.* (2011), a partir de los tejidos vegetales reportados en el apartado 3.2.4. El tejido cosechado se maceró hasta obtener un polvo fino, en un mortero previamente congelado con nitrógeno líquido, al cual se le adicionó 1% (w/v) de PVPP (para evitar la fenolización del tejido). El polvo se recuperó en un vial de cristal colocado en hielo y se le adicionó amortiguador de extracción (2.5 ml/g de tejido fresco) que contenía: 50 mM de Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 5 mM de $MgCl_2$, 0.6 M de KCl, 10 mM β -mercaptoetanol. Posteriormente el homogenato o extracto vegetal se centrifugó a 12000 x g (10,700 rpm) durante 20 min, en una centrifuga refrigerada a 4 °C, esto para eliminar los restos celulares. Finalmente se colectó el sobrenadante, en el cual se encuentran las proteínas totales y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

La cuantificación de proteínas se realizó siguiendo la metodología reportada para el sistema Bio-Rad Protein Assay Kit, empleando como referencia una curva patrón de albumina de suero bobino, basado en el método de Bradford (1976). Este método permite relacionar la variación de la absorbancia a 595 nm de una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G-250, con la cantidad de proteínas presentes en una muestra. Los valores de absorbancia se midieron por espectrofotometría.

3.2.9 Actividad de las enzimas del metabolismo de Pro

La determinación de las actividades de las enzimas del metabolismo de Pro se realizó midiendo la actividad específica de cada enzima por medio de espectrofotometría siguiendo la metodología reportada por Parida *et al.* (2008), Wang *et al.* (2011) y Stines *et al.* (1999). Las enzimas evaluadas fueron: P5CS y PDH. Seguidamente se muestran las características de los amortiguadores de la mezcla para la reacción enzimática.

La actividad de P5CS fue determinada por el monitoreo del consumo de NADPH y la medición en el incremento de la absorbancia a $\lambda 340$ nm. Toda la reacción se realizó en un volumen final de 2 mL, la mezcla de reacción contenía 75 mM de Glu, 100 mM de Tris-HCl (pH 7.2), 20 mM de $MgCl_2$, 5 mM de ATP, 0.4 mM de NADPH y por último 500 μ L del extracto proteico. Seguidamente toda la mezcla fue incubada por un tiempo de 20 min a 37 °C a baño maría y luego de este se prosiguió a la medición de la absorbancia. La P5CS fue expresada como unidades por mg de proteína (una unidad es definida como un incremento en 0.001 A_{340} por min).

La actividad de PDH fue determinada por el monitoreo en la reducción de NAD^+ y la medición fue a una absorbancia de $\lambda 340$ nm. Toda la reacción se realizó en un volumen final de 2 mL, la mezcla de reacción contenía 100 mM amortiguador Carbonato-Bicarbonato de sodio (pH 10.3), 20 mM de L-Pro, 10 mM de NAD^+ y por último 500 μ L del extracto proteico. Seguidamente se midió la cinética por 5 min a una temperatura de 25 °C, las lecturas se tomaron cada 30 seg. PDH se expresó como una unidad por mg de proteína (una unidad es definida como la disminución en 0.001 A_{340} por min).

3.2.10 Análisis estadístico

Los datos se evaluarán mediante un análisis de varianza de una vía (Sigma plot, versión 12). Las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de rango múltiple de Tukey.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Establecimiento de los tratamientos en condiciones de hidroponía

Se establecieron las condiciones de hidroponía, tiempos de crecimiento y desarrollo, así como las condiciones para los tratamientos con NaCl. Después de 45 días las plántulas de chile habanero de las diferentes variedades, se sometieron a una concentración de 150 mM de NaCl para observar el comportamiento de sus transcritos a una condición de curva dosis-respuesta de este compuesto.

Como testigo se emplearon plántulas que estuvieron únicamente con solución nutritiva (testigo). La finalidad del experimento fue determinar qué concentración de NaCl es tóxica para cada variedad evaluada en condiciones de hidroponía. El tiempo de tratamiento con NaCl fue de 7 días. Al término de este tiempo las plántulas se cosecharon y se seccionaron en raíz, tallo y hojas (paquetes de 0.1 gr), se congelaron en nitrógeno líquido y reservaron a -80 °C hasta su utilización.

3.3.2 Evaluación de la especificidad de los cebadores sintetizados para el análisis de los niveles de transcritos de *CcP5CS*, *CcP5CR* y *CcPDH*

Una vez que se estableció el tratamiento con NaCl, se cosechó el material vegetal y se prosiguió a realizar la extracción de ARN total tanto de raíces como de hojas de las dos variedades de chile habanero. Se sintetizó la cadena ADNc por medio de RT-PCR y se almacenaron a -20 °C hasta su utilización. Antes de realizar los ensayos de expresión de transcritos con las muestras que estuvieron bajo el tratamiento con 150 mM de NaCl, se decidió realizar primero las pruebas necesarias con los cebadores sintetizados con el fin de evaluar su especificidad. Se utilizó ADNc de chile habanero de la variedad Seminis que fue donado por el grupo de trabajo de la Dra. Ileana Echevarría.

3.3.2.1 Especificidad de los cebadores diseñados para *CcP5CS*

En la figura 3.1 se muestra la prueba de especificidad de los cebadores que corresponden a *CcP5CS*, se puede observar que hubo una mayor especificidad utilizando los cebadores de la posición F_359 y R_856, se observa que con ambos juegos de cebadores se

amplifica el tamaño esperado, comprobando de esta manera que los cebadores diseñados a partir de *C. annum*, si tienen especificidad por *C. chinense*.

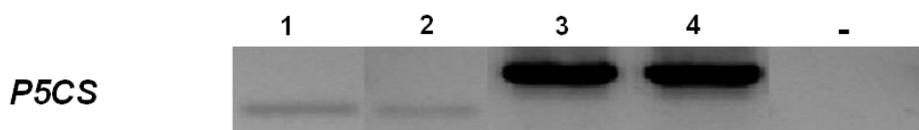


Figura 3.1 Prueba de especificidad de cebadores y niveles de transcritos para el gen *CcP5CS*. 1 y 2, transcritos utilizando los cebadores con las posiciones F_359 y R_680 (amplicón de 341 pb); 3 y 4, transcritos utilizando F_359 y R_856 (amplicón de 517 pb); (-), control negativo al cual no se le adicionó ADN; Como molde se utilizó ADNc de chile habanero de la variedad Seminis. El número de ciclos de la PCR fue de 40.

3.3.2.2 Especificidad de los cebadores diseñados para *CcP5CR*

Se procedió a realizar el ensayo de especificidad de los cebadores para amplificar al gen *CcP5CR*, se obtuvo que con ambos juegos de cebadores el nivel de transcritos fue similar, por lo que para futuros ensayos de PCR se pueden utilizar ambos juegos de cebadores diseñados a partir de *C. annum* (Capana02g001203). Los resultados se muestran en la figura 3.2

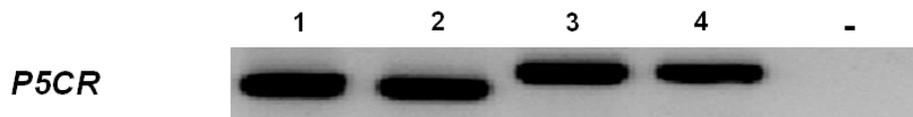


Figura 3.2 Prueba de especificidad de cebadores y niveles de transcritos para el gen *CcP5CR*. 1 y 2, juego de cebadores con las posiciones F_312 y R_615 (323 pb); 3 y 4, juego de cebadores con las posiciones F_312 y R_700 (408 pb); (-), corresponde al control negativo al cual no se le adiciono ADN. Se utilizó como molde ADNc de chile habanero variedad Seminis. El número de ciclos fue de 40.

3.2.2.3 Especificidad de los cebadores diseñados para *CcPDH*

Para evaluar la especificidad de los cebadores que corresponden a la *CcPDH*, en una primera prueba se realizó una PCR utilizando la temperatura de alineamiento, así como la concentración de $MgCl_2$ que anteriormente se habían evaluado *in silico*, sin embargo, no

se obtuvo el fragmento esperado en todos los cebadores evaluados, por lo que se prosiguió a realizar una curva con diferentes concentraciones de $MgCl_2$ [1.5, 2, 3 y 4 mM]. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.4; en donde se puede observar que hubo una correcta amplificación del fragmento esperado utilizando el juego de cebadores que corresponden a las posiciones F_501 y R_1355 (874 pb). Dicha amplificación se logró utilizando concentraciones de 3 y 4 mM de $MgCl_2$ respectivamente.

Los resultados de estos ensayos nos permitieron tener las condiciones de amplificación correctas para los posteriores análisis de expresión de estos genes en las plantas de las diferentes variedades de *Capsicum chinense* Jacq. sometidas a tratamientos de salinidad.

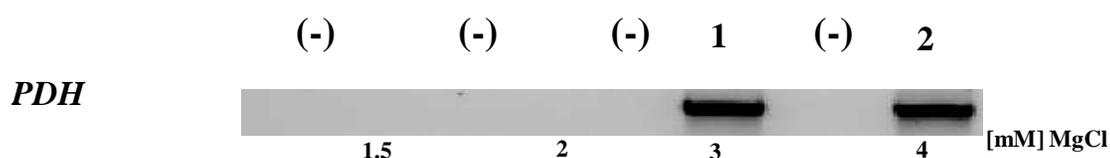


Figura 3.3 Curva de $MgCl_2$ y expresión de transcritos para el gen *CcPDH*. Para esta prueba se utilizaron los cebadores con posiciones F_501 y R_1355 con un tamaño esperado de 874 pb. 1, concentración de 3 mM de $MgCl_2$; 2, concentración de 4 mM de $MgCl_2$; (-) control negativo de cada concentración evaluada (sin ADN). Se utilizó como molde ADNc de chile habanero de la variedad Seminis. El número de ciclos fue de la PCR fue de 40.

3.3.3 Análisis de las secuencias deducidas de aminoácidos de P5CS, P5CR y PDH de *Capsicum chinense* Jacq.

Como resultado de la clonación se obtuvieron 10 clonas positivas para cada uno de los genes; de las cuales cinco fueron seleccionadas al azar para secuenciar. Todos los análisis que a continuación se presentan fueron realizados con estas cinco clonas seleccionadas. Para *P5CS* se tomaron las clonas 1, 3, 4, 6 y 9; para *P5CR* se tomaron a las clonas 2, 3, 4, 6 y 7 y finalmente para *PDH* se tomaron a las clonas 3, 5, 6, 7 y 8. Los resultados de la secuenciación para *CcP5CS* indicaron que las cinco clonas analizadas son idénticas, presentando una longitud de 517 pb y una secuencia deducida para la proteína de 172 aminoácidos. Los resultados se muestran en la figura 3.4.

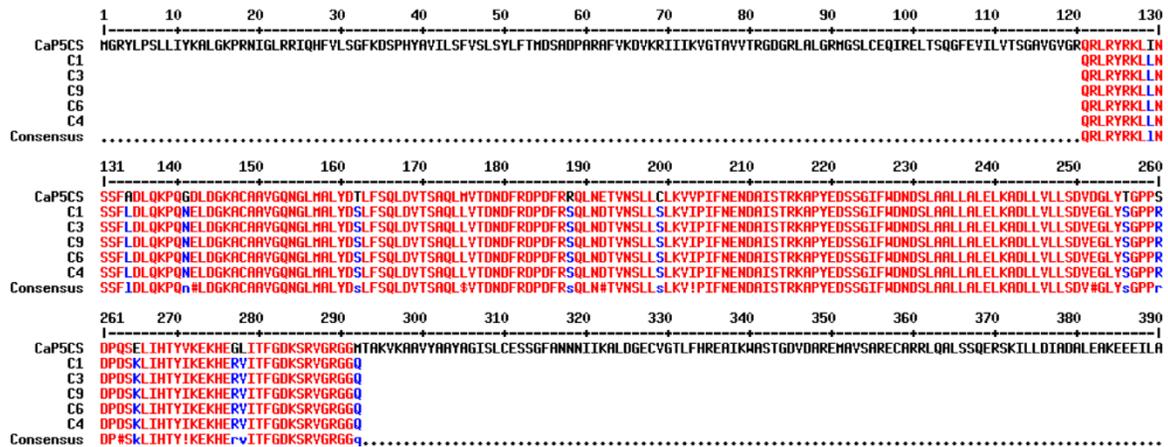


Figura 3.4 Alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos de las cinco clonas elegidas de CcP5CS. Como secuencia de referencia se tomó a las P5CS de *Capsicum annuum* (XP_016575520.1). El alineamiento se llevó a cabo utilizando el programa bioinformático Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

El análisis comparativo de la secuencia deducida de aminoácidos indica que la CcP5CS de Chile habanero es altamente similar a la Pirrolina-5-carboxilato sintetasa de la familia de las Solanaceas, incluyendo a *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotina attenuata*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum pennelli* y *Solanum tuberosum*. Este análisis de identidad reveló que CcP5CS tiene una identidad de 100% con una secuencia reportada para *Capsicum chinense*, CcP5CS, al igual que con la CaP5CS de *Capsicum annuum*; y un 98.83 % con CbP5CS de *Capsicum baccatum*. Con las restantes especies analizadas, presentó un porcentaje de identidad que va desde un 97 hasta un 96 %. En el cuadro 3.2 se muestran los resultados obtenidos a partir de este análisis de identidad.

Cuadro 3.2. Análisis de identidad de las clonas de P5CS de Chile habanero con sus homólogos en *Solanaceae*s. Como se observa en el cuadro, las clonas presentaron un alto grado de identidad con otros miembros de la familia de *Solanaceae*s, especialmente con los miembros del género *Capsicum*.

Nombre	Especie	Identidad (%)	Número de accesión
CcP5CS	<i>Capsicum chinense</i>	100	PHU09006.1

CaP5CS	<i>Capsicum annuum</i>	100	PHT74311.1
CbP5CS	<i>Capsicum baccatum</i>	98.83	PHT40300.1
StP5CS	<i>Solanum tuberosum</i>	97.66	XP_006355263.1
NtoP5CS	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	97.08	XP_009588946.1
NaP5CS	<i>Nicotiana attenuata</i>	97.08	XP_019254615.1
SpP5CS	<i>Solanum pennellii</i>	97.08	XP_015085127.1
NsP5CS	<i>Nicotiana glauca</i>	96.49	XP_009772171.1
SIP5CS	<i>Solanum lycopersicum</i>	96.49	XP_010324853.1

Al igual que con P5CS, los resultados obtenidos para *P5CR* indican que las cinco clonas analizadas son idénticas, con una longitud de 323 pb y una secuencia deducida para la proteína de 108 aminoácidos. En la figura 3.5 se muestran los resultados obtenidos.

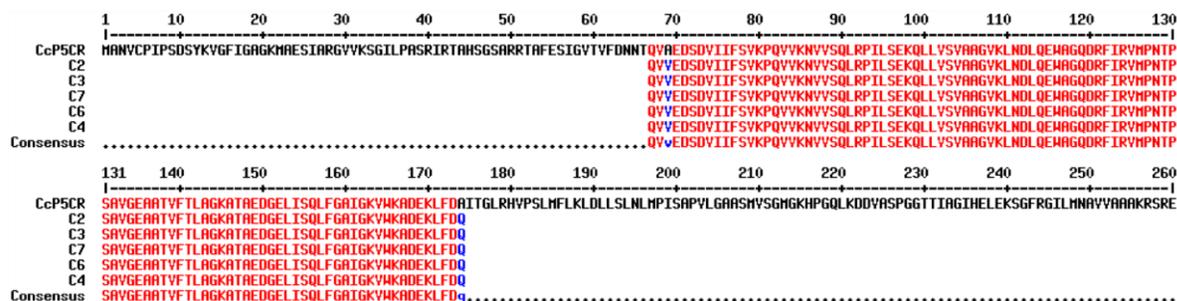


Figura 3.5 Alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos de las cinco clonas elegidas de CcP5CR. Como secuencia de referencia se tomó a las P5CR de *Capsicum annuum* (XP_016559219.1). El alineamiento se llevó a cabo utilizando el programa bioinformático Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

Los resultados del análisis de las secuencias deducidas de aminoácidos indicaron que la CcP5CR de Chile habanero es altamente similar a la Pirrolina-5-carboxilato reductasa de la familia de las Solanaceas, incluyendo a *Capsicum annuum*, *Capsicum chinense*,

Nicotiana sylvestris, *Nicotina attenuata*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum pennellii* y *Solanum tuberosum*. El análisis de identidad indicó que CcP5CS tiene una identidad de 99.07% con una secuencia reportada para *Capsicum chinense*, al igual que con *Capsicum annuum*. Con las restantes especies analizadas, presentó un porcentaje de identidad que va desde un 94 hasta un 90 %. En el cuadro 3.3 se muestran los resultados obtenidos.

Cuadro 3.3. Análisis de identidad de las clonas de P5CR de chile habanero con sus homólogos en *Solanaceaes*. En el cuadro se observa que las clonas presentaron un alto grado de identidad con otros miembros de la familia de *Solanaceaes*, principalmente con los miembros del género *Capsicum*.

Nombre	Especie	Identidad (%)	Número de accesión
CcP5CR	<i>Capsicum chinense</i>	99.07	PHU25668.1
CaP5CR	<i>Capsicum annuum</i>	99.07	XP_016559219.1
NtoP5CR	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	94.39	XP_009627281.1
NsP5CR	<i>Nicotiana sylvestris</i>	94.39	XP_009773755.1
NaP5CR	<i>Nicotiana attenuata</i>	94.39	XP_019228572.1
NtP5CR	<i>Nicotiana tabacum</i>	94.39	XP_016495016.1
StP5CR	<i>Solanum tuberosum</i>	93.46	XP_006365049.1
SIP5CR	<i>Solanum lycopersicum</i>	90.65	XP_004233250.1
SpP5CR	<i>Solanum pennellii</i>	90.65	XP_015063467.1

Por último, el análisis de la cinco clonas de *PDH* indicaron, al igual que con los genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de la prolina, que todas son idénticas. Estas presentaron una longitud de 874 pb y una secuencia deducida para la proteína de 292 aminoácidos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.6.

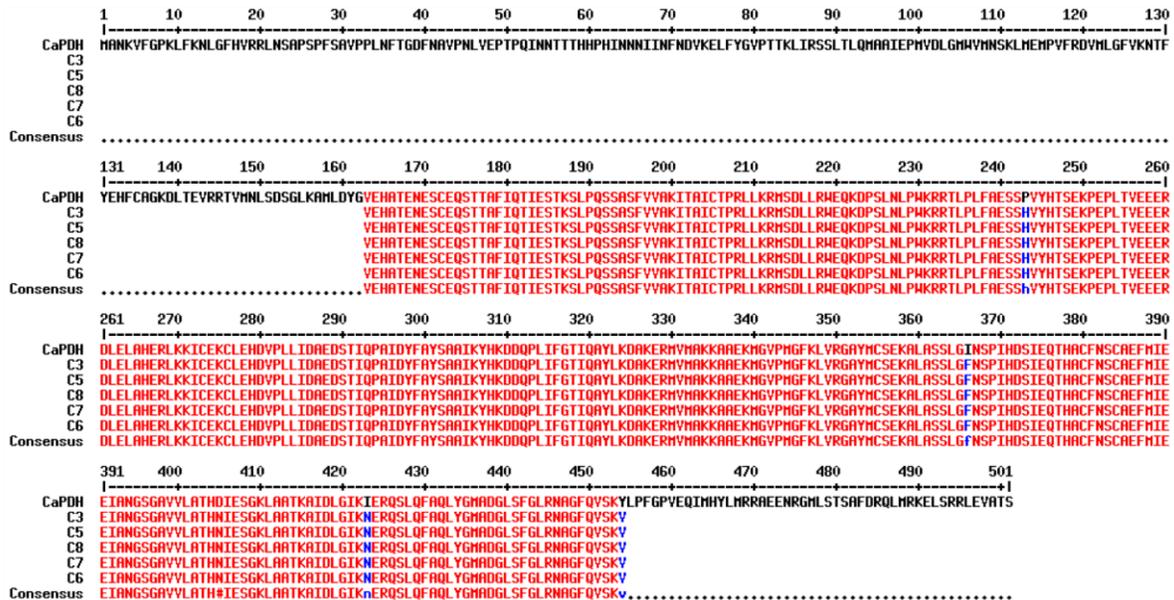


Figura 3.6 Alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos de las cinco clonas elegidas de CcPDH. Como secuencia de referencia se tomó a las PDH de *Capsicum annuum* (NP001311649.1). El alineamiento se llevó a cabo utilizando el programa bioinformático Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

El alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos indicó que la CcPDH de chile habanero es altamente similar a la Prolina deshidrogenasa de la familia de las Solanaceas, incluyendo a *Capsicum annuum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum baccatum*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum pennelli* y *Solanum tuberosum*.

Este análisis reveló que CcPDH tiene una identidad de 98.97% con una secuencia reportada para *Capsicum chinense*. De igual manera también presentó una identidad alta, incluso aun mayor que con la de *C. Chinense*, con CaPDH con la que comparte un 99.63 %. Con *Capsicum baccatum*, CbPDH, presentó un 97.94 %. Con las restantes secuencias de especies analizadas, presentó un porcentaje de identidad que va desde un 93 hasta un 89 %. En el cuadro 3.4 se muestran los resultados obtenidos a partir de este análisis.

Cuadro 3.4. Alineamiento de las clonas de PDH de Chile habanero con sus homólogos en *Solanaceae*. Las clonas presentaron un alto grado de identidad con otros miembros de la familia de *Solanaceae*, de manera especial con los miembros del género *Capsicum*.

Nombre	Especie	Identidad (%)	Número de accesión
CaPDH	<i>Capsicum annuum</i>	99.31	PHT91687.1
CcPDH	<i>Capsicum chinense</i>	98.97	PHU27545.1
CaPDH	<i>Capsicum annuum</i>	98.63	NP_001311649.1
CbPDH	<i>Capsicum baccatum</i>	97.94	PHT57386.1
SIPDH	<i>Solanum lycopersicum</i>	93.47	NP_001334034.1
SpPDH	<i>Solanum pennellii</i>	93.47	XP_015066286.1
StPDH	<i>Solanum tuberosum</i>	92.78	XP_006338295.1
CaPDH	<i>Capsicum annuum</i>	99.27	XP_016555992.1
NtPDH	<i>Nicotiana tabacum</i>	89.69	NP_001312293.1

Estos resultados no resultan extraños, ya que como se ha mencionado anteriormente, las tres especies del género *Capsicum* pertenecen a la familia de las solanaceae, y por lo tanto podrían compartir un ancestro común, lo que da como resultado los altos porcentajes de identidad para las tres enzimas analizadas en este trabajo.

3.3.4 Perfil de expresión de transcritos de *CcP5CS*, *CcP5CR* y *CcPDH* en la raíz de chile habanero

Para determinar los niveles de transcritos de los genes involucrados tanto en la biosíntesis como en la degradación de la Pro, se realizaron ensayos semicuantitativos de PCR punto final. Como mencionamos anteriormente, las plántulas fueron sometidas a una concentración de 150 mM de NaCl durante un período de siete días, al término de los siete días se prosiguió a cosechar el material vegetal (raíces y hojas). Posteriormente se realizó la extracción de ARN total, así como la síntesis de ADNc. Finalmente se obtuvieron los niveles de expresión de los transcritos para cada variedad y para cada tiempo, en los órganos anteriormente mencionados.

En la figura 3.7 se muestran los resultados obtenidos al evaluar los niveles de transcritos de *CcP5CS*, *CcP5CR* y *CcPDH* en la raíz. Se observó que para la variedad Chan hubo una inducción de los niveles de transcritos para *P5CS* y que la expresión aumenta conforme aumenta el tiempo, esto hasta las 72 hrs, para finalmente apagarse a los 7 días. Para *P5CR* se observó un aumento en la expresión de los niveles de transcritos y que este aumento es dependiente del tiempo, obteniendo el menor nivel de expresión a los 7 días. Para *PDH* se observó una inducción de los niveles de expresión de los transcritos, alcanzando sus mayores niveles a las 36 y 72 hrs, para posteriormente apagarse a los 7 días.

En la variedad Ba'alche se observó una disminución en los niveles de expresión de transcritos para *P5CS* a las 24 hrs., así como un aumento a las 36 hrs y una ligera disminución a las 72 hrs; para finalmente apagarse a los 7 días. Para *P5CR* los niveles de expresión de los transcritos se mantuvieron constantes durante las primeras 24 hrs, para posteriormente alcanzar su mayor nivel de expresión a las 36 hrs. Una disminución significativa de la expresión de los niveles de transcritos se observó a las 72 hrs y a los 7 días la expresión es nula.

En el caso de *PDH*, se observó una disminución de los niveles de expresión de los transcritos a las 24 hrs, A las 36 hrs hay una recuperación de los niveles de expresión de los transcritos, siendo este el tiempo donde mayor nivel de expresión se presenta; para posteriormente disminuir a las 72 hrs y apagarse por completo a los 7 días.

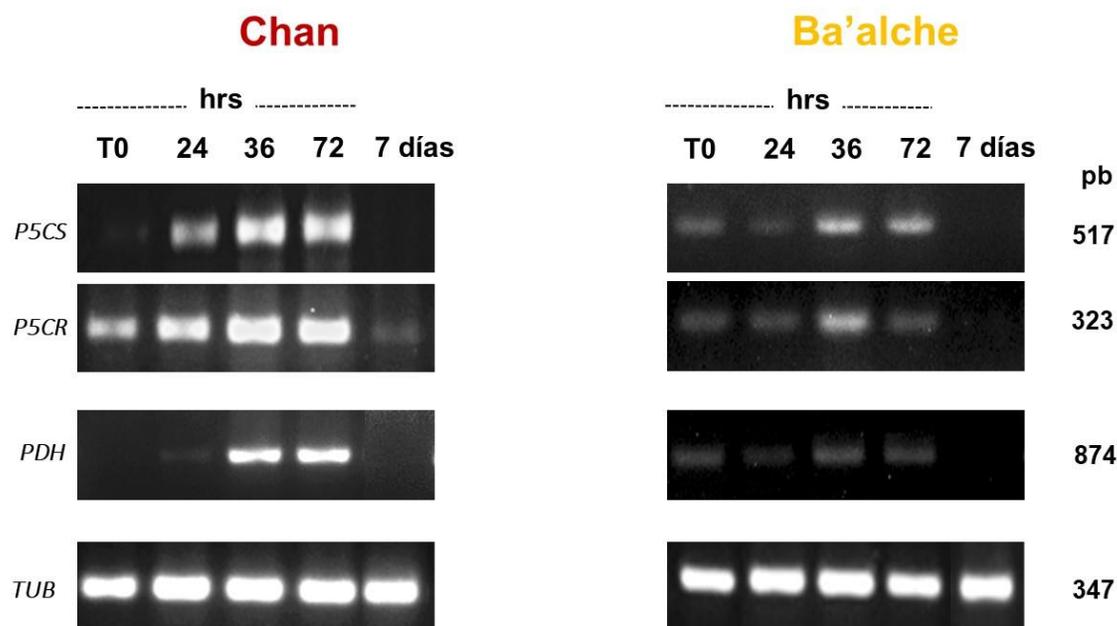


Figura 3.7 Efecto del NaCl sobre los niveles de expresión de los genes *CcP5CS*, *P5CR* y *PDH* en raíces. Plántulas de las variedades Chan y Ba'alche de chile habanero creciendo durante 45 días en condiciones de hidroponía fueron sometidas a una concentración de 150 mM de NaCl por un período de siete días. El ARN fue extraído de raíces a las (0, 24, 36, 72) hrs y a los siete días. El número de ciclos para la PCR fue de 35. Se utilizó el gen constitutivo de Tubulina (TUB) como control de carga.

3.3.5 Perfil de expresión de transcritos de *CcP5CS*, *CcP5CR* y *CcPDH* en las hojas de chile habanero

De la misma manera que en el apartado 3.3.4, se llevó a cabo la evaluación de los niveles de transcritos de los genes involucrados tanto en la biosíntesis como en la degradación del metabolismo de la Pro. Esta evaluación se realizó a partir del ARN total obtenido de hojas. Los resultados se observan en la figura 3.8. Estos resultados muestran que para la variedad Chan hubo un ligero aumento de la expresión de *P5CS* en todos los tiempos cortos evaluados; mostrando una mayor expresión a las 72 hrs. De igual manera se observó que a los 7 días el nivel de expresión disminuyó hasta alcanzar los mismos niveles de expresión que a las 24 hrs.

Para *P5CR* los resultados mostraron una ligera disminución de los niveles de expresión a

las 24 hrs con respecto al testigo. A las 36 hrs se observó una recuperación de estos niveles de expresión, la cual aumentó a las 72 hrs, tiempo en el que se obtuvieron los mayores niveles de expresión. Finalmente, a los 7 días no se observó expresión de los transcritos de dicho gen.

En el caso de *PDH* se observó una inducción de los niveles de expresión a partir de las 24 hrs. Esta expresión se mantuvo oscilante durante los diferentes tiempos, ya que a las 36 hrs hubo una disminución en la expresión, la cual se recuperó a las 72 hrs, tiempo en el que se alcanzó el mayor nivel, contrastando totalmente con lo observado a los 7 días, en donde la expresión se apaga por completo. En la variedad Ba'alche se observó un aumento en la expresión para *P5CS* desde las 24 hrs de exposición a 150 mM de NaCl, la cual aumentó a las 36 hrs, y posteriormente disminuyó a las 72 hrs, alcanzando sus mayores niveles de expresión a los 7 días. Para *P5CR* se observó un aumento significativo de la expresión a las 24 hrs, la cual disminuye a las 36 hrs y se mantiene constante hasta a las 72 hrs, para finalmente recuperarse y alcanzar sus mayores niveles de expresión a los 7 días. Para *PDH* se observó un aumento de la expresión a las 24 hrs con respecto al testigo; sin embargo, a partir de las 36 hrs los niveles de expresión fueron disminuyendo conforme aumentaba el tiempo de exposición al estrés. A los 7 días se observaron los menores niveles de expresión.

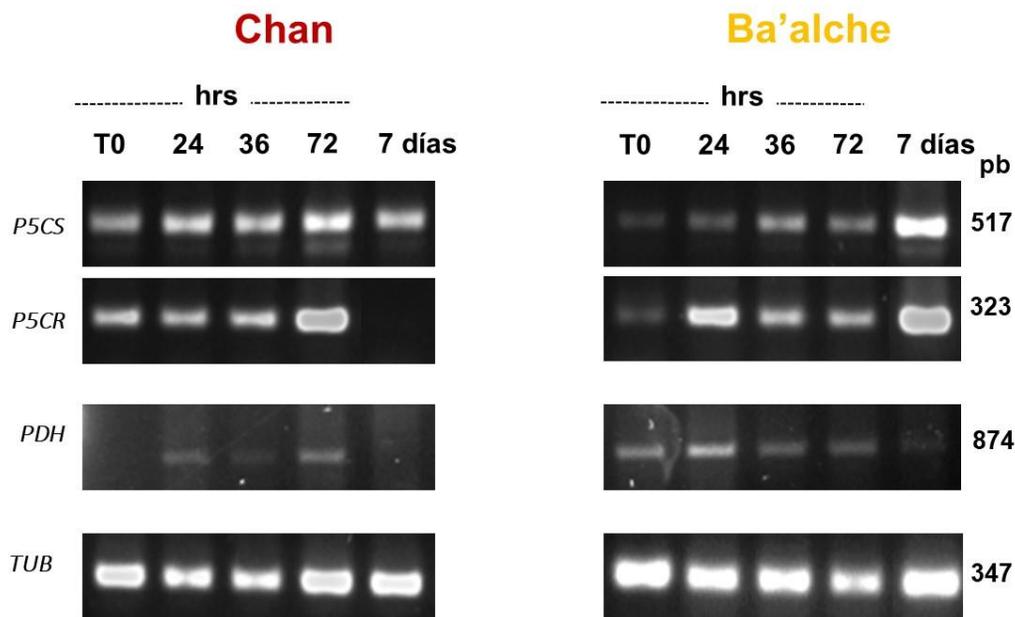


Figura 3.8 Efecto del NaCl sobre los niveles de expresión de los genes

CcP5CS, *P5CR* y *PDH* en hojas. Plántulas de las variedades Chan y Ba'alche de chile habanero creciendo durante 45 días en condiciones de hidroponía fueron sometidas a una concentración de 150 mM de NaCl por un período de siete días. El ARN fue extraído de hojas a las (0, 24, 36, 72) hrs y a los siete días. El número de ciclos para la PCR fue de 40. Se utilizó el gen constitutivo de Tubulina (TUB) como control de carga.

3.3.6 Efecto del estrés por NaCl sobre la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de Prolina en ambas variedades de *Capsicum chinense*.

Bajo condiciones de estrés, se sabe que la acumulación de Pro correlaciona con la actividad de P5CS, la cual es una enzima que juega un papel fundamental en la biosíntesis de Pro, P5CS cataliza el primer paso es la primera reacción en la conversión de Glu a Pro (Wang *et al.*, 2011). El resultado de la actividad específica de P5CS se muestra en la figura 3.9 En las raíces (A) P5CS tuvo una actividad de 100 y 50 (U/mg de proteína) para Chan y Ba'alche respectivamente para el tiempo cero. Se puede observar que la mayor actividad en este órgano fue a las 72 hrs de tratamiento con sal en donde Ba'alche fue la que mostro una actividad mayor de casi 250 (U/mg de proteína) comparada con Chan la cual tuvo 125 (U/mg de proteína) lo que sugiere, que posiblemente cuando una planta se somete a un estrés por NaCl, la biosíntesis de Pro se empieza a dar en las primeras 72 hrs. Sin embargo, algo para notar es que cuando las plantas estuvieron por siete días en tratamiento con este compuesto, P5CS disminuyo a valores similares a los encontrados en el tiempo cero.

En las hojas (B), P5CS en el tiempo cero fue mayor para la Ba'alche a comparación de Chan, sin embargo, cuando ambas variedades se pusieron en presencia de 150 mM de NaCl la variedad Chan tuvo casi el doble de actividad comparada con Ba'alche que se mantuvo en 150 (U/mg de proteína), ya para los siete días se encontró que ambas variedades tuvieron una actividad similar de P5CS. Cabe mencionar que como se mencionó anteriormente, esta enzima es fundamental para la biosíntesis de Pro sin embargo con lo observado en los resultados anteriores, claramente se puede ver que esta enzima se comporta de manera diferente entre variedades, como se vio en el capítulo II. Chan es una variedad que podremos considerar como tolerante a la salinidad y es de suponer que podría tener mecanismos que le ayuden a tolerar este estrés como es el

caso del aminoácido Pro, por el contrario, Ba'alche se ha visto que es una variedad sensible a este estrés. Así mismo, la acumulación de Pro puede verse afectada, o por el contrario la degradación de la Pro es necesaria para órganos y vías que necesiten energía, dado esto, la Pro tiene como función dar energía y servir como una molécula clave en el funcionamiento de las plantas. Dado a lo anterior, uno de los puntos importantes fue evaluar la actividad de la PDH, enzima que cataliza la conversión de Pro a P5C, entonces se prosiguió a evaluar esta enzima para poder determinar si el anabolismo es mayor que el catabolismo para este aminoácido o también si se da de manera contraria.

En la figura 3.9 (C y D) se obtuvieron los resultados en cuanto a la actividad de la PDH tanto en raíces (C) como en hojas (D). En las raíces se obtuvo que en el tiempo cero Ba'alche presento una mayor actividad y que tuvo diferencia significativa comparada con Chan, cabe mencionar que en este tiempo Ba'alche fue la que presento la mayor actividad de los tres tiempos evaluados con casi 450 (U/mg de proteína), por otro lado, a las 72 hrs no existió cambio entre ambas variedades ya que ambas mostraron actividad similar. A los siete días de evaluación se pudo observar que Chan mostro un leve incremento con respecto al tiempo anterior (72 hrs), aunque por otro lado la mayor disminución de PDH se encontró en Ba'alche a los siete días con casi 100(U/mg de proteína).

La actividad de PDH en hojas de igual manera fue evaluada, se pudo obtener que la mayor actividad en este órgano fue en el tiempo cero con casi 700 (U/mg de proteína) la presento Chan, de igual manera se observó que Ba'alche no presento cambios en los niveles de la actividad en prácticamente todos los tiempos evaluados (T0, 72 hrs y 7 días). Sin embargo, PDH modifico su actividad en presencia de salinidad ya que a las 72 hrs y siete días la actividad de Chan fue similar en ambos tiempos y con la menor actividad de este órgano.

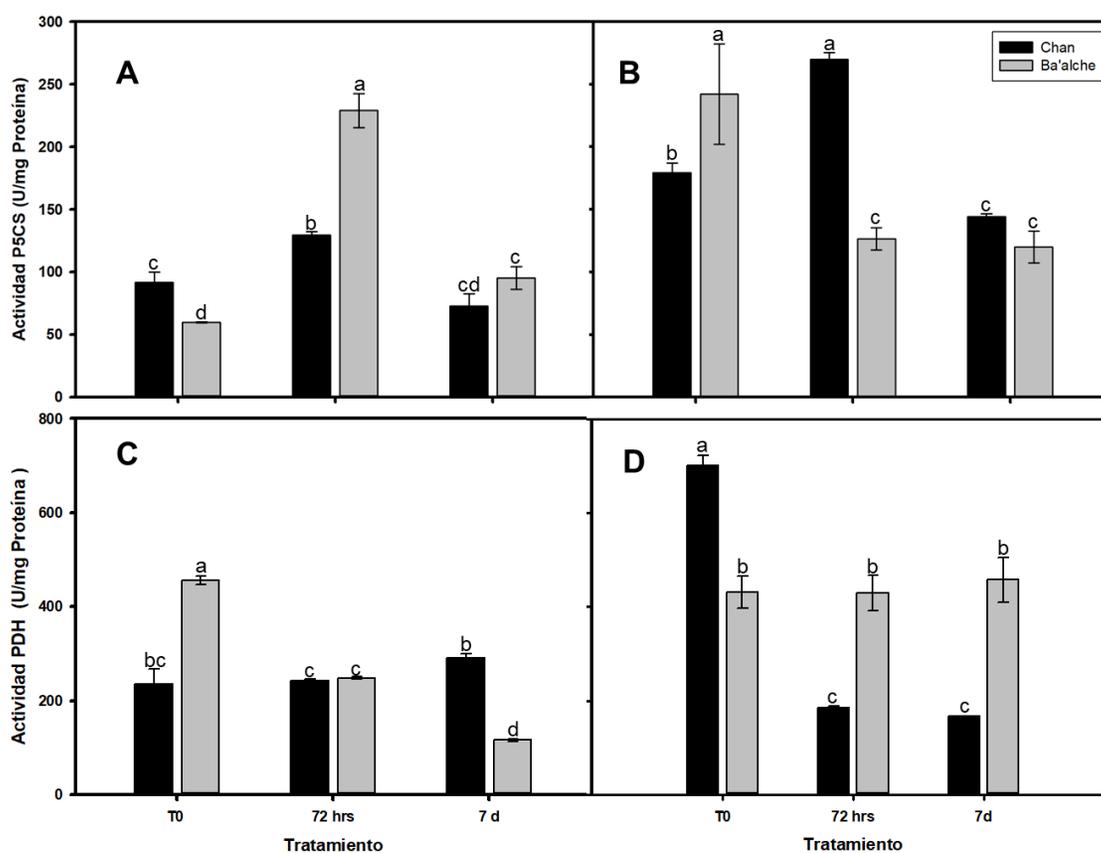


Figura 3.9 Actividad específica de la P5CS y PDH en raíces (A y C) y hojas (B y D) de dos variedades de Chile habanero sometidas a un estrés por NaCl. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.005$; Tukey).

3.3.7 Efecto del estrés por NaCl sobre la acumulación de Pro en las raíces y hojas de ambas variedades de *Capsicum chinense*.

Al término del experimento de dosis-respuesta se prosigió a cuantificar el contenido de Pro en raíces de las dos variedades evaluadas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.10. De manera general en las raíces se observó que tanto la variedad Chan como Ba'alche no presentan diferencias en los contenidos en el tiempo 0 y a las 24 hrs, sin embargo, se observa que existió una mayor acumulación de Pro a las 36 hrs de Ba'alche y este fue mayor que la que presenta Chan, así mismo, a partir de las 72 hrs hasta los siete días la acumulación de Pro fue mayor para la variedad Chan presentando valores por arriba de los $3 \mu\text{moles. g}^{-1}$ de PF para las 72 hrs y cerca de los $20 \mu\text{moles. g}^{-1}$ de PF comparada con Ba'alche cuyos valores estuvieron en $2 \mu\text{moles. g}^{-1}$ de PF para las 72 hrs y aproximadamente $8 \mu\text{moles. g}^{-1}$ de PF para los siete días.

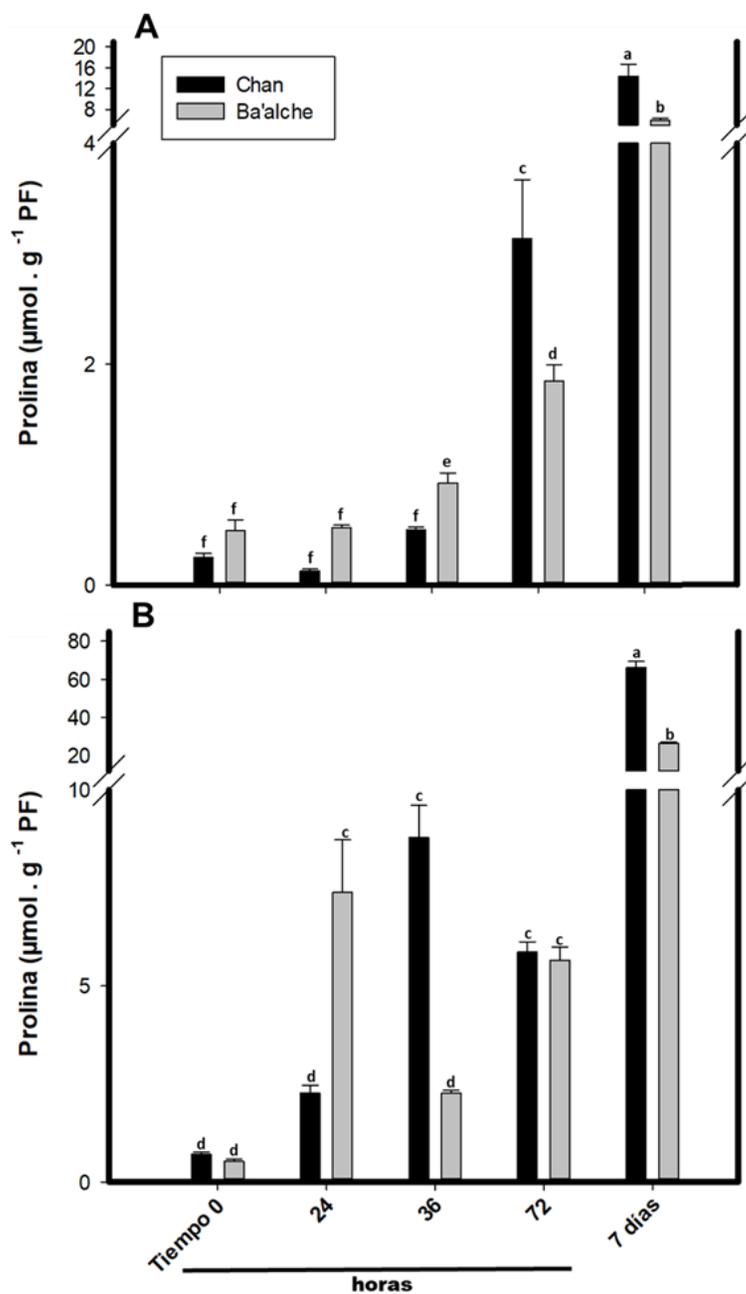


Figura 3.10 Contenido de Pro en raíces (A) y hojas (B) de las plantas testigo y plantas sometidas a una concentración de 150 mM de NaCl de las variedades Chan y Ba'alche. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.005$; Tukey).

Así mismo, se cuantifico el contenido de Pro en las hojas de las dos variedades de chile habanero que fueron sometidas a una concentración de 150 mM de NaCl. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.10. El análisis estadístico mostró que las plantas

testigo fueron las que presentaron menor contenido de Pro y este contenido fue similar en las dos variedades evaluadas. Seguidamente a las 24 hrs la variedad Ba'alche fue la que presentó un aumento de cerca de 5 $\mu\text{moles. g}^{-1}$ de PF con respecto a Chan con un 2.5 $\mu\text{moles. g}^{-1}$ de PF. Así mismo a las 36 hrs hubo un cambio en los contenidos de Chan puesto que presento casi el mismo valor que tuvo Ba'alche en el tiempo anterior, en este tiempo Ba'alche disminuye su contenido de este osmolito a casi 2.5 $\mu\text{moles. g}^{-1}$ de PF. Por otro lado, en a las 72 hrs ambas variedades presentaron valores casi idénticos cercanos a 6 $\mu\text{moles. g}^{-1}$ de PF y por último, al evaluar a los siete días los contenidos de Pro se encontró que de nueva cuenta Chan es la variedad que acumulo casi el doble que Ba'alche, presentando valores cercanos a 80 $\mu\text{moles. g}^{-1}$ de PF y presento diferencia significativa cuando se comparó a Ba'alche en el mismo tiempo de evaluación la cual tuvo un valor de aproximadamente 40 $\mu\text{moles. g}^{-1}$ de PF. Cabe mencionar que se ha documentado que una de las principales funciones que tiene Pro, es conferir protección al aparato fotosintético, así como servir de fuente de energía cuando este aminoácido es degradado y se podría sugerir que la Pro en esta variedad juega un papel muy importante en formar parte de toda esa maquinaria con que cuenta esta variedad para poder tolerar una concentración de 150 mM de NaCl.

3.4 DISCUSION

Existe una amplia literatura sobre la acumulación de Pro bajo diferentes tipos de estrés abiótico como sequia (Kiyosue *et al.*, 1996; Parida *et al.*, 2008), salinidad (Huang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). La acumulación y los niveles de Pro dependen en gran medida del balance entre la tasa de biosíntesis y su degradación (Szabados y Savoure, 2010; Hayat *et al.*, 2012). Las enzimas encargadas de su biosíntesis de este aminoácido catalizan las reacciones en los cloroplastos y el citosol, mientras que la oxidación o degradación de Pro es localizada en la mitocondria (Szabados y Savoure, 2010). Bajo un estrés por salinidad, el metabolismo vegetal es afectado y desorganizado, entonces la red metabólica de toda la planta debe reconfigurarse para poder aclimatarse a las condiciones de estrés predominantes (Aswani *et al.*, 2019).

En presencia de NaCl la regulación de los niveles de transcritos fue diferente en las dos variedades evaluadas, en el órgano de la raíz (figura 3.7) la variedad Chan mostro mayores niveles de transcritos de *P5CS*, *P5CR* (genes que codifican para enzimas

involucradas en la síntesis de Pro) desde las 24 hasta las 72 hrs mientras que para Ba´alche fueron mucho menores o casi indetectables los transcritos de estos dos genes, para el caso de *PDH* (gen que codifica para la enzima involucrada en la degradación de Pro) se pudo detectar que en Chan a las 36 y 72 hrs es donde se encontraron los mayores transcritos comparado con Ba´alche que sus niveles fueron casi idénticos desde el tiempo cero hasta las 72 hrs. Así mismo, en las hojas (figura 3.8) ambas variedades presentaron similar comportamiento en ambos de genes de biosíntesis y degradación, parece ser que los transcritos en este órgano su expresión se ve favorecida en presencia de NaCl y comienza desde tiempos muy cortos. Estos resultados son similares a los reportados por Rivero *et al.* (2014), cuando evaluaron plántulas de tomate en presencia de 120 mM de NaCl por un tiempo de 24 hrs, mencionan que de igual manera tanto *P5CS* como *P5CR* mostraron un aumento en los transcritos de estos dos genes mientras que para *PDH* fueron casi nulos o indetectables los transcritos.

La actividad de las enzimas relacionadas con la biosíntesis (*P5CS* y *P5CR*) y degradación (*PDH*) juegan un papel fundamental en la acumulación de Pro tanto en raíces como en hojas. Rivero *et al.* (2014) reportan que cuando las plantas de tomate se ponen en presencia de sal por 48 hrs la actividad de las enzimas de biosíntesis es mucho mayor que cuando están a las cero horas, mientras que la enzima de degradación se mantiene en valores cercanos a cero o no presenta actividad, en ese sentido en este estudio se evaluó tanto la actividad de *P5CS* como la *PDH*, en raíces (figura 3.9 A, C) la variedad Ba´alche fue la que presentó la mayor actividad de *P5CS* a las 72 hrs de tratamiento mientras que Chan siempre se mantuvo en actividades similares para los tres tiempos de evaluación, respecto a la *PDH* la variedad Chan tendió a aumentar la actividad conforme fue mayor el tiempo de exposición a la salinidad, mientras que Ba´alche por el contrario presentó una disminución de esta enzima conforme fue mayor el tiempo de exposición a la sal. En las hojas (figura 3.9 B, D) la actividad de *P5CR* en la variedad Chan tuvo su mayor incremento a las 72 hrs, este resultado presenta similar comportamiento a lo reportado por Rivero *et al.* (2014), por otro lado, para la *PDH* la variedad Chan disminuye la actividad de esta enzima de las 72 hrs hasta los 7 días, comparado con Ba´alche que su actividad de esta enzima siempre se mantuvo en valores cercanos a 400 (U/mg proteína), con esto se sugiere que Chan podría estar favoreciendo su ruta de biosíntesis de Pro y con ello su acumulación mientras que para Ba´alche se sugiere que actividad de anabolismo es menor a su catabolismo puesto que podría estar degradando la Pro para

utilizarla como energía para contrarrestar el estrés causado por la sal.

La acumulación de Pro como se sabe, juega un papel fundamental para la tolerancia a un estrés abiótico como se mencionó anteriormente, con base a esto en este estudio se prosiguió a evaluar el contenido de este aminoácido tanto en periodos cortos de tiempo (0, 24, 36 y 72 hrs) y 7 días. Dicho contenido se evaluó en ambos órganos (raíz y hoja), en presencia de salinidad se obtuvo que la Pro se acumula mayoritariamente en las hojas por casi cuatro veces más comparado con la raíz, la variedad Chan tanto en raíces como en hojas mantuvo los niveles más altos de aminoácido. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Bojórquez-Quintal *et al.* (2014b; 2016) ya que en presencia de salinidad por siete días de tratamiento el órgano que presentó un mayor contenido fueron las hojas y la variedad que acumuló mayoritariamente este aminoácido fue Rex (Mayan Chan) mientras que Chichen-Itza (sensible) tuvo niveles muy bajos cercanos a 0 en raíces y 0.5 mmoles.g^{-1} de PS, así mismo Rivero *et al.* (2014), reportan que a las 48 hrs de tratamiento con 120 mM de NaCl el osmolito que se acumula mayoritariamente es la Pro. Los autores sugieren que el ajuste osmótico es necesario para tratar de contrarrestar los efectos causados por la salinidad y la acumulación de Pro se da en vacuola así como en el citosol, con ello incrementan el potencial de turgor de la célula. Sin embargo, Aranda *et al.* (2001) observó que la salinidad reduce la expansión celular en las plantas de tomate, entonces se puede asociar que la reducción en el potencial osmótico e hídrico podrían favorecerse por la acumulación de osmolitos como es el caso de Pro y con ello incrementar el turgor celular.

CAPÍTULO IV

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE Pro EXÓGENA SOBRE EL FLUJO DE K^+ Y H^+ EN LAS RAICES DE DOS DIFERENTES VARIEDADES DE CHILE HABANERO SOMETIDAS A ESTRÉS SALINO

4.1 INTRODUCCIÓN

La deficiencia del ion potasio (K^+) es conocida como factor limitante para la producción y rendimiento de los cultivos de interés comercial, este es el mayor nutriente inorgánico catiónico en las plantas no halófitas (Maathuis y Amtmann, 1999; Shabala, 2003; Pettigrew, 2008; Dreyer y Uozumi, 2011), comprende generalmente del 4% - 6% de la planta con base a materia seca. El K^+ desempeña un papel importante en la respuesta de las plantas a los mayores estreses abióticos tales como la sequía, salinidad, frío, congelación e inundación (Cakmak, 2005; Wang *et al.*, 2013; Shabala y Pottosin, 2014). En términos generales, el estrés salino en plantas puede dividirse en dos fases: fase osmótica donde ocurre una rápida respuesta ante los cambios en el potencial osmótico y la fase iónica donde se produce la acumulación gradual de Na^+ , a estos tipos de fases se les conoce como estreses primarios (Fortmeier y Schubert, 1995; Munns *et al.*, 2002; Munns y Tester, 2008). Así mismo, varios mecanismos son usados por las glicófitas para disminuir los efectos dañinos de la salinidad, se incluye la exclusión o flujo de salida de la toma de Na^+ , secuestro o compartimentalización de Na^+ en vacuola, ajuste osmótico, control en la carga de Na^+ en el xilema, transporte hacia órganos (hojas viejas) para ser acumulado (Tester y Davenport, 2003; Colmer *et al.*, 2005; Munns *et al.*, 2006; Munns y Tester, 2008; Shabala y Pottosin, 2014). En consecuencia, han surgido numerosos intentos para realizar modificaciones o manipulaciones de uno de los mecanismos mencionados anteriormente, tanto por la vía transgénica como por ejemplo: el aumento en la síntesis de osmolitos orgánicos (Huang *et al.*, 2012); sobreexpresando en el tonoplasto los intercambiadores Na^+/H^+ conocidos como NHX involucrados en la secuestro de Na^+ en la vacuola (Apse *et al.*, 1999); aumentando la exclusión de Na^+ de las raíces por la sobreexpresión de SOS1 que se le conoce que actúa como antiportador Na^+/H^+ en la membrana plasmática (Shi *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2007a). La salinidad interrumpe la homeostasis de iones, su distribución a lo largo de todos los órganos celulares de las plantas (Zhu, 2001; Tunuturk *et al.*, 2011). Cuando el K^+ es sustituido por el Na^+ en

reacciones bioquímicas, este ion causa citotoxicidad y cuando los iones de Na^+ y Cl^- interfieren con las interacciones no covalentes entre los aminoácidos, entonces las proteínas no funcionan o pierden su conformación, por lo tanto en condiciones de salinidad los niveles de Na^+ son tóxicos por lo tanto el K^+ es desplazado y no están disponibles para una serie de reacciones enzimáticas y no puede ser utilizado para el ajuste osmótico (Zhu, 2002; Ashraf y McNeilly, 2004; Munns *et al.*, 2006). Además, en el citoplasma las concentraciones de K^+ pueden ser relativamente altas, sin embargo, las concentraciones de Na^+ pueden ser muy bajas; indicando que la toma es más selectiva favoreciendo al K^+ sobre la toma de Na^+ .

Por lo tanto, es evidente que el Na^+ puede ser transportado hacia el interior de la célula a través de los acarreadores de K^+ , aunque los mecanismos para el flujo de entrada de Na^+ a través de la membrana aún no se han identificado o establecido (Blumwald *et al.*, 2000; Munns y Tester, 2008). Los sistemas de transporte tanto de alta como de baja afinidad no solo contribuyen en la toma de K^+ sino que también funcionan para Na^+ . De esta manera puede verse desorganizada la membrana plasmática, inducir a un flujo de salida de H^+ y K^+ así como un desplazamiento de K^+ en la toma causando una despolarización o hiperpolarización de la membrana plasmática. Por otro lado, en estudios realizados por Cuin y Shabala (2005) sugieren que el papel de los solutos compatibles participan de manera importante en el ajuste osmótico ante un estrés, no solo cumpliendo funciones regulatorias u osmoprotectantes, sino que también pudieran estar involucrados en mantener una homeostasis del K^+ citosólico y de esta manera prevenir la fuga de K^+ inducida por NaCl en la célula. Es sus estudios demuestran que con la adición de bajas concentraciones (0.5-5 mM) de Pro o betaina reducen significativamente el flujo de salida de K^+ inducido por el NaCl , esto en raíces de plantas de cebada.

Por otro lado, Cuin y Shabala (2007a) observaron que durante un estrés por salinidad el contenido de aminoácidos totales se incrementa sustancialmente y sugiere que con la adición de aminoácidos libres estos pueden contribuir en la respuesta adaptativa a la salinidad mediante una regulación del transporte de K^+ a través de la membrana plasmática, manteniendo una diferencia positiva para K^+ sobre la de Na^+ . Así mismo, se ha visto que la acumulación de Pro conlleva a un costo que se observa en una inhibición en el crecimiento y esto es comúnmente observado en plantas sujetas a un estrés salino. Sin embargo, un incremento en la cantidad de energía es guardada como por ejemplo el nitrógeno. Diversas hipótesis han surgido en cuanto a la aplicación exógena de Pro y se

ha visto que puede aliviar el deterioro de los efectos causados por la salinidad y esto se ha visto en plantas de *Eurya emarginata* las cuales al ser tratadas con 10 mM de Pro y 200 mM de NaCl por un periodo de 35 días se observó que en las plantas tratadas con NaCl la Pro exógena incremento el peso fresco, el contenido endógeno de Pro y concentraciones de K⁺, así como un menor daño oxidativo en la peroxidación de lípidos en la membrana. Por lo tanto, la aplicación exógena de Pro afecta significativamente la tolerancia a la salinidad en plantas de *Eurya emarginata*, a través de diversos efectos de protección en las relaciones hídricas, iónicas, ajuste osmótico y una defensa antioxidante (Zheng *et al.*, 2015).

El objetivo de este capítulo fue evaluar la adición de Pro exógena sobre el flujo de iones K⁺ y H⁺ en las dos variedades de chile habanero que tuvieron comportamiento contrastante cuando se sometieron a un estrés por NaCl, se midieron los flujos iónicos mediante microelectrodos selectivos o técnica de MIFE ante un estrés por NaCl, esta técnica se basa en la medición del flujo de iones en raíces.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) de las diferentes variedades ya antes mencionadas en el capítulo II.

4.2.2 Germinación y condiciones de crecimiento

Para la desinfección, las semillas se enjuagaron con etanol al 80% (v/v) e hipoclorito de sodio de marca comercial (Cloralex, 5% NaOCl) al 30% (v/v) como se describió en el capítulo II. Posteriormente, las semillas se lavaron y se embebieron por un tiempo de 48 h a 4°C en oscuridad. Después de la estratificación, las semillas fueron incubadas en oscuridad en cajas Petri con papel filtro humedecido con agua estéril hasta la aparición de la radícula. Las semillas con emergencia de la radícula fueron transferidas en cajas Petri con medio de crecimiento Gamborg-B5 (Sales B5, Sigma) el cual se modificó y tuvo la mitad de su fuerza iónica (B5/2). Al medio B5/2 se le adicionó sacarosa 0.5 % (w/v) y agar al 1 % (w/v); el pH se ajustó a 5.8.

4.2.3 Medición de flujo iónico en raíces por la técnica de MIFE

El flujo neto de K^+ y H^+ fue medido sobre la superficie de las raíces de variedades de Chile, se midió de manera no invasiva mediante la técnica de MIFE (Microelectrode Ion Flux Estimation), (Newman, 2001). Para los estudios con MIFE, las plántulas fueron cultivadas en condiciones *in vitro* como se mencionó en el punto anterior, de manera que se usaron las raíces que presentaron una raíz primaria de entre 8-10 cm, brevemente, se tomaron las raíces y se fijaron a una cámara horizontal hecha para la medición, se agregaron 30 mL de las soluciones de baño o medición, para mediciones de K^+ (0.5 mM KCl, 0.1 mM $CaCl_2$, 5 mM MES, 2 mM Tris pH 6.0) y para H^+ (0.5 mM KCl y 0.1 mM $CaCl_2$, sin amortiguadores), se esperaron 30 min para su estabilización. En cada experimento se utilizaron dos microelectrodos selectivos previamente calibrados, uno para K^+ y otro para H^+ .

Seguidamente para la medición, se aplicaron diferentes tratamientos los cuales fueron: 150 mM de NaCl, 10 mM Pro, juntos 150 mM de NaCl + 10 mM Pro y por último una incubación de 1 hr con 10 mM Pro y 150 mM de NaCl, todos los tratamientos anteriores se aplicaron a la cámara de medición (30 mL). Además, antes del experimento, los microelectrodos fueron elaborados con un equipo especial llamado puller, seguidamente tienen un pretratamiento en un horno y todo este proceso se llama salinización, esto con el fin de conferir hidrofobicidad a los electrodos. Seguidamente los electrodos fueron llenados con una solución Backfilling, la cual contenía 0.5 mM KCl para K^+ y 0.15 mM NaCl + 0.04 mM de KH_2PO_4 para H^+ , seguidamente la punta del electrodo fue cargada con una resina ion selectiva (intercambiador ión-líquido, LIX; Fluka, Sigma-Aldrich) específica para cada ion de interés.

Finalmente, los electrodos fueron montados en el holder que este a su vez está acoplado a un micromanipulador y estos fueron posicionados perpendicularmente al eje de la raíz primaria a una distancia de 20-40 μm de la zona madura, a 1-2 cm del ápice de la raíz. Las mediciones se iniciaron con un movimiento oscilatorio de los electrodos en pasos de 50 μm hacia atrás y hacia adelante por un tiempo de 8 seg para completar un tiempo total de medición de 40 min. El equipo se manipula a través de un software llamado CHART, este programa registra las diferencias de potenciales entre los dos puntos de medición (50 y 100 μm) y este los convirtió en diferencias de potencial electroquímico, utilizando la pendiente de Nernst. Los flujos de iones se midieron en tiempos de 40 min después de la

aplicación del NaCl, Pro o juntos (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014b; Wu *et al.*, 2015a; 2015b). Estos experimentos se realizaron en el laboratorio de MIFE del departamento de Genómica Alimentaria a cargo del Dr. Isaac Zepeda Jazo de La Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo.

4.2.4 Análisis estadístico

Los datos se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía (Sigma plot, versión 12). Las medias de tratamientos se compararon con la prueba de rango múltiple de Tukey.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Efecto del NaCl sobre el flujo de iones de K⁺ en raíces de chile habanero

En este estudio se empleó la técnica MIFE para evaluar el flujo de K⁺ y H⁺ en las raíces de dos variedades de chile habanero que difieren en tolerancia y sensibilidad a la salinidad. El objetivo de este experimento fue determinar que variedad es capaz de retener K⁺ y de igual manera conocer si con la aplicación de Pro exógena, este aminoácido podría estar involucrado en la retención del ion K⁺, posiblemente ayudando en el ajuste osmótico. Anteriormente, se ha considerado que la retención de K⁺ en la raíz se podría considerar como criterio de selección entre variedades de cebada tolerantes y sensibles a sal (Chen *et al.*, 2005). Para verificar este criterio, se midió el flujo neto de K⁺ en raíces de ambas variedades de chile utilizando MIFE. En la figura 4.1 se presentan los resultados respecto a los flujos netos de K⁺ esto bajo diferentes escenarios y tratamientos.

En el panel A) se puede observar que la aplicación de NaCl indujo el flujo de salida de K⁺ de las células epidérmicas en la región madura de la raíz de las variedades de chile. Sin embargo, se puede observar que la variedad Ba'alche muestra flujo de salida de K⁺ y que en esta variedad el potencial electroquímico regresa más rápido comparada con Chan, que presento un flujo de salida mucho mayor y que durante los 40 min de evaluación esta variedad tiende a estabilizar su membrana, ambas variedades alcanzaron flujos aproximados a $-300 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y ambas variedades tienden a estabilizarse alcanzando

valores cercanos a 0. El panel B) corresponde a un experimento donde solo se ponen las raíces en presencia de 10 mM de Pro, sin embargo, se puede observar un desbalance en los potenciales ya que al momento exponer las raíces a 10 mM de Pro en ambas variedades se observan entradas y salidas de K^+ . Y el C) Consiste a un tratamiento en donde al mismo tiempo en la cámara de medición se aplican de manera conjunta 10 mM de Pro y 150 mM de NaCl, se puede apreciar que en la variedad sensible (Ba'alche) el flujo de salida de K^+ es mucho menor comparado con las mediciones del panel A, teniendo un flujo neto aproximado de $150 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, Chan mostro un flujo casi idéntico que en el panel A de $-300 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. D) corresponde a un tratamiento en el cual las raíces se incubaron en un pre-tratamiento con 10 mM de Pro por 1 hr, sin embargo, en los resultados se obtuvo que el pretratamiento con este aminoácido no disminuyo el flujo de salida de K^+ ya que ambas variedades presentan flujos de salida similares a los presentados en el inciso A, con esto se puede deducir que la incubación de raíces con Pro no disminuye el flujo de salida de K^+ causado por la presencia de NaCl.

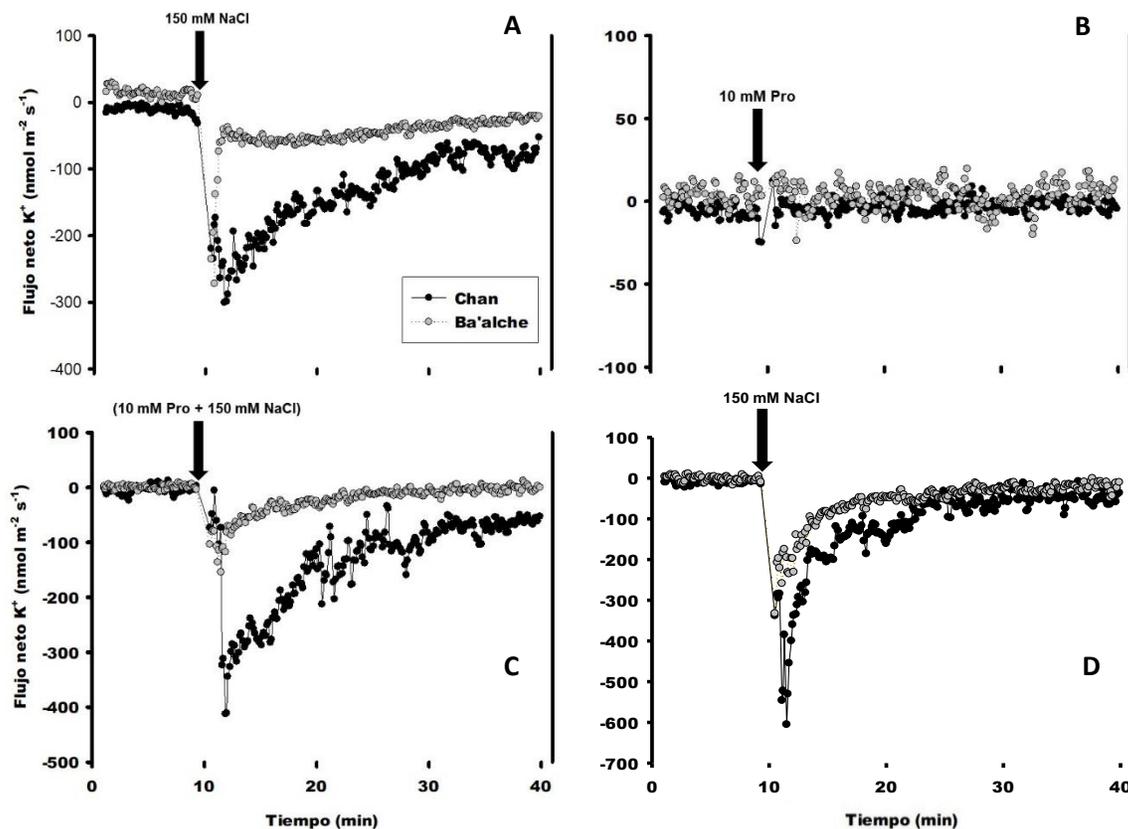


Figura 4.1 Estimación de flujo neto de K^+ en raíces de dos variedades de Chile habanero (Chan y Ba'alche) bajo diferentes tratamientos. A) tratamiento con

150 mM de NaCl. B) tratamiento con 10 mM de Pro. C) tratamiento con la incubación de ambos compuestos (10 mM de Pro y 150 mM de NaCl). D) incubación de 1hr con 10 mM de Pro y posteriormente un tratamiento con 150 mM de NaCl.

4.3.2 Efecto del NaCl sobre el flujo de iones de H⁺ en raíces de chile habanero

Se sabe que la H⁺-ATPasas juegan un papel fundamental en la membrana plasmática, generan un gradiente electroquímico para el mantenimiento del potencial de membrana, por lo tanto, está involucrada en la regulación del transporte de iones hacia o desde el citosol al medio externo. Se ha reportado que cuando las plantas están bajo un estrés por salinidad son inducidas para tener un flujo de salida de H⁺, esto se ha visto en *H. vulgare*, *T. aestivum*, *A. thaliana* y la halofita *C. quinoa* (Chen *et al.*, 2007b; Cuin *et al.*, 2008; Hariadi *et al.*, 2011; Bose *et al.* 2013, 2014). Por tal motivo, el siguiente experimento tiene como objetivo, conocer si Ba'alche tiene un flujo de salida de H⁺ elevado, comparada con Chan y por ultimo conocer si la aplicación de Pro podría conferir una disminución de este flujo inducido por NaCl. Los resultados se presentan en la figura 4.2.

En el panel A) corresponde a un tratamiento con 150 mM de NaCl, Chan presento un flujo de entrada desde el minuto 10 hasta el 15 aproximadamente, por otro lado, Ba'alche desde le minuto 10 hasta el 20 aproximadamente presento un flujo de salida seguidamente de una entrada de H⁺ en este periodo de tiempo.

En el panel B) se presentan resultados que corresponden a un tratamiento con 10 mM de Pro, se observa que este aminoácido no presenta una influencia sobre el flujo neto de H⁺ en ambas variedades durante todo el tiempo de tratamiento.

C) corresponde a un tratamiento donde las raíces de ambas variedades se les aplico conjuntamente Pro y NaCl, los resultados obtenidos claramente se puede observar que Chan a partir de los 10 min tiene un flujo de salida rápido que alcanza los $-20 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y que aproximadamente entre los 12 minutos de igual manera las raíces de esta variedad presentan un flujo de entrada que alcanza valores de entre 5 y $7.5 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a partir del minuto 15 el potencial regresa a una estabilización, por otro lado Ba'alche presento flujos casi nulos, ya que sus valores en el flujo casi siempre se mantuvieron cerca de 0

$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Por ultimo en D) se presentan los resultados cuando a las raíces se les incubo con 10 mM de Pro por un tiempo de 1 hr, como resultado se puede apreciar que en la variedad Chan, cuando se le aplican 150 mM de NaCl las raíces presentan un flujo de salida de entre 2 y 4 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y esto pasa entre el minuto 10 y 15 ya que después de este tiempo los valores en potenciales tendieron a 0 (estabilización); por otro lado Ba'alche presento un comportamiento muy anormal ya que cuando a las raíces se les aplico 150 mM de NaCl en el minuto 10, las raíces presentaron una distorsión en flujo de entrada y salida, y se aprecia que nunca se estabilizan los potenciales, se puede sugerir que la Pro en este caso podría actuar como una molécula perjudicial para la actividad de la ATPasa o tener un efecto sobre el electrodo.

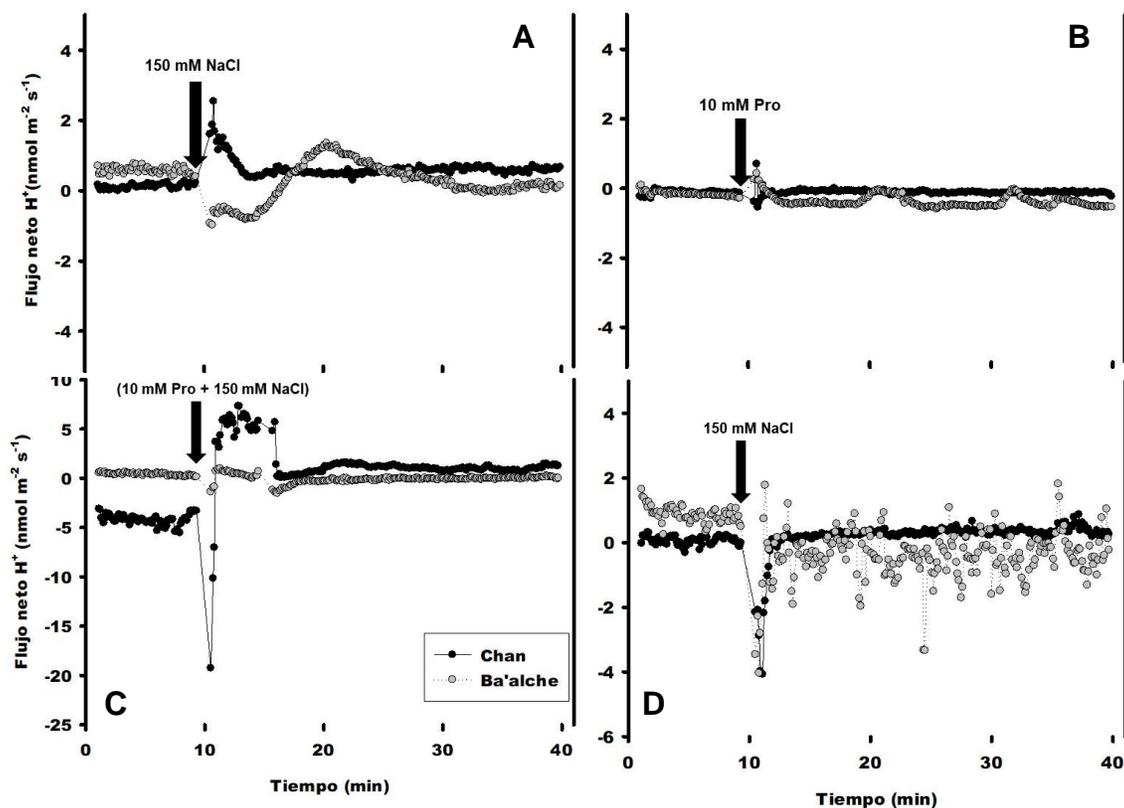


Figura 4.2 Estimación de flujo neto de H^+ en raíces de dos variedades de Chile habanero (Chan y Ba'alche) bajo diferentes tratamientos. A) tratamiento con 150 mM de NaCl. B) tratamiento con 10 mM de Pro. C) tratamiento con la incubación de ambos compuestos (10 mM de Pro y 150 mM de NaCl). D) incubación de 1hr con 10 mM de Pro y posteriormente un tratamiento con 150 mM de NaCl.

4.4 DISCUSION

El potasio (K^+) es un nutriente que se considera esencial durante todo el ciclo vegetativo de las plantas. Se considera de importancia puesto que la regulación de la homeostasis del K^+ tiene un papel central en la tolerancia a estrés abiótico y biótico en plantas (Anschütz *et al.*, 2014, Shabala y Potossin, 2014; Demidchik, 2014). El flujo de salida de K^+ de la raíz es una reacción fisiológica que ocurre de manera común y se da bajo un amplio rango de condiciones y ambientes estresantes (Demidchik, 2014). Por otro lado, se ha demostrado que la retención de K^+ en raíces podría estar involucrada en conferir tolerancia a la salinidad en cebada, trigo, alfalfa y álamo (Chen *et al.*, 2007b,c; Cuin *et al.*, 2008; Smethurst *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2009). Para este estudio, el tratamiento con 150 mM (figura 4.1A) de NaCl disminuyó de manera significativa el contenido de K^+ en las raíces de ambas variedades evaluadas (Chan y Ba'alche), dando como resultado un mayor flujo de salida de K^+ para Chan que para Ba'alche, estos resultados fueron similares a lo reportado por Bojórquez-Quintal *et al.* (2014b), donde en un tratamiento con 150 mM de NaCl causó un flujo de salida de K^+ mucho mayor en la variedad sensible Chichen-Itzá y no así en la variedad tolerante Rex (Mayan Chan), por lo que se sugiere que en chile habanero podría ser considerado que la retención de K^+ en las raíces podría considerarse como un mecanismo de tolerancia implicado ante un estrés por sal. Sin embargo, para nuestros resultados se sugiere que no en todas las plantas la retención de K^+ en la raíz es un indicativo de tolerancia a la salinidad.

Otra posible hipótesis que se tuvo, fue que al aplicar Pro de manera exógena posiblemente la retención de K^+ pudiera darse en la variedad sensible. La aplicación de Pro exógena (figura 4.1B, C, D) no tuvo ningún efecto en el flujo de K^+ cuando se aplica solo dicho aminoácido. Por otro lado, la aplicación de Pro posiblemente favorece a la variedad Ba'alche ya que al aplicar de manera conjunta 10 mM de Pro y 150 mM de NaCl el flujo de salida de K^+ es mucho menor en esta variedad a comparación que cuando se aplica solo el tratamiento con sal (figura 4.1A), por último al incubar las raíces de ambas variedades en presencia de 10 mM de Pro por 1 hr y posteriormente al aplicar NaCl, el resultado fue similar a lo encontrado cuando se aplica solo sal. Estos resultados fueron similares a los reportados por Bojórquez-Quintal *et al.* (2016), ya que ellos concluyen que cuando evaluaron dos variedades de chile habanero (Rex y Chichen-Itzá) en presencia de salinidad y aplicación de Pro exógena [1 mM], la variedad sensible fue la que se favoreció en un menor flujo de salida de K^+ a comparación que cuando se le aplicó NaCl [150 mM],

mientras que en la variedad tolerante (Rex) la Pro tuvo un efecto contrario, induciendo a un mayor flujo de salida de K^+ cuando se le aplicó Pro. Los autores sugieren que Pro pudiera tener un posible papel en la reducción de la salida de K^+ bajo un estrés por sal. Mencionan que en la actualidad se desconoce el mecanismo específico a través del cual los solutos compatibles podrían regular la actividad de transporte de las proteínas, como por ejemplo los canales de tipo KOR y la reducción de la fuga de K^+ ; sin embargo, Shabala y Shabala (2011), sugieren que las bajas concentraciones de solutos compatibles (0.1 a 1 mM) podrían actuar como posibles osmoprotectores de membranas y proteínas involucradas en el transporte o como depurador de EROs, con ello evitando el desequilibrio iónico bajo un estrés salino. Los autores concluyen que se necesitan realizar estudios en mutantes que carezcan en biosíntesis de Pro.

Las H^+ -ATPasas se sabe que generan el gradiente electroquímico para el mantenimiento del potencial de membrana así como el transporte de iones hacia o desde el citosol al medio externo. Se ha visto que bajo un estrés salino, el NaCl induce el flujo de salida de H^+ en raíces de cereales como *H. vulgare* y *T. aestivum*, en halofitas como *C. quinoa* y de igual manera en la planta modelo *A. thaliana* (Chen *et al.*, 2007b; Cuin *et al.*, 2008; Hariadi *et al.*, 2011; Bose *et al.*, 2013, 2014). En este estudio, la aplicación de NaCl indujo ligeros cambios en el flujo de H^+ (figura 4.2), la variedad Chan mostró una entrada de este ion mientras que la variedad Ba'alche sufrió una pequeña salida de este H^+ , estos datos son inciertos puesto que se cuenta con un antecedente (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014b) en donde en ambas variedades evaluadas, el NaCl indujo rápidamente un flujo de salida de H^+ al igual que la aplicación de inhibidores de la H^+ -ATPasa tipo P se abate, los autores sugieren la posible participación de esta proteína de transporte bajo un estrés por sal.

Por último, parece ser que la aplicación de Pro de manera exógena a una concentración de 10 mM no muestra un efecto claro sobre el flujo de H^+ , ya que bajo diferentes escenarios de pruebas los comportamientos de las raíces mostraron diferencias y no son muy claros por lo que se sugiere realizar más pruebas con diferentes concentraciones de Pro.

CAPÍTULO V

ANÁLISIS REFLEXIVO SOBRE EL PAPEL DE LA PROLINA EN DIFERENTES TIPOS DE ESTRÉS ABIÓTICOS: SALINIDAD Y SEQUÍA

5.1 INTRODUCCIÓN

La salinidad y la sequía son dos de los estreses abióticos mayoritarios que afectan el crecimiento, desarrollo y rendimiento de los cultivos a nivel mundial. En la mayoría de las regiones en el mundo son fuertemente afectadas por la salinidad dado a que se presenta baja tasa pluvial, alta evapotranspiración y suelos con altas concentraciones de sales, que pueden dar como resultado una baja disponibilidad de agua para las plantas (Niu *et al.*, 2010b). Con la poca disponibilidad de agua, la sequía en las diferentes regiones puede presentar sequía prolongada, cerca del 75 % del total de tierras cultivables son irrigadas con agua salina en donde la conductividad eléctrica está por encima de 3 dS/m (Lansford *et al.*, 1990; WRRRI, 1997). La continua aplicación de agua rica en sales puede favorecer la acumulación de estas mismas sales en la superficie del suelo. Consecuentemente las plantas podrían estar sujetas a padecer un desbalance osmótico y nutricional lo que conllevaría a tener un impacto directo sobre el crecimiento y rendimiento de las especies cultivables en el mundo (Ashraf y Wu, 1994; Singh *et al.*, 2014).

Además, la sequía o déficit hídrico afecta de manera crítica la fisiología de la planta y tener un resultado negativo en el desarrollo de las mismas, una continua baja disponibilidad de agua, distribución irregular del suelo, así como poca precipitación dan como resultado una alta evapotranspiración (Mishra y Cherkauer, 2010). El crecimiento vegetal y desarrollo es afectado debido a una substancial reducción en la tasa de crecimiento del cultivo y la cantidad de biomasa producida por la planta, además de una severa afectación en todos los procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares de la planta. Consecuentemente una afectación por déficit hídrico reduce la tasa de crecimiento, división y expansión celular, tamaño de la hoja, elongación del tallo, proliferación de la raíz, alteración de la conductancia estomática, relaciones hídricas, toma de nutrientes y por último y no menos importante la eficiencia en el uso del agua (Li *et al.*, 2009).

Los efectos de la salinidad son los resultados de una compleja interacción por varios

factores en donde sus principales afectaciones son tanto en la fisiología, así como procesos bioquímicos, procesos que incluyen la germinación, crecimiento vegetal, toma o absorción de agua y nutrientes (Akbarimoghaddam *et al.*, 2011). La primera respuesta de las plantas a la salinidad es la reducción en el crecimiento debido al efecto osmótico de las sales, por otro lado, está la parte iónica que la salinidad ocasiona en donde se da una desorganización en la toma de iones y en consecuencia, se ve afectada la toma de nutrientes esenciales que juegan un fundamental en el metabolismo vegetal como por ejemplo el K^+ , NO_3^- y otros iones de importancia (Munns y Tester, 2008; Abbas *et al.*, 2013). Así mismo, las plantas disminuyen la toma de agua bajo estas condiciones reduciendo con ello la tasa de crecimiento y por consiguiente ocurren cambios metabólicos similares a los que induce un estrés por déficit hídrico o sequía (Abbasdokht, 2011).

Muchas plantas se han adaptado y han desarrollado mecanismos para sobrellevar o tolerar estos dos tipos de estrés; uno de estos mecanismos involucra el ajuste osmótico para la homeostasis celular bajo condiciones de salinidad y sequía (Chen y Jiang, 2009). Las plantas que se someten a un ajuste osmótico son capaces de excluir iones tóxicos como Na^+ y Cl^- que causan la toxicidad iónica y a su vez las plantas son capaces de acumular más K^+ y Ca^{2+} los cuales proporcionan sobrellevar el estrés salino (Sahu *et al.*, 2010). Además, en el ajuste osmótico existen compuestos de bajo peso molecular que juegan un papel fundamental en el componente osmótico de la célula, estos son conocidos como osmoreguladores, solutos compatibles u osmolitos en donde su principal función es reducir los efectos negativos que causan la sequía y el componente osmótico de la salinidad, estos compuestos son considerados como un importante mecanismo de tolerancia, que le permiten a la célula mantener su turgor, favorecer la absorción de agua así como impedir su salida (Chaves *et al.*, 2003). Es bien sabido que la biosíntesis de estos compuestos, así como su acumulación se dan principalmente en vacuola y citosol, tales como iones inorgánicos, azúcares solubles, glicina betaina y Pro que parecen contribuir en gran medida la estabilidad de la membrana (Javadi *et al.*, 2008). La acumulación de estos compuestos a sido estudiado de manera amplia como respuesta a la sequía (Farooq *et al.*, 2009; Marcinska *et al.*, 2013) y salinidad (Shamshiri y Fattahi, 2014). Por tal motivo para este capítulo se tuvo como objetivo realizar un análisis del papel que juega la Pro como compuesto multifuncional en el componente osmótico ante un estrés por salinidad y sequía en el género *Capsicum*.

5.2 ANALISIS SOBRE EL PAPEL DE LA PRO EN LA SALINIDAD Y SEQUIA

Pro tiene una gran importancia en diversos procesos, crecimiento vegetal, desarrollo y estrés. Pro es considerado como un soluto compatible ideal porque es altamente soluble en agua (1.54 kg/L de agua) (Huang *et al.*, 2008). Existen varias especies de plantas que sintetizan la prolina de manera natural y sin condiciones estresantes. Sin embargo, la mayoría de los estudios han sido bajo condiciones de estrés y su acumulación. Bajo condiciones no estresantes, Pro sirve como precursor de la biosíntesis de enzimas y proteínas (Nanjo *et al.*, 1999) y como fuente de energía para el crecimiento vegetal durante la formación de semillas y órganos reproductivos (Mattioli *et al.*, 2009). Pro por tener rigidez conformacional forma parte al igual que es un componente fundamental de las estructuras proteicas (Lehmann *et al.*, 2010; Funck *et al.*, 2012). Adicionalmente, Pro tiene la función como fuente o posa de almacenamiento para las demandas celulares de carbono y nitrógeno (Kavi-Kishor *et al.*, 2005).

Por otro lado, Pro en periodos de estrés (sequía y salinidad) se ha visto que su acumulación correlaciona con fuertemente y este parámetro es utilizado como marcador de estrés. Pro tiene como principal función actuar como molécula osmoprotectante u osmolito, alivia el deterioro causado por los efectos oxidativos y osmóticos que son inducidos por el estrés. Durante un estrés salino y de sequía, la acumulación de Pro se incrementa en el citosol y con ello se involucra fuertemente en el ajuste osmótico, regula el potencial redox celular (Heuer, 2003), confiere estabilidad a las membranas y proteínas (Suprasanna *et al.*, 2014), y por último tiene la función de depurar los radicales libres que se producen por el estrés oxidativo (Matysik *et al.*, 2002; Kavi-Kishor y Sreenivasulu, 2014).

Dentro de los resultados obtenidos en este estudio al cuantificar el contenido de Pro en presencia de sal (150 mM de NaCl) en diferentes tiempos de tratamiento (capítulo III), se puntualizar que la acumulación de Pro podría estar fuertemente relacionada con la presencia de estrés salino y su mayor acumulación se alcanza en las hojas con cerca de

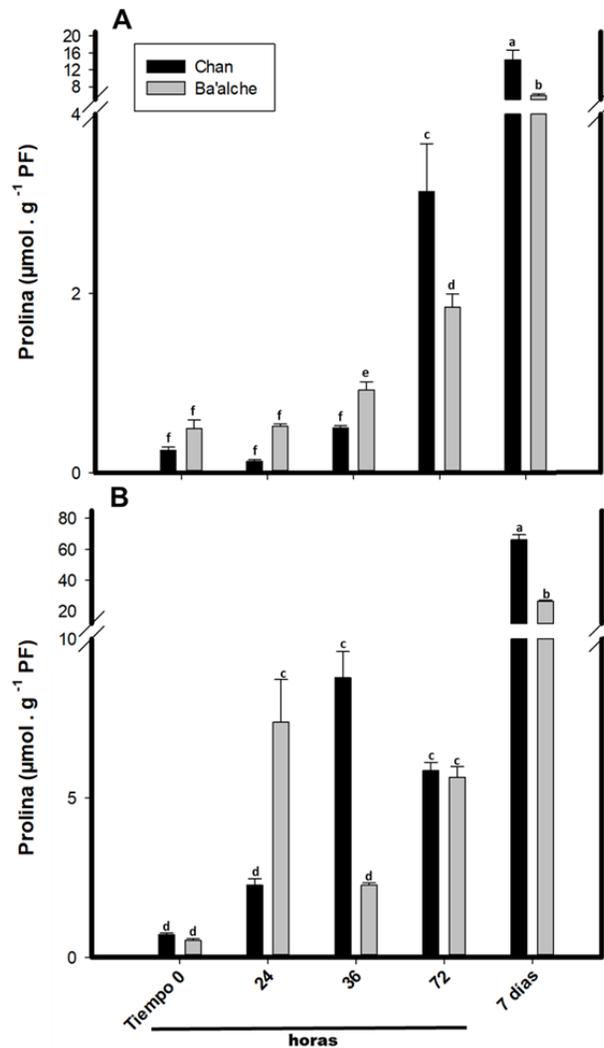


Figura 6.1 Contenido de Pro en raíces (A) y hojas (B) de las plantas testigo y plantas sometidas a una concentración de 150 mM de NaCl de las variedades Chan y Ba'alche.

20 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ PF en la variedad tolerante (Chan), en raíces en presencia de sal a partir de las 24 h la planta ya comienza la acumulación de dicho aminoácido, si esto lo analizamos con resultados previos en el laboratorio (Aguilar-Caamal, 2014) con un estrés hídrico (sequia), la Pro se empieza acumular a partir de los 14 días en ausencia de riego, cabe mencionar que para ambos tipos de estrés (salinidad y sequia) de igual manera la acumulación depende mucho de la especie de Chile, ya que está documentado que cada especie responde de manera diferente a algún estrés en particular. Está bien documentado que la concentración de Pro en raíces y hojas se incrementa con un estrés osmótico que es producido por ambos tipos de estrés mencionados con anterioridad, el incremento de prolina se da mayormente en hojas que en raíces (Panahi, 2009), esto

concuerta con ambas figuras para este análisis.

Los resultados obtenidos en el capítulo III, muestran que la variedad Chan (tolerante) logro una acumulación de prolina mayor que la variedad Ba'alche a partir de las 36 hrs de tratamiento con sal en ambos órganos (raíz y hoja), analizando el órgano de la raíz en salinidad, la variedad Chan mantiene sus niveles de Pro desde el tiempo cero hasta las 36 hrs, mientras que la variedad Ba'alche solo en el tiempo cero y 24 hrs tiene los mismo niveles que Chan, dado que a las 36 hrs tuvo un aumento cerca de $1 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ PF y de este tiempo hasta los siete días siempre presento un aumento de este aminoácido.

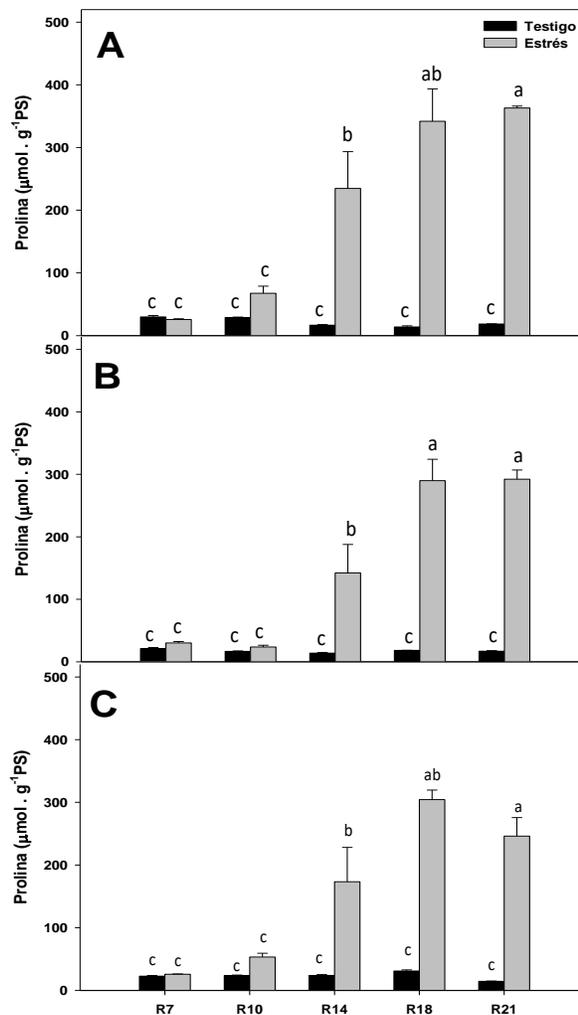


Figura 6.2 Concentraciones de prolina en hojas de *C. chinense* (variedades Génesis y Rex) y *C. annuum* (variedad Padrón) en etapa de estrés. Plantas sometidas a diferentes regímenes de riego (barras grises), cada 7 días (R7, -0.102 MPa), cada 10 días (R10, -0.857 MPa), cada 14 días (R14, -2.04 MPa), cada 18 días (R18, -5.829 MPa) y cada 21 días (R21, -10.273 MPa). Los

testigos son plantas regadas diariamente a capacidad de campo (barras negras) (1 litro de agua, -0.00 MPa). Medias con las mismas literal son estadísticamente iguales (Tukey $P \leq 0.05$). Donde A= Génesis, B= Rex, C= Padrón.

Así mismo, en el órgano de la hoja en presencia de salinidad, como se mencionó anteriormente, en este órgano se detectó la mayor acumulación y fue en la variedad tolerante presentando cerca de $80 \mu\text{mol. g}^{-1}$ PF. Analizando el comportamiento en los niveles de este aminoácido, este órgano logro acumular Pro desde las 24 hrs presentando cerca de $8 \mu\text{mol.g}^{-1}$ PF para la variedad sensible mientras que Chan se mantuvo aproximadamente en $2 \mu\text{mol.g}^{-1}$ PF, a partir de las 36 hrs la variedad Chan aumenta sus niveles de Pro hasta los 7 días, mientras que Ba'alche disminuye en este tiempo (36 hrs) a niveles similares a Chan a las 24 hrs. Basado en resultados previos, la Pro se puede considerar como un marcador de estrés salino ya que se ha visto que con el incremento en los niveles osmóticos de -1 y -2 MPa se alcanzó una máxima acumulación de Pro en pistacho (*Pistacia vera*) (Shamshiri y Fattahi, 2014).

Pro es considerado como un importante soluto orgánico que juega un papel fundamental como depósito de energía para la regular el potencial redox (Hong-Boa *et al*, 2006), depurador de radicales hidroxilos, osmoticom citosolico (Kishore *et al.*, 2005) y también se sabe que forma parte de proteínas que componen la pared celular. De esta manera se puede sugerir que un genotipo con mayor contenido de Pro podría ser más resistente para una condición de estrés.

Si analizamos el comportamiento de Pro en hojas de plantas que fueron sometidas a un estrés por sequía (figura 6.2), en primera estancia podemos notar que su acumulación en este tipo de estrés es aproximadamente diez veces con respecto a lo cuantificado en salinidad, alcanzo valores cercanos a los $400 \mu\text{mol.g}^{-1}$ PS, lo que nos queda claro es que este aminoácido se acumula mayormente en este órgano para proteger la parte aérea del daño causado por este estrés, principalmente al aparato fotosintético y la perdida de agua, lo que también se pudo observar en presencia de salinidad. Así mismo, los tres genotipos de chile: Padrón (*C. annuum*), Génesis y Rex (*C. chinense*) presentan un comportamiento similar y su acumulación de Pro se da a partir de día 14 hasta los 21 días de estrés por sequía, lo que sugiere su importante participación en este órgano, principalmente la protección de la deshidratación y muerte.

En resumen, se puede concluir que la prolina en estos dos tipos de estrés tiene un papel fundamental sobre todo en el ajuste osmótico, protección principalmente en la parte aérea y posiblemente podría tener un papel fundamental como donador de energía cuando ocurre su catabolismo. Esto dado que Pro es conocido como un aminoácido multifuncional que participa y actúa en un amplio rango de eventos tanto en estrés y sin el (Szabados y Savoure, 2010) y como se ha mencionado con anterioridad, representa un marcador bioquímico potencial para la tolerancia a la salinidad en plantas (Ashraf y Harris, 2004). La variedad Rex (Mayan Chan) ha mostrado ser una variedad tolerante para ambos tipos de estrés y podría ser objeto de estudio para otro tipo de pruebas que demuestren el porqué de su tolerancia tanto en sequia como en salinidad. Las hojas son el mayor sitio de síntesis de Pro (órgano fuente) y algunos estudios sugieren que la acumulación en este órgano se da para mantener la clorofila y el turgor celular, así como para proteger la actividad fotosintética bajo condiciones de estrés por salinidad y sequia (Yildiztugay *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013).

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN GENERAL

Como sabemos, la gran mayoría de las plantas que son cultivadas y que sirven como alimento para cubrir toda la demanda mundial se componen en gran medida de glicofitas, las cuales se ha observado que son sensibles a altas concentración de sales en la solución del suelo, de todas las sales que están presentes en el suelo, se ha observado que el compuesto más dañino para las plantas es el NaCl, este se conoce que es perjudicial para las plantas, dado que afecta su crecimiento, rendimiento y la calidad de los frutos. Sin embargo, los chiles (*Capsicum* ssp) al ser uno de los principales cultivos a nivel mundial con gran derrama económica, no están exentos a padecer los efectos de un suelo salino a lo largo de todo su ciclo vegetativo, esto podría deberse a que el suelo, por su desgaste, torna disponibles algunas sales por o también con el riego con altos contenidos de sales (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2012). A pesar de la toxicidad de la salinidad que se presenta dentro de las especies que componen el género *Capsicum* y de manera general en la familia de las *Solanaceas*, se ha observado que existen variedades que difieren en la tolerancia y sensibilidad a estrés por NaCl, incluso se han observado diferencias dentro de la misma especie (Aktas *et al.*, 2006).

En el presente trabajo se tuvo como primer objetivo, caracterizar cuatro variedades de *C. chinense* (Mayan Chan, Mayan Kisín, Mayan Ba'alche) y por último la variedad comercial (Génesis). Con base a la medición de diferentes parámetros se tuvo como resultado dos variedades que presentaron lados opuestos respecto a la sensibilidad al NaCl las cuales fueron: Mayan Chan y Mayan Ba'alche, al determinar el porcentaje de recuperación se obtuvo que la variedad Chan mostro un 100 % de recuperación y por otro lado Ba'alche que mostro un 58 %, cabe mencionar que pudimos deducir que las variedades rojas podrían ser consideradas como variedades tolerantes a una concentración de 150 mM de NaCl a comparación de las variedades naranjas que se ha observado que son más sensibles como es el caso de Ba'alche. Estos resultados son comparables y similares a lo reportado por Bojórquez-Quintal, (2014b) dado que también obtuvo que la variedad Rex (Mayan Chan) mostro ser más tolerante que la variedad comercial Chichen-Itza (variedad naranja) a una concentración de 150 mM de NaCl. De igual manera nuestros resultados son comparables con lo reportado por Bojórquez-Quintal *et al.*, (2016), cuyos estudios confirman que la variedad Chan podría ser considerada como tolerante puesto que en

condiciones *In vitro* se pudo observar que esta variedad mantiene su crecimiento en la raíz principal a una concentración de 150 mM por un tiempo de ocho días, mientras que Chichen-Itza y una variedad naranja, disminuyen su crecimiento en la raíz principal. Entonces se puede sugerir que la concentración de NaCl de 150 mM podría ser considerada como una concentración tóxica para la mayoría de las especies dentro del género *Capsicum*, sin embargo, la afectación a esta dosis también depende del genotipo, especie y condición de crecimiento (Aktas *et al.*, 2006). Dados todos los resultados que se encontraron en el primer objetivo de este trabajo, así como los reportes, sugieren que la variedad Chan tiene mecanismos que ha desarrollado a lo largo de su evolución para poder tolerar o evitar el efecto tóxico que causa el NaCl. Cabe mencionar que parte de todas las determinaciones que se realizaron en el primer objetivo que pudo determinar que tanto Chan como Ba'alche fueron utilizadas para los estudios siguientes.

La acumulación de Pro es considerada como una de las respuestas más comunes e importantes para muchas especies de plantas cuando son sometidas a diversos factores estresantes como son la salinidad, sequía, calor, etc. De hecho, muchos autores mencionan que la Pro es una molécula que cumple diversas funciones para favorecer la tolerancia o crecimiento de las plantas (Szabados y Savoure, 2010), aunque otros autores consideran a este aminoácido como marcador bioquímico para la tolerancia a la salinidad (Ashraf y Harris, 2004). Por tal motivo, como parte del segundo objetivo de este trabajo se planteó evaluar el metabolismo de Pro (transcritos, enzimas y Pro); respecto a los niveles de transcritos en raíz (figura 3.4), a manera de resumen Chan mostró niveles mayores de transcritos en los genes que codifican para las enzimas involucradas en la biosíntesis (*P5CS* y *P5CR*) de Pro esto comparado con Ba'alche, así mismo, el gen de la *PDH* solo se detectaron a partir de las 24 hasta las 72 hrs de tratamiento en Chan sin embargo para Ba'alche los niveles de transcritos apenas se detectaron en todos los tiempos evaluados. Estos resultados son similares a los encontrados por Celik y Atak, (2012) cuando evaluaron al gen de *P5CS* en dos variedades de soya contrastantes en la tolerancia a la salinidad, reportan que la variedad Ustun-1 (tolerante) mostró mayores niveles de transcritos a una concentración de 150 mM de NaCl a los siete días de evaluación. Otros estudios realizados en tomate (*S. lycopersicum* cv. Optima) bajo condiciones de hidroponía.

Se evaluó el efecto de la salinidad sobre una serie de osmolitos que posiblemente están involucrados en la tolerancia a diferentes tipos de estrés (salinidad, calor y una

combinación de estos), reportan que al evaluar los transcritos de genes que codifican para las enzimas involucradas en el metabolismo de Pro, las plantas de tomate bajo condiciones de sal, se encontró que existió una regulación positiva tanto de *P5CS* y *P5CS* en las hojas, cuando las plantas se sometieron por 48 hrs a un estrés por sal, por el contrario en tomate se encontró que *PDH* se mantuvo apagada o en niveles casi indetectables (Rivero *et al.*, 2014) a comparación de nuestros resultados donde la *PDH* de Chan tiene sus mayores niveles de transcritos a las 36 y 72 hrs tanto en raíces como en hojas. Estudios realizados por Saadia *et al.* (2012) en plántulas de canola (*B. napus*) bajo condiciones de salinidad, evaluaron los genes que codifican para las enzimas del metabolismo de Pro en dos variedades, la Dunkled (tolerante) y Cyclone (sensible) y encontraron que ambas variedades mostraron un incremento en la expresión de *P5CS1* a partir de las 6 hasta las 24 hrs en presencia de NaCl en la línea tolerante se aumentó la expresión en las raíces, mientras que en la sensible existió un máximo de expresión de los brotes; así mismo, reportan que la *PDH* hubo una disminución en ambos órganos y ambas líneas de *B. napus*. Además, se observó una marcada reducción de la expresión de este gen en brotes más que en raíces.

Se conoce que la acumulación de Pro se produce como resultado a partir de diferentes escenarios: (a) disminución en la degradación de Pro, (b) incremento en la biosíntesis, (c) una baja utilización, y (d) degradación de proteínas (Delauney y Verma, 1993). En plantas superiores, Pro es sintetizada a partir de dos vías, una por Glu y Orn. Bajo muchas condiciones de estrés, específicamente con salinidad y sequía, a acumulación de Pro está correlacionada con una actividad de P5CS y P5CR, que también se sugiere que pueden ser sitios muy importantes de regulación limitante para la biosíntesis del aminoácido; por otro lado, la acumulación de Pro también depende en gran manera de su degradación, que como se ha mencionado en repetidas ocasiones, la reacción es catalizada por la PDH y al igual que las dos primeras enzimas, PDH es un fuerte blanco para la regulación y acumulación de Pro (Wang *et al.*, 2011). Por tal motivo como parte del objetivo dos, lo siguiente que se evaluó fueron las actividades enzimáticas de P5CS y PDH tanto en raíces como en hojas en tres diferentes tiempos (cero, 72 hrs y siete días), como menciono anteriormente P5CS en las raíces de la variedad Chan mantiene una actividad en el tiempo cero y siete días, sin embargo, a las 72 hrs claramente se ve un aumento al igual que la variedad Ba'alche que mostro su máxima actividad en ese tiempo de evaluación. Nuestros resultados son similares a los encontrados por Huang *et al.* (2013)

cuando evaluaron el efecto del estrés por sal en plantas de *Helianthus tuberosus*, encontraron una mayor actividad de P5CS a las 72 hrs en presencia de 100 mM de NaCl. Por otro lado, se sabe que en las hojas se lleva la mayor parte de la biosíntesis de este aminoácido y de ese órgano puede ser traslocado a cualquier parte de la planta. Nuestros resultados de igual manera sugieren que a las 72 hrs de tratamiento con NaCl en la variedad Chan presentó la mayor actividad de P5CS en comparación de Ba'alche que mantiene su actividad tanto a 72 hrs como a los siete días. Los resultados coinciden con lo reportado por Huang *et al.* (2013) de nueva cuenta, reportan que a las 72 hrs se encontró la mayor actividad de esta enzima en las hojas a una concentración de 100 mM de NaCl. En su trabajo ellos concluyen que la acumulación inducida por salinidad en las plántulas de *H. tuberosus* se da mayormente en las hojas, esto se da como un posible mecanismo para protección de vías metabólicas importantes, aunque de igual manera se da como un mecanismo de adaptación para prevenir los posibles daños al aparato fotosintético y en general a las hojas.

Por lo tanto, a partir de un estrés por sal, la activación de la síntesis de Pro es dada por P5CS con el objetivo de jugar un papel importante de osmo-protección. Sin embargo, concluyen que es importante realizar un extensivo estudio para investigar los cinco genes involucrados en la vía de Pro así como su regulación ante un estrés por NaCl para conocer su posible función. De manera similar a reportes previos hechos en plántulas de *S. amara* (Wang *et al.*, 2011) coinciden con nuestros resultados, donde a una concentración de 100 mM de NaCl tanto en raíces como en hojas, la máxima actividad de P5CS fue encontrada a las 72 hrs de tratamiento, pero al igual que nuestros resultados, la máxima actividad fue en hojas en comparación con las raíces, ellos sugieren que tanto la vía de Glu y Orn fueron activadas por NaCl en respuesta a un tiempo y concentración determinada, pero que la mayor acumulación de Pro viene de la vía de Glu.

Por otro lado, al evaluar la PDH, nuestros resultados muestran que en las raíces la variedad Chan mantiene su actividad en los tres tiempos de evaluación mientras que la Ba'alche a partir de las 72 hrs disminuye su actividad hasta los siete días, esto coincide con Wang *et al.* (2011). Donde observan que a partir de las seis hasta las 72 hrs la actividad de esta enzima disminuye conforme pasa el tiempo de exposición a la sal tanto en raíces como en hojas al igual como sucede en nuestros resultados en hojas puesto que en Chan a las 72 hrs y siete días es menor la actividad a comparación de las plantas testigo en el tiempo cero. De igual manera Rivero *et al.* (2014) reportan que en plántulas

de tomate (*S. lycopersicum*) sometidas a un estrés por salinidad por 48 hrs, las enzimas P5CS Y P5CR, mostraron una mayor actividad en ese tiempo en las hojas mientras que la de degradación (PDH) mantuvo sus niveles bajos a casi indetectables en ese tiempo con respecto a las plantas testigo. Los autores sugieren que la acumulación de diferentes componentes osmoprotectantes, así como la combinación de diferentes tipos de factores estresantes están ligadas fuertemente a un mantenimiento de altos niveles de K^+ y una baja relación Na^+/K^+ . Gracias a estos osmoprotectantes u osmolitos la célula puede tener un mejor funcionamiento y desarrollo, así como el mantenimiento del estatus hídrico celular y el aparato fotosintético.

La Pro es bien conocida por estar involucrada en la respuesta a diferentes tipos y números de ambientes estresantes, particularmente salinidad y sequía. El estrés osmótico es causado por una excesiva acumulación de sales en el suelo, a dicho proceso se le llama salinización. La disminución en el potencial hídrico del suelo da como resultado una alteración en los balances hídricos para la planta que puedan dar como consecuencia en un principio al cierre estomático, reducción en la fotosíntesis e incluso una inhibición en el crecimiento, como sabemos este tipo de estrés principal puede dar lugar a la producción de ROS y la acumulación de iones tóxicos para la célula, causando un daño severo a las estructuras de las membranas, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Apel y Hirt, 2004). Como respuesta al estrés osmótico las plantas han desarrollado mecanismos que le ayudan a sobrellevar el estrés, uno de esos mecanismos es la acumulación de osmolitos o solutos compatibles, que actúan como protectores celulares.

Existen muchos tipos de estos osmolitos de entre los cuales Pro es considerado el de mayor importancia ya que se acumula a lo largo de un número de especies, en respuesta a diferentes tipos de estrés (Hare y Cress, 1997). Pro es una molécula de bajo peso molecular que ayuda a preservar la integridad y el potencial osmótico celular en los diferentes compartimientos de la célula (Iyer y Caplan, 1998). En el presente estudio se ha evaluado el posible papel que tiene Pro a una concentración de 150 mM de NaCl a diferentes tiempos en las dos variedades que difieren en la tolerancia y sensibilidad a este estrés, nuestros resultados son contundentes y se observa que ambas variedades conforme están expuestas a mayor tiempo en presencia de sal, las raíces son capaces de acumular Pro a las 72 hrs y siete días. Sin embargo, la variedad Chan es la que tiene mayor acumulación comparada con Ba'alche. Por otro lado, en las hojas se observa que Ba'alche a partir de las 24 hrs ya tiene cierta cantidad acumulada de Pro, mientras que

Chan a partir de las 36 hrs hasta los siete días, su acumulación es mucho mayor a los siete días comparada con Ba'alche. Estos resultados son similares a los encontrados por Bojórquez-Quintal *et al.* (2014b), en donde la misma variedad que en este estudio (Chan) fue capaz de acumular mayores niveles de Pro en raíces y hojas a los siete días comparada con otra variedad de Chile habanero que mostró sensibilidad a este tipo de estrés (Chichen-Itza). Así mismo se ha observado que en plantas de *S. amara* a una concentración de 100 mM de NaCl se da la mayor acumulación de Pro a las 72 hrs, sin embargo, se reporta que a partir de las 6 hrs de exposición a la sal ya se empieza a acumular Pro (Wang *et al.*, 2011). Otro trabajo que soporta que Pro juega un papel fundamental bajo condiciones de salinidad es el de Freitas *et al.* (2019), cuando evaluaron plantas de sorgo en presencia de sal por siete y 14 días de tratamiento, ellos encontraron que a los siete días en las hojas fue donde se detectó la mayor acumulación de este osmolito y que este disminuye a los 14 días. Ellos concluyen que su estudio contribuye en que la Pro es una molécula que modula procesos bioquímicos y moleculares y que posiblemente la aplicación exógena de este osmolito podría ayudar a mitigar los efectos causados por la salinidad.

La habilidad de las plantas para retener K^+ en las raíces se ha observado que se relaciona con un incremento en la actividad de H^+ -ATPasa o un flujo de salida de H^+ , estos factores podrían contribuir a la repolarización y mantenimiento de un mayor potencial de membrana negativo bajo condiciones de estrés (Zepeda-Jazo *et al.*, 2008; Bose *et al.*, 2013, 2014, 2015). Por otro lado, la homeostasis de iones, así como la retención de K^+ bajo condiciones de salinidad también podría estar asociada a la acumulación de osmolitos compatibles (Chen *et al.*, 2007a; Shabala y Shabala, 2011; Sun *et al.*, 2015). Por tal motivo se evaluó el efecto de NaCl y la aplicación exógena de Pro sobre el flujo de iones en ambas variedades de Chile habanero por medio de la técnica MIFE. Al evaluar el flujo de K^+ y H^+ se encontró que la variedad Ba'alche tiene menor flujo de salida de K^+ comparada con Chan y con el flujo de H^+ los resultados arrojan que Chan tiene un flujo de entrada mientras que Ba'alche tiene salida de H^+ .

Con respecto al flujo de K^+ en la variedad Chan se encontró que es similar a lo publicado por Bojórquez-Quintal *et al.* (2014b) donde esta misma variedad tiene un flujo de salida similar. Sin embargo, con Ba'alche es completamente diferente y podría ser un modelo de estudio nuevo para realizarle preguntas acerca de su comportamiento con respecto al transporte de K^+ en respuesta a estrés. En este trabajo se encontró que al poner las

raíces en presencia de 10 mM de Pro no existe un flujo diferencial entre ambas variedades, pareciendo que a esta concentración del aminoácido no modifica los sistemas de transporte tanto de K^+ como de H^+ . Sin embargo, al poner las raíces de ambas variedades en presencia de ambos compuestos (Pro y NaCl) se observó que Ba'alche disminuye su flujo de salida de K^+ comparado con lo encontrado cuando se le pone solo sal, Chan mantuvo su flujo de salida y parece ser que la Pro no tiene efecto sobre esta variedad. Estos resultados son similares a los reportados por Bojórquez-Quintal *et al.*, (2016), ya que cuando se les aplica exógenamente Pro, la variedad sensible disminuye su flujo de K^+ como en nuestros resultados, mientras que Chan mostro los mismos valores. Y por último cuando se probó una incubación por 1 hr con Pro se pudo observar que no existió una diferencia en los flujos de K^+ comparado con aquellos tratamientos donde solo se puso 150 mM de NaCl.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES GENERALES

A partir de todos los resultados presentados con anterioridad en esta tesis doctoral, se pueden sugerir las siguientes conclusiones en este proyecto:

- La variedad Ba'alche fue la más sensible ante un tratamiento con NaCl [150 mM], mientras que Chan mostro más tolerancia.
- En la raíz y hoja, Chan fue la que mostró mayores niveles de transcritos de *P5CS* y *P5CR* en presencia de NaCl, mientras que en Ba'alche fueron mucho menores estos transcritos en presencia de NaCl.
- Tanto en raíz como en hoja, la variedad Chan fue la que acumulo más prolina durante el tiempo máximo de tratamiento (siete días).
- La actividad de P5CS en raíces fue mayor a las 72 hrs de tratamiento con sal, mientras que en hojas Chan tuvo su máxima actividad en ese mismo tiempo (72 hrs).
- La actividad de PDH en raíces de la variedad Chan se mantuvo en niveles similares mientras que Ba'alche disminuyo su actividad conforme paso el tiempo de exposición a NaCl. En hojas Chan mantuvo una actividad baja cuando estuvo en presencia de NaCl comparada con Ba'alche que siempre tuvo la misma actividad de PDH en los tres tiempos de evaluación.
- La variedad Ba'alche fue la que presentó menos flujo de salida de K^+ en la mayoría de los tratamientos. En flujo de H^+ , Chan fue la que tuvo menos variaciones comparada con Ba'alche.
- La aplicación exógena de Pro favoreció en un menor flujo de salida de K^+ en la Ba'alche mientras que para Chan no tuvo cambios en los diferentes experimentos.
- La Pro es fundamental ante estrés por sal y sequía, en salinidad su síntesis se da a partir de las 24 hrs mientras que en sequia es a los 14 días en ausencia de agua.

PERSPECTIVAS

Los resultados que se presentan en este trabajo permiten realizar nuevas preguntas sobre fenómenos biológicos y otras rutas para descubrir, por lo que se han planteado las siguientes perspectivas para utilizar nuevos modelos de estudio, como pueden ser diferentes especies dentro del mismo género de *Capsicum* ssp. Para evaluar la tolerancia y sensibilidad al NaCl.

- Realizar estudios bajo condiciones *in vitro* para determinar el posible papel de Pro cuando se suplementa de manera exógena en especies sensibles al NaCl.
- Evaluar el efecto del estrés por NaCl en las variedades de Chan y Ba'alche bajo condiciones de invernadero a nivel de producción, calidad del fruto, parámetros de crecimiento y rendimiento.
- Evaluar la posible función de la Pro cuando esta es asperjada en plantas bajo condiciones de invernadero y cuando son sometidas a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico.
- Evaluar otros posibles solutos compatibles que estarían involucrados en conferir tolerancia a un estrés por NaCl.
- Realizar estudios relacionados con la mayoría de los sistemas de transporte involucrados en el transporte de K^+ y Na^+ , a nivel molecular y por medio de estudios electrofisiológicos.
- Caracterizar por medio de electrofisiología, los posibles mecanismos de entrada de Na^+ bajo condiciones de estrés por NaCl, utilizando MIFE, patch clamp o voltage clamp.
- Complementar los estudios de flujo de iones de K^+ y Na^+ de este trabajo con la utilización de bloqueadores farmacológicos para determinar que sistemas de transporte responde a un estrés por NaCl y a la Pro exógena.
- Evaluar las otras enzimas involucradas en el metabolismo de Pro cuando las plantas de chile habanero son sometidas a un estrés por NaCl, estas enzimas son P5CDH y OAT, esto con el fin de conocer que función tienen ante este estrés.

- Medir con la técnica MIFE los flujos de entrada o salida de otros iones (Ca^{2+} , Cl^- y NO_3^-) que podrían estar involucrados en mecanismos de tolerancia o señalización, esto en raíces de chile habanero y bajo un estrés por NaCl.
- Realizar mutantes de chile habanero utilizando a los genes del metabolismo de Pro para evaluarlas bajo diferentes escenarios de estrés.
- Sobreexpresar a los genes involucrados en el metabolismo de Pro en la variedad sensible y evaluar los efectos de otras concentraciones de NaCl.
- Realizar PCR en tiempo real de los genes utilizados en este trabajo para tener un acercamiento mayor a lo que sucede en el metabolismo de Pro bajo las concentraciones estudiadas.

BIBLIOGRAFIA

- Abbas, G., Saqib, M., Rafique, Q., ur-Rahman, M.A, Akhtar, J., ul-Haq, M.A. & Nasim M. (2013). Effect of salinity on grain yield and grain quality of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pak J Agric Sci.*, 50, 185–189.
- Abbasdokht, H. (2011). The effect of hydropriming and halopriming on germination and early growth stage of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Desert*, 16, 61–68.
- Ábraham, E., Hourton-Cabassa, C., Erdei, L. and Szabados, L. (2010). Methods for determination of Proline in plants. *Plant Stress Tolerance, Methods in Molecular Biology*. Pp. 317-331, DOI 10.1007/978-1-60761-702-0_20.
- Abrol, I.P., Yadov, J.S.P., Massiud F.I. (1988). Salt affected soils and their management. *Soil Resours. Manage. Conserv. Ser. FAO Land and water Dev. Div. Bul.* p. 39.
- Acar, O., Türkan, I., Ozdemir, F. (2001). Superoxide dismutase and peroxidase activities in drought sensitive and resistant barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. *Acta Physiol. Plant.* 23, 351-356.
- Adem, G.D., Roy, S.J., Zhou, M., Bowman, J., Shabala, S. (2014). Evaluating contribution of ionic, osmotic and oxidative stress components towards salinity tolerance in barley. *BMC Plant Biology* 14, doi:10.1186/1471-2229-14-113.
- Adly, A.A.M. (2010). Oxidative stress and disease: an updated review, *Res. J. Immunol.* 3, 129-145.
- Aguilar-Caamal, L.F. (2014). Papel de la prolina y la glicina betaina en plantas de chile habanero sometidas a estrés hídrico. Tesis de Maestria en Ciencias Biologicas. Centro de Investigacion Cientifica de Yucatan, A.C. Mexico.
- Ahmad, P., Jaleel, C.A., Sharma, S. (2010). Antioxidant defence system, lipid peroxidation, praline metabolizing enzymes and Biochemical activity in two genotypes of *Morus alba* L. subjected to NaCl stress. *Russ J Plant Physiol.* 57, 509-517.
- Akbarimoghaddam, H., Galavi, M., Ghanbari, A., Panjehkeh, N. (2011). Salinity effects on seed germination and seedling growth of bread wheat cultivars. *Trakia J Sci.*, 9, 43–

50.

- Aktas, H., Abak, K., Cakmak, I. (2006). Genotypic variation in the response of pepper to salinity. *Sci Hort.*, 110, 260-266.
- Aktas, H., Karni, L., Chang, D.C., Turhan, E., Bar-Tal, A., Aloni, B. (2005). The suppression of salinity-associated oxygen radicals production, in pepper (*Capsicum annuum*) fruit, by manganese, zinc and calcium in relation to its sensitivity to blossom end rot. *Physiol Plant.*, 123, 67-74.
- Alemán-Guillén, F. (2009). K⁺ uptake in plants with different salt tolerance. PhD Thesis. Univ. Murcia. Spain.
- Allakhverdiev, S.I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Inaba, M., Murata, N. (2000). Ionic and osmotic effects of NaCl induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiol.*, 123, 1047-1056.
- Almeida, D.M., Oliveira, M.M., Saibo, N.J.M. (2017). Regulation of Na⁺ and K⁺ homeostasis in plants: towards improved salt stress tolerance in crop plants. *Gene Mol Biol.*, 40, 326–345. doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0106
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S., (2002). Role of superoxide dismutases in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot.*, 53, 1331-1341.
- Amtmann, A., Armengaud, P., Volkov, V. (2004). Potassium nutrition and salt stress. In Membrane transport in plant. *Annual Plants Reviews*, Vol 15. Wiley-Blackwell, Oxford, pp 293-339.
- Amtmann, A., Fischer, M., Marsh, E.L., Stefanovic, A., Sanders, D., Schachtman, D.P. (2001). The wheat cDNA LCT1 generates hypersensitivity to sodium in a salt-sensitive yeast strain. *Plant Physiol.*, 126, 1061-1071.
- Amtmann, A. & Sanders, D. (1999). Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Adv Bot Res.*, 29, 75-112.
- Amtmann, A., Troufflard, S., Armengaud, P. (2008). The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiol Plant.*, 133, 682-691.

- Annunziata, M.G., Ciarmiello, L.F., Woodrow, P., Maximova, E., Fuggi, A., Carillo, P. (2017). Durum wheat roots adapt to salinity remodeling the cellular content of nitrogen metabolites and sucrose. *Front Plant Sci.*, 9(7), 2035. doi.org/10.3389/fpls.2016.02035
- Anschütz, U., Becker, D., Shabala, S. (2014). Going beyond nutrition: Regulation of potassium homeostasis as a common denominator of plant adaptive responses to environment. *J Plant Physiol.*, 171, 670-687.
- Apel, K. & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann Rev Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Apse, M.P. & Blumwald, E. (2007). Na⁺ transport in plants. *FEBS Lett.*, 581, 2247-2254.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A., Blumwald, E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis. *Science.*, 285, 1256-1258.
- Aranda, R., Soria, T. & Cuartero, J. (2001). Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Sci.*, 160, 265-272.
- Armengaud, P., Thiery, L., Buhot, N., Grenier-DeMarch, G. & Savouré, A. (2004). Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. *Physiol. Plant.*, 120, 442-450.
- Ashley, M.K., Grant M., Grabov, A. (2006). Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. *J Exp Bot.*, 57, 425-436.
- Ashraf, M. & Harris, P.J.C. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci.*, 166, 3-16.
- Ashraf, M. & Mcneilly, T. (2004). Salinity tolerance in Brassica oilseeds. *Crc Cr Rev Plant Sci.*, 23, 157-174.
- Ashraf, M.Y. & Wu, L. (1994). Breeding for salinity tolerance in plant. *Crit Rev Plant Sci.*, 13, 17-42.
- Aswani, V., Rajsheel, P., Bapatla, R.B., Sunil, B., Raghavendra, A.S. (2019). Oxidative

- stress induced in chloroplasts or mitochondria promotes proline accumulation in leaves of pea (*Pisum sativum*): another example of chloroplast-mitochondria interactions. *Protoplasma.*, 256, 449. doi.org/10.1007/s00709-018-1306-1
- Bates, L.S., Waldren, R. P., Teare, D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil.*, 39, 2005-2007.
- Bazihizina, N., Barrett-Lennard, E.G., Colmer, T.D. (2012). Plant growth and physiology under heterogeneous salinity. *Plant Soil.*, 354, 1-19.
- Benito, B. & Rodríguez-Navarro, A. (2003). Molecular cloning and characterization of a sodium-pump ATPase of the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J.*, 36, 382-389.
- Blaha, G., Stelzl, U., Spahn, C.M.T., Agrawal, R.K., Frank, J., Nierhaus, K.H. (2000). Preparation of functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. *Method Enzymol.*, 317, 292-309.
- Blumwald, E., Aharon, G.S., Apse, M.P. (2000). Sodium transport in plant cells. *Biochem Biophys Acta.*, 1465, 140-151.
- Bojórquez-Quintal, E., Ruiz-Lau, N., Velarde-Buendía, A., Echevarría-Machado, I., Pottosin, Igor., Martínez-Estévez, M. (2016). Natural variation in primary root growth and K⁺ retention in roots of habanero pepper (*Capsicum chinense*) under salt stress. *Funct Plant Biol.* 43, 1114-1125.
- Bojórquez-Quintal, E., Sánchez-Cach, L.A., Ku-González, A., de los Santos-Briones, C., Medina-Lara, M.A., Echevarría-Machado, I., Muñoz-Sánchez, J.A., Hernández-Sotomayor, S.M.T., Martínez-Estévez, M. (2014). Differential effects of aluminum on in vitro primary root growth, nutrient content and phospholipase C activity in coffee seedlings (*Coffea arabica*). *J Inorg Biochem.*, 134, 39-48.
- Bojórquez-Quintal, E., Velarde-Buendía, A., Ku-González, A., Carrillo-Pech, M., Ortega-Camacho, D., Echevarría-Machado, I., Pottosin, I. & Martínez-Estévez, M. (2014b). Mechanisms of salt tolerance in habanero pepper plants (*Capsicum chinense* Jacq.): proline accumulation, ions dynamics and sodium root-shoot partition and compartmentation. *Front. Plant Sci.*, 5, 605.

- Bojórquez-Quintal, J.E., Echevarría-Machado, I., Medina-Lara, F., Martínez-Estevez, M. (2012). Plants' Challenges in a Salinized World: The Case of *Capsicum*. *Afr J Biotechnol.*, 11(72), 13614-13626. doi: 10.5897/AJB12.2145.
- Bonales-Alatorre, E., Pottosin, I., Shabala, L., Chen, Z-H., Zeng, F., Jacobsen, S-E., Shabala, S. (2013a). Differential activity of plasma and vacuolar membrane transporters contributes to genotypic differences in salinity tolerance in a halophyte species, *Chenopodium quinoa*. *Int J Mol Sci.*, 14, 9267-9285.
- Bor, M., Ozdemir, F., Türkan, I. (2003). The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Sci.*, 164, 77-84.
- Borges-Gómez, L., Cervantes-Cárdenas, L., Ruiz-Novelo, J., Soria-Fregoso, M., Reyes-Oregel, V., Villanueva-Couoh, E. (2008). Capsaicinoides en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo diferentes condiciones de humedad y nutrición. *Terra Latinoamericana*. 28, 35-41.
- Bose, J., Rodrigo-Moreno, A., Lai, D., Xie, Y., Shen, W., Shabala, S. (2015). Rapid regulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity is essential to salinity tolerance in two halophyte species, *Atriplex lentiformis* and *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany.*, 115, 481-494. doi:10.1093/aob/mcu219
- Bose, J., Shabala, L., Pottosin, I., Zeng, F., Velarde-Buendía, A.M., Massart, A., Poschenrieder, C., Hariadi, Y., Shabala, S. (2014). Kinetics of xylem loading, membrane potential maintenance, and sensitivity of K⁺-permeable channels to reactive oxygen species: physiological traits that differentiate salinity tolerance between pea and barley. *Plant, Cell & Environment.*, 37, 589-600. doi:10.1111/pce.12180
- Bose, J., Xie, Y., Shen, W., Shabala, S. (2013). Haem oxygenase modifies salinity tolerance in *Arabidopsis* by controlling K⁺ retention via regulation of the plasma membrane H⁺-ATPase and by altering SOS1 transcript levels in roots. *J Exp Bot.*, 64, 471-481. doi:10.1093/jxb/ers343
- Botella, M.A., Martínez, V., Nieves, M., Cerda, A. (1997). Effect of salinity on the growth and nitrogen uptake by wheat seedlings. *J Plant Nutr.*, 20, 793-804.

- Bowler, C. & Fluhr, R. (2000). The role of calcium and activated oxygen as signals for controlling cross-tolerance. *Trends Plant Sci.*, 5, 241-246.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72, 248-254.
- Breusegem, F.V., Slooten, L., Stassart, J.M., Moens, T., Botterman, J., Van Montagu, M., Inze, D. (1999). Overproduction of *Arabidopsis thaliana* FeSOD confers oxidative stress tolerance to transgenic maize. *Plant Cell Physiol.*, 40, 515-523.
- Britto, D.T. & Kronzucker, H.J. (2008). Cellular mechanisms of potassium transport in plants. *Physiol Plant.* 133, 637-650.
- Byrt, C.S., Platten, J.D., Spielmeier, W., James, R.A., Lagudah, E.S., Dennis, E.S., Tester, M., Munns, R. (2007). HKT1;5-like cation transporters linked to Na⁺ exclusion loci in wheat, Nax2 and Kna1. *Plant Physiol.* 143, 1918-1928.
- Cakmak, I. (2005). The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *J Plant Nutr Soil Sci.*, 168, 521-530.
- Celik, Ö. & Atak, Ç. (2012). Evaluation of Proline Accumulation and Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate Synthetase (P5CS) Gene Expression during Salinity Stress in Two Soybean (*Glycine max* L. Merr.) Varieties. *Pol J Environ Stud.*, 21(3), 559-564.
- Celis-Arámulo, T. de J. (2011). Efecto de la distribución heterogénea de nitrato sobre el sistema radical de *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. México.
- Chaitanya, K.V., Rasineni, G.K. and Reddy, A.R. (2009). Biochemical responses to drought stress in mulberry (*Morus alba* L.): evaluation of proline, glycine betaine and abscisic acid accumulation in five cultivars. *Acta Physiol Plant.*, 31, 437-443.
- Chartzoulakis, K. & Klapaki, G. (2000). Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Sci Hort.*, 86, 247-260.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S. (2003). Understanding plant responses to

drought from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol.*, 30, 239-264.

Cheeseman, J.M. (2013). The integration of activity in saline environments: problems and perspectives. *Funct Plant Biol.*, doi:10.1071/FP12285

Chen, C., Dickman, M.B., (2005). Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 3459-3464.

Chen, H. & Jiang, J.G. (2009). Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *J Cell Physiol.*, 219:251–258

Chen, H., An, R., Tang, J.H., Cui, X.H., Hao, F.S., Chen, J., Wang, X.C. (2007a). Overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in an upland rice. *Mol Breeding.*, 19, 215-225.

Chen, Z., Newman, I., Zhou, M., Mendham, N., Zhang, G., Shabala, S. (2005). Screening plants for salt tolerance by measuring K⁺ flux: a case study for barley. *Plant Cell Environ.*, 28, 1230-1246.

Chen, Z., Pottosin, I., Cuin, T.A., Fuglsang, A.T., Tester, M., Jha, D., Zepeda-Jazo, I., Zhou, M., Palmgren, M.G., Newman, I.A., Shabala, S. (2007b). Root plasma membrane transporters controlling K⁺/Na⁺ homeostasis in salt-stressed barley. *Plant Physiol.*, 145, 1714-1725.

Chen, Z., Zhou, M., Newman, I.A., Mendham, N.J., Zhang, G., Shabala, S. (2007c). Potassium and sodium relations in salinised barley tissues as a basis of differential salt tolerance. *Funct Plant Biol.*, 34, 150-162.

Colmenero-Flores, J.M., Martinez, G., Gamba, G., Vazquez, N., Iglesias, D.J., Brumos, J., Talon, M. (2007). Identification and functional characterization of cation-chloride cotransporters in plants. *Plant J.*, 50: 278–292.

Colmer, T.D. & Flowers, T.J. (2008). Flooding tolerance in halophytes. *New Phytol.*, 179, 964-974.

Colmer, T.D., Munns, R., Flowers, T.J. (2005). Improving salt tolerance of wheat and barley: Future prospects. *Aust J Exp Agric.*, 45, 1425-1443.

-
- Corwin, D.L., James, D., Rhoades, Š.J. (2007). Leaching requirement for soil salinity control: steady-state versus transient models. *Agric Water Manag.*, 90, 165-180. doi.org/10.1016/j.agwat
- Coskun, D., Britto, D.T., Jean, Y.K., Kabir, I., Tolay, I., Torum, A.A., Kronzucker, H.J. (2013). K⁺ efflux and retention in response to NaCl stress do not predict salt tolerance in contrasting genotypes of rice (*Oryza sativa* L.). *PLoS ONE.*, 8. doi:10.1371/journal.pone.0057767.
- Cramer, G.R. & Nowak, R.S. (1992). Supplemental manganese improves the relative growth, net assimilation and photosynthetic rates of salt-stressed barley. *Physiol Plant.*, 84, 600-605.
- Cramer, G.R. (2002). Response of abscisic acid mutants of *Arabidopsis* to salinity. *Funct plant biol.*, 29, 561-567.
- Cuin, T.A. and Shabala, S. (2005). Amino acids regulate salinity-induced potassium efflux in barley root epidermis. *Planta.*, 255, 753-761.
- Cuin, T.A. and Shabala, S. (2005). Exogenously supplied compatible solutes rapidly potassium efflux from barley roots. *Plant Cell Physiol.*, 46, 1924-1933.
- Cuin, T.A. & Shabala, S. (2007a). Amino acids regulate salinity-induced potassium efflux in barley root epidermis. *Planta.*, 225: 753-761.
- Cuin, T.A., Betts, S.A., Chalmandrier, R., Shabala, S. (2008). A root's ability to retain K⁺ correlates with salt tolerance in wheat. *J Exp Bot.*, 59, 2697-2706.
- Davenport, R.J., Munoz-Mayor, A., Jha, D., Essah, P.A., Rus, A., Tester, M. (2007). The Na⁺ transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.*, 30, 497-507.
- de Freitas, P.A.F., de Carvalho, H.H., Costa, J.H., Miranda, R. de S., Saraiva, K.D. da C., de Oliveira, F.D.B., Gomes-Filho, E. (2019). Salt acclimation in sorghum plants by exogenous proline: physiological and biochemical changes and regulation of proline metabolism. *Plant Cell Rep.*, 38(3), 403-416. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02382-5>

- de la Peña, R. & Hughes, J. (2007). Improving vegetable productivity in a variable and changing climate. *J. SAT Agric Res.*, 4, 1-22.
- Delauney, A.J. & Verma, D.P.S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.*, 4:215–223.
- Delauney, A.J., Hu, C.A., Kishor, P.B., Verma, D.P. (1993). Cloning of ornithine deltaaminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *J Biol Chem.*, 268, 18673-18678.
- Demidchik, V. (2014). Mechanism and physiological roles of K⁺ efflux from root cells. *J Plant Physiol.*, 171, 696-707.
- Demiral T. & Türkan I. (2004). Does exogenous glycinebetaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment? *J. Plant Physiol.* 161, 1089-1100.
- Demiral, T. & Türkan, I. (2006). Exogenous glycinebetaine affects growth and proline accumulation and retards senescence in two rice cultivars under NaCl stress. *Environ Exp Bot.*, 56, 72-79.
- Demiral, T. & Türkan I. (2005). Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environ Exp Bot.*, 53, 247-257.
- Dionisio-Sese, M.L. & Tobita, S., (1998). Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Sci.*, 135, 1-9.
- Dreyer, I. & Uozumi, N. (2011). Potassium channels in plant cells. *FEBS J.*, 278, 4293-4303.
- Epstein, E. & Bloom, A.J. (2005). Inorganic components of plants. In: Mineral nutrition of plants: principles and perspectives, 2nd edn. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, pp 44-45.
- Escalante-Magaña, C., Aguilar-Caamal, L.F., Echevarría-Machado, I., Medina-Lara, F., Cach, L.S., Martínez-Estévez, M. (2019). Contribution of Glycine Betaine and Proline to Water Deficit Tolerance in Pepper Plants. *HortScience.*, 54(6), 1044-1054.

- FAO. (2015). Technical issues of salt-affected soils.
- FAO. (2008). FAO Land and Plant Nutrition Management Service. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S.M.A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron Sustain Dev.*, 29,185–212.
- Flowers, T.J. (2004). Improving crop salt tolerance. *J Exp Bot.*, 55, 307-319.
- Flowers, T.J., Troke, P.F., Yeo, A.R. (1977). Mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.*, 28, 89-121.
- Foolad, M.R. (2007). Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. *Int J Plant Genom.*, ID 643581–52. doi.org/10.1155/2007/64358
- Fortmeier, R. & Schubert, S. (1995). Salt tolerance of maize (*Zea mays* L.): The role of sodium exclusion. *Plant Cell Environ.*, 18, 1041-1047.
- Foyer, C.H. & Noctor, G. (2003). Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.*, 119, 355-364.
- Foyer, C.H., Souriau, N., Perret, S., Lelandais, M., Kunert, K.J., Pruvost, C., Jouanin, L. (1995). Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiol.*, 109, 1047-1057.
- Foyer, C.H., Descourvieres, P., Kunert, K.J. (1994). Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.*, 17, 507-523.
- Funck, D., Winter, G., Baumgarten, L., Forlani, G. (2012). Requirement of proline synthesis during Arabidopsis reproductive development. *BMC Plant Biol.*, 12 (1), 191.
- Gamba, G., Saltzberg, S.N., Lombardi, M., Miyanoshta, A., Lytton, J., Hediger, M.A., Brenner, B.M., Hebert, S.C. (1993). Primary structure and functional expression of a

- cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 90, 2749-2753.
- Garciadeblas, B., Barrero-Gil, J., Benito, B. & Rodríguez-Navarro, A. (2007). Potassium transport systems in the moss *Physcomitrella patens*: *pphak1* plants reveal the complexity of potassium uptake. *Plant J.*, 52, 1080-1093. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03297.x
- Gierth, M. & Mäser, P. (2007). Potassium transporters in plants - Involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis. *FEBS Letters.*, 581, 2348-2356.
- Gillen, C.M., Brill, S., Payne, J.A., Forbush, B. (1996). Molecular cloning and functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat, and human – a new member of the cation-chloride cotransporter family. *J Biol Chem.*, 271, 16237–16244.
- Göl, D. (2006). Physiological and genetic characterization of salt tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Master of Sci. Thesis. Izmir Institute of Technol. Türkiye pp. 1-15.
- Golldack, D., Quigley, F., Michalowski, C.B., Kamasani, U.R., Bohnert, H.J. (2003). Salinity stress-tolerance and -sensitive rice (*Oryza sativa* L.) regulate AKT1-type potassiumchannel transcripts differently. *Plant Mol Biol.* 51, 71-81.
- Gossett, D.R., Millhollon, E.P., Lucas, M.C. (1994). Antioxidant responses to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Sci.*, 34, 706-714.
- Gratao, P.L., Monteiro, C.C., Tezotto, T., Carvalho, R.F., Alves, L.R., Peters, L.P. and Azevedo, R.A. (2015). Cadmium stress antioxidant responses and root-to-shoot communication in grafted tomato plants. *Biometals.*, 28(5), 803-816.
- Grinstein, S. & Rothstein, A. (1986). Mechanisms of the regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. *J Membr Biol.* 90, 1-12.
- Gueta-Dahan, Y., Yaniv, Z., Zilinskas, B.A., Ben-Hayyim, G. (1997). Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in Citrus. *Planta.* 203, 460-469.
- Gupta, A.S., Webb, R.P., Holaday, A.S., Allen, R.D., (1993). Overexpression of superoxide

dismutase protects plants from oxidative stress. Induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants. *Plant Physiol.*, 103, 1067-1073.

Guzmán, M.S., Torres, I., Gonzáles, M., Mora, M.A., Herrera, M.G., Hernández, D. (2004). Análisis preliminar de compuestos fenólicos y capsaicinoides en variedades de Chile con diferente capacidad pungente. Departamento de Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya. Primera Convención Mundial del Chile. 115-122.

Haas, M. and Forbush, B. (1998). The Na-K-Cl cotransporters. *J Bioenerg Biomembr.*, 30, 161-172.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989). Free Radicals in Biology and Medicine, Clarendon Press.

Hamamoto, S., Horie, T., Hauser, F., Deinlein, U., Schroeder, J.I., Uozumi, N. (2015). HKT transporters mediate salt stress resistance in plants: from structure and function to the field. *Curr Opin Biotechnol.*, 3, 113-120.

Hare, P.D. & Cress, W.A. (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul.*, 21, 79-102.

Hariadi, Y., Marandon, K., Tian, Y., Jacobsen, S-E., Shabala, S. (2011). Ionic and osmotic relations in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) plants grown at various salinity levels. *J Exp Bot.*, 62, 185-193.

Harling, H., Czaja, I., Schell, J., Walden, R. (1997). A plant cation-chloride cotransporter promoting auxin-independent tobacco protoplast division. *EMBO Journal.*, 16, 5855-5866.

Harris, L. (1996). Concepts in zoology. Harper Collins, New York.

Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 51, 463-499.

Hauser, F. & Horie, T. (2010). A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K⁺/Na⁺ ratio in leaves during salinity stress. *Plant Cell Environ.*, 33, 552-565.

- Hawighorst, P. (2007). Sodium and calcium uptake, transport and allocation in *Populus euphratica* and *Populus x canescens* in response to salinity. PhD Thesis. Univ. Göttingen. Germany. pp. 1-12.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J., Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments. *Plant Signal Behav.*, 7, 1456-1466.
- Hernández, J.A., Jimenez, A., Mullineaux, P., Sevilla, F. (2000). Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses. *Plant Cell Environ.*, 23, 853-862.
- Hernández, J.A., Olmos, E., Corpas, F.J., Sevilla, F., del Rio, L.A. (1995). Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Sci.*, 105, 151-167.
- Heuer, B. (2003). Influence of exogenous application of proline and glycinebetaine on growth of salt-stressed tomato plants. *Plant Sci.*, 165 (4), 693–699.
- Hippeli, S. & Elstner, E.F. (1996). Mechanisms of oxygen activation during plant stress: biochemical effects of air pollutants. *J Plant Physiol.* 148, 249-257.
- Hoffmann, E.K. & Dunham, P.B. (1995). Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. *Int Rev Cytol*, 161, 173-262.
- Hong-Boa, S., Xiao-Yan, C., Li-Ye, C., Xi-Ning, Z., Gang, W., Yong-Bing, Y., Chang-Xing, Z., Zan-Min, H. (2006). Investigation on the relationship of proline with wheat anti-drought under soil water deficits. *Colloids Surf B Biointer.*, 53,113–119.
- Hoque, M.A., Okuma, E., Banu, M.N.A., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., Murata, Y. (2007). Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. *J Plant Physiol.*, 164, 553-561.
- Horie, T., Karahara, I., Katsuhara, M. (2012). Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: an overview with the central focus on rice plants. *Rice.*, 5, 1-18.
- Horie, T. & Schroeder, J.I. (2004). Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiol.*, 136, 2457-2462.

- Horie, T., Brodsky, D.E., Costa, A., Kaneko, T., Lo Schiavo, F., Katsuhara, M., Schroeder, J.I. (2011). K⁺ transport by OsHKT2;4 transporter from rice (*Oryza sativa*) with atypical Na⁺ transport properties and competition in permeation of K⁺ over Mg²⁺ and Ca²⁺ ions. *Plant Physiol.*, 156, 1493-1507.
- Horie, T., Yoshia, K., Nakayama, H., Yamada, K., Oiki, S., Shinmyo, A. (2001). Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *Plant J.*, 27, 129-138.
- Hsu, S.Y., Kao, C.H. (2003). Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. *Plant Growth Regul.*, 39, 83-90.
- Hu, C.A., Delauney, A. & Verma, D.S. (1992). A bifunctional enzyme (delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 89, 9354-9358.
- Huang, B., Jin, L., Liu, J.Y. (2008). Identification and characterization of the novel gene GhDBP2 encoding a DRE-binding protein from cotton (*Gossypium hirsutum*). *J Plant Physiol.*, 165 (2), 214-223.
- Huang, X., Zhang, Y., Jiao, B., Chen, G., Huang, S., Guo, F., Shen, Y., Huang, Z., Zhao, B. (2012). Overexpression of the wheat salt tolerance-related gene TaSC enhances salt tolerance in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.*, 63, 5463-5473.
- Huang, Z., Zhao, L., Chen, D., Liang, M., Liu, Z. (2013). Salt stress encourages proline accumulation by regulating proline biosynthesis and degradation in Jerusalem artichoke plantlets. *PLoS One.*, 8:e62085.
- Huang, Z., Zhao, L., Chen, D., Liang, M., Liu, Z., et al. (2013). Salt Stress Encourages Proline Accumulation by Regulating Proline Biosynthesis and Degradation in Jerusalem Artichoke Plantlets. *PLoS ONE.*, 8(4), e62085.
- Iyer, S. & Caplan, A. (1998). Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice. *Plant Physiol.*, 116, 203-211.
- Jaarsma, R., de Vries, R.S.M., de Boer, A.H. (2013). Effect of salt stress on growth, Na⁺ accumulation and proline metabolism in potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. *PLoS*

ONE 8., doi:10.1371/journal.pone.0060183.

Javadi, T., Arzani, K., Ebrahimzadeh, H. (2008). Study of proline, soluble sugar, and chlorophyll A and B changes in nine Asian and one European pear cultivar under drought stress. *Acta Hortic.*, 769, 241-246.

Jia, W., Wang, Y., Zhang, S., Zhang, J. (2002). Salt-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. *J Exp Bot.*, 53, 2201-2206.

Julkowska, M.M. & Testerink, C. (2015). Tuning plant signaling and growth to survive salt. *Trends Plant Sci.*, 20, 586-594.

Kavi-Kishor, P. B., Sangam, S., Amrutha, R.N., SriLaxmi, P., Naidu, K.R., Rao, K.R.S. S., et al. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr Sci.*, 88, 424-438.

Kavi-Kishor, P.B. & Sreenivasulu, N. (2014). Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? *Plant Cell Environ.*, 37(2), 300-311.

Kaya, C. & Higgs, D. (2003). Supplementary potassium nitrate improves salt tolerance in bell pepper plants. *J Plant Nutr.*, 26, 1367-1382.

Kaya, C., Tuna, A.L., Ashraf, M., Altunlu, H. (2007). Improved salt tolerance of melón (*Cucumis melo* L.) by addition of proline and potassium nitrate. *Environ Exp Bot.*, 60, 397-403.

Khan, M.I.R., Iqbal N., Masood, A. and Khan, N.A. (2012). Variation in salt tolerance of wheat cultivars: role of glycine betaine and ethylene. *Pedosphere.*, 22, 746-754.

Kishore, G.K., Pande, S., Podile, A.R. (2005). Biological control of late leaf spot of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with chitinolytic bacteria. *Phytopathology.*, 95, 1157-1165.

Kiyosue, T., Yoshiba, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1996). A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *Plant Cell.*, 8, 1323-1335.

- Koca, H., Ozdemir, F., Türkan, I., (2006). Effect of salt stress on lipid peroxidation and superoxide dismutase and peroxidase activities of *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. *Biol Plant.*, 50, 745-748.
- Koca, M., Bor, M., Ozdemir, F., Türkan, I. (2007). The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environ Exp Bot.*, 60, 344-351.
- Kolupaev, Y.E., Yastreb, T.O., Oboznyi, A.I., Ryabchun, N.I., and Kirichenko, V.V. (2016). Constitutive and cold-induced resistance of rye and wheat seedlings to oxidative stress. *Russ J Plant Physiol.*, 63(3), 326-337.
- Kramer, P.J. & Boyer, J.S. (1985). Cell Water Relations. Water Relations of Plants and Soils. Academic, San Diego, pp 42-83.
- Kronzucker, H.J. & Britto, D.T. (2011). Sodium transport in plants: a critical review. *New Phytol.*, 189, 54-81.
- Kubala, S., Wojtyła, Ł., Quinet, M., Lechowska, K., Lutts, S., Garnczarska, M. (2015). Enhanced expression of the proline synthesis gene P5CSA in relation to seed osmopriming improvement of *Brassica napus* germination under salinity stress. *J Plant Physiol.*, 183, 1-12.
- Kumar, V.M. & Gothandam, K.M. (2014). Impact of Salt on Morphological Characters and Hormonal Regulation in three *Capsicum* Varieties. *Res J Biotech.*, 9, 92-98.
- Laborde, J.A. & Pozo, O. (1984). Presente y pasado del chile en Mexico. Publicación especial No. 85. INIA, SARH. Mexico D.F.
- Lansford, R., Hernandez, J., Enis, P., Truby, D., Mapel, C., (1990). Evaluation of Available Saline Water Resources in New Mexico for the Production of Microalgae. Solar Energy Research Institute, Golden, CO.
- Larcher, W. (1980). Physiological plant ecology. In 2nd totally rev. edition ed., (pp. 303). Berlin and New York: Springer-Verlag.
- Laurie, S., Feeney, K.A., Maathuis, F.J.M., Heard, P.J., Brown, S.J., Leigh, R.A. (2002). A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *Plant J.*, 32, 139-149.

- Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L., Rentsch, D. (2010). Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids.*, 39(4), 949–962.
- Leigh, R.A. & Jones, R.G.W. (1984). A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytologist.*, 97, 1-13.
- Leyva-Morales, C., Magaña-Magaña, M., Góngora-González, S., Pérez-Miranda, L.A. (2005). Estudio estratégico de la cadena agroindustrial chile habanero. Estudio de la trayectoria y prospectivas de los mercados del chile habanero. INIFAP- SAGARPA, Campo Agrícola Experimental, Mocochoá, Yucatán; México.
- Li, Y., Sperry, J.S., Shao, M. (2009). Hydraulic conductance and vulnerability to cavitation in corn (*Zea mays* L.) hybrids of differing drought resistance. *Environ Exp Bot.*, 66, 341-346.
- Long-Solís, J. (1998). *Capsicum* y cultura: la historia del chilli. 2da Edición. Fondo de Cultura Económica. México.
- Lu, Y., Li, N., Sun, J., Hou, P., Jing, X., Zhu, H., Deng, S., Han, Y., Huang, X., Ma, X., Zhao, N., Zhang, Y., Shen, X., Chen, S. (2013). Exogenous hydrogen peroxide, nitric oxide and calcium mediate root ion fluxes in two non-secretor mangrove species subjected to NaCl stress. *Tree Physiol.*, 33, 81-95.
- Lutgens, F.K. & Tarbuck, E.J. (2003). Foundations of earth science. Pearson, New Jersey.
- Maas, E.V. & Nieman, R.H. (1978). Physiology of plant tolerance to salinity. In crop tolerance suboptimal land conditions. Ed. G.A. Jung. ASA Special Publication: Madison. 32, 277-299.
- Maas, E.V. & Hoffman, G.J. (1977). Crop salt tolerance, current assessment. *ASCE J Irrig Drain Div.*, 103:115-134.
- Maathuis, F.J. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr Opin Plant Biol.*, 12, 250-258.
- Maathuis, F.J.M. & Amtmann, A. (1999). K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: The basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. *Ann Bot.*, 84, 123-133.

- Maathuis, F.J.M. & Sanders, D. (1999). Plasma membrane transport in context—making sense out of complexity. *Curr Opin Plant Biol.*, 2, 236-243.
- Maathuis, F.J.M., Ahmad, I., Patishtan, J. (2014). Regulation of Na⁺ fluxes in plants. *Front Plant Sci.*, 5, 467. doi:10.3389/fpls.2014.00467.
- Mahboob, W., Khan, M.A., Shirazi, M.U. (2016). Induction of salt tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings through exogenous application of proline. *Pak J Bot.*, 48, 861-867.
- Mahjan, S. & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys.*, 444, 139-158.
- Marcinska, I., Czyczyło-Mysza, I., Skrzypek, E., Filek, M., Grzesiak, S., Maciej T., Franciszek, G., Janowiak, F., Hura, T., Dziurka, M., Dziurka, K., Nowakowska, A., Quarrie, S.A. (2013). Impact of osmotic stress on physiological and biochemical characteristics in drought-susceptible and drought-resistant wheat genotypes. *Acta Physiol Plant.*, 35, 451-461.
- Marschner, H. (1995). Functions of Mineral Nutrients: Macronutrients. *In Mineral Nutrition of Higher Plants (Second Edition)*. Academic Press, London, pp 229-312.
- Marschner, H. (1995). Long-Distance Transport in the Xylem and Phloem and Its Regulation. *In Mineral Nutrition of Higher Plants (Second Edition)*. Academic Press, London, pp 79-115.
- Marschner, H. (1995). Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, San Diego, p. 889.
- Martínez-Cordero, M.A., Martínez, V. & Rubio, F. (2004). Cloning and functional characterization of the high-affinity K⁺ transporter HAK1 of pepper. *Plant Mol Biol.*, 56, 413-421.
- Mattioli, R., Costantino, P., Trovato, M. (2009). Proline accumulation in plants: not only stress. *Plant Signal Behav.*, 4(11), 1016-1018.
- Matysik, J., Alia-Bhalu, B., Mohanty, P. (2002). Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Curr. Sci.*, 82, 525-532.

- McCord, J. M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.*, 108, 652-659.
- McKersie, B.D., Bowley, S.R., Harjanto, E., Leprince, O. (1996). Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 111, 1177-1181.
- Meneguzzo, S., Navari-Izzo, F., Izzo, R. (1999). Antioxidative responses of shoots and roots of wheat to increasing NaCl concentrations. *J Plant Physiol.*, 155, 274-280.
- Meringer, M.V., Villasuso, A.L., Margutti, M.P., Usorach, J., Pasquaré, S.J., Giusto, N.M., Machado, E.E. & Racagni, G.E. (2016). Saline and osmotic stresses stimulate PLD/diacylglycerol kinase activities and increase the level of phosphatidic acid and proline in barley roots. *Environ Exp Bot.*, 128, 69-78.
- Miller, G., Honig, A., Stein, H., Suzuki, N., Mittler, R. & Zilberstein A. (2009). Unraveling delta1-pyrroline-5-carboxylate- proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. *J Biol Chem.*, 284, 26482-26492.
- Mishra, V. & Cherkauer, K.A. (2010). Retrospective droughts in the crop growing season: implications to corn and soybean yield in the Midwestern United States. *Agric For Meteor.*, 150(7-8), 1030-1045.
- Misra, N. & Gupta, A.K. (2005). Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of Green gram. *Plant Sci.*, 169, 331-339.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 7, 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Breusegem, F.V. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.*, 9, 490-498.
- Mittova, V., Tal, M., Volokita, M., Guy, M., (2003). Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in responses to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant Cell Environ.*, 26, 845-856.
- Moller, I.S., Gilliam, M., Jha, D., Mayo, G.M., Roy, S.J., Coates, J.C., Haseloff, J., Tester,

- M. (2009). Shoot Na⁺ exclusion and increase salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na⁺ transport in Arabidopsis. *Plant Cell.*, 21, 2163-2178.
- Moscone, E.A., Scaldaferrro, M.A., Grabiele, M., Cecchini, N.M., Sánchez-García, Y., Jarret, R., et al. (2007). The evolution of chili peppers (*Capsicum-Solanaceae*): a cytogenetic perspective. *Acta Hort.*, 745, 137-170.
- Munns, R. (1993). Physiological processes limiting plant-growth in saline soils-some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.*, 16, 15-24.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.*, 25, 239-250.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.*, 167, 645-663.
- Munns, R. & Tester, M. (2008). Mechanism of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol.*, 59, 651-681.
- Munns, R., Goyal, S.S., Passioura, J. (2005). The impact of salinity stress. In: Blum A. ed. Plant stress online. <http://www.plantstress.com/Articles/index.asp>.
- Munns, R., Husain, S., Rivelli, A.R., James, R.A., Condon, A.G.T., Lindsay, M.P., Lagudah, E.S., Schachtman, D.P., Hare, R.A. (2002). Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. *Plant Soil.*, 247, 93-105.
- Munns, R., James, R.A., Lauchli, A. (2006). Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J Exp Bot.* 57, 1025-1043.
- Munns, R. & Termaat, A. (1986). Whole-Plant Responses to Salinity. *Funct Plant Biol.*, 13, 143-160.
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Sanada, Y., Wada, K., Tsukaya, H., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1999). Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic Arabidopsis thaliana. *Plant J.*, 18(2), 185-193.

- Navarro, J.M., Flores, P., Garrido, C., Martínez, V. (2006). Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chem.*, 96, 66-73.
- Navarro, J.M., Garrido, C., Carvajal, M., Martinez, V. (2002). Yield and fruit quality of pepper plants under sulphate and chloride salinity. *J Hortic Sci Biotech.*, 77, 52-57.
- Newman, I.A. (2001). Ion transport in roots: measurement of fluxes using ion-selective microelectrodes to characterize transporter function. *Plant Cell Environ.*, 24, 1-14.
- Nieves-Cordones, M., Alemán, F., Martínez, V., Rubio, F. (2010). The Arabidopsis thaliana HAK5 K⁺ transporter is required for plant growth and K⁺ acquisition from low K⁺ solutions under saline conditions. *Molecular Plant.*, 3, 326-333.
- Niu, G., Rodriguez, D.S., Cabrera, R., Jifon, J., Leskovar, D., Crosby, K., (2010b). Salinity and soil type effects on emergence and growth of pepper seedlings. *HortScience.*, 45(8), 1265-1269.
- Noctor, G. & Foyer, C.H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 49, 249-279.
- Panahi, B. (2009). Effects of osmotic and salt stresses on water relation parameters of pistachio seedlings. *Plant Ecophysiol.*, 1, 1-8.
- Parida, A.K. & Das, A.B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotox Environ Safe.*, 60, 324-349.
- Parida, A.K., Dagaonkar, V.S., Phalak, M.S. & Aurangabadkar, L.P. (2008). Differential responses of the enzymes involved in proline biosynthesis and degradation in drought tolerant and sensitive cotton genotypes during drought stress and recovery. *Acta Physiol. Plant.*, 30, 619-627.
- Pérez-Alfocea, F., Balibrea, M.E., Santa-Cruz, A., Estan, M.T. (1996). Agronomical and physiological characterization of salinity tolerance in a commercial tomato hybrid. *Plant and Soil.*, 180, 251-257.
- Perry, L., Dickau, R., Zarrillo, S., Holst, I., Pearsall, D.M., Piperno, D.R., et al. (2007). Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp.

- L.) in the Americas. *Science.*, 325, 986-988.
- Pettigrew, W.T. (2008). Potassium influences on yield and quality production for maize, wheat, soybean and cotton. *Physiol Plant.*, 133, 670-681.
- Pitzschke, A., Forzani, C., Hirt, H. (2006). Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxid Redox Signal.*, 8, 1757-1764.
- Plazek, A., Tatrzenska, M., Maciejewski, M., Koscielniak, J., Gondek, K., Bojarczuk, J., Dubert, F. (2013). Investigation of the salt tolerance of new polish bread and durum wheat cultivars. *Acta Physiol Plant.*, 35, 2513-2523. doi.org/10.1007/s1173 8-013-1287-9
- Plett, D.C. & Moller, I.S. (2010). Na⁺ transport in glycophytic plants: what we know and would like to know. *Plant Cell Environ.*, 33, 612-626.
- Qadir, M. (2014). Economics of salt-induced land degradation and restoration. *Nat Resour Forum.*, 38, 282-295.
- Ragel, P., Raddatz, N., Leidi, E.O., Quintero, F.J., & Pardo, J.M. (2019). Regulation of K⁺ Nutrition in Plants. *Front plant sci.*, 10, 281. doi:10.3389/fpls.2019.00281
- Rana, V., Ram, S., Nehra, K., Sharma, I. (2016). Expression of genes related to Na⁺ exclusion and proline accumulation in tolerant and susceptible wheat genotypes under salt stress. *Cereal Res Commun.*, 44(3), 404-413.
- Ren, Z.H., Gao, J.P., Li, L.G., Cai, X.L., Huang, W., Chao, D.Y., Zhu, M.Z., Wang, Z.Y., Luan, S., Lin, H.X. (2005). A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat Genet.*, 37, 1141-1146.
- Rengasamy, P. (2002). Transient salinity and subsoil constraints to dryland farming in Australian sodic soils: an overview. *Aust J Exp Agric.*, 42, 351-61.
- Rengasamy, P. (2010). Osmotic and ionic effects of various electrolytes on the growth of wheat. *Aus J Soil Res.*, 48, 120-124.
- Ribarits, A., Abdullaev, A., Tashpulatov, A., Richter, A., Heberle-Bors, E. & Touraev, A. (2007). Two tobacco proline dehydrogenases are differentially regulated and play a

- role in early plant development. *Planta.*, 225, 1313-1324.
- Rivero, R.M., Mestre, T.C., Mittler, R., Rubio, F., Garcia-Sanchez, F., Martinez, V. (2014). The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants. *Plant Cell Environ.*, 37, 1059-1073.
- Rodriguez-Navarro, A. (2000). Potassium transport in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta – Reviews on Biomembranes.*, 1469, 1-30.
- Rodríguez-Navarro, A., Quintero, F.J., Garcíadeblas, B. (1994). Na⁺-ATPases and Na⁺/H⁺ antiporters in fungi. *Biochim Biophys Acta.*, 1187, 203-205.
- Rodríguez-Rosales, M.P., Jiang, X., Gálvez, F.J., Aranda, M.N., Cubero, B., Venema, K. (2008). Overexpression of the tomato K⁺/H⁺ antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. *New Phytologist.*, 179, 366-377.
- Roosens, N.H., Thu, T.T., Iskandar, H.M. & Jacobs, M. (1998). Isolation of ornithine-d-amino transferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 117, 263-271.
- Roxas, V.P., Lodhi, S.A., Garrett, D.K., Mahan, J.R., Allen, R.D. (2000). Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/ glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol.*, 41, 1229-1234.
- Roxas, V.P., Smith, Jr.R.K., Allen, E.R., Allen, R.D. (1997). Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat. Biotechnol.*, 15, 988-991.
- Roy, D., Basu, N., Bhunia, A., Banerjee, S.K. (1993). Counteraction of exogenous L-proline with NaCl in salt-sensitive cultivar of rice. *Biol Plant.*, 35, 69-72.
- Ruan, C.J., da Silva, J.A.T., Mopper, S., Qin, P., Lutts, S. (2010). Halophyte improvement for a salinized world. *Crit Rev Plant Sci.*, 29, 329-359.
- Rubio, F., Gassmann, W., Schroeder, J.I. (1995). Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science.* 270, 1660-1663.

- Rubio, J.S., Garcia-Sanchez, F., Rubio, F., Martinez, V. (2009). Yield, blossom-end rot incidence, and fruit quality in pepper plants under moderate salinity are affected by K⁺ and Ca²⁺ fertilization. *Sci Hort.* 119, 79-87.
- Rus, A.M., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. (2005). Unraveling salt tolerance in crops. *Nat Genet.*, 37, 1029-1030.
- Rus, A., Lee, B.H., Munoz-Mayor, A., Sharkhuu, A., Miura, K., Zhu, J.K., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. (2004). AtHKT1 facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition in planta. *Plant Physiol.* 136, 2500-2511.
- Saadia, M., Jamil, A., Akram, N.A., Ashraf, M. (2012). A Study of Proline Metabolism in Canola (*Brassica napus* L.) Seedlings under Salt Stress. *Molecules.*, 17, 5803-5815.
- Sahu, S., Das, P., Ray, M., Sabat, S.C. (2010). Osmolyte modulated enhanced rice leaf catalase activity under salt-stress. *Adv Biosci Biotechnol.*, 1:39-46.
- Sairam, R.K. & Tyagi, A. (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr Sci.*, 86, 407-421.
- Salazar-Olivo, L.A. & Silva-Ortega, C.O. (2004). Efectos farmacológicos de la capsaicina, el principio pungente del chile. *Biologia Scripta.*, 1, 7-14.
- Santa-María, G.E., Rubio, F., Dubcovsky, J., Rodríguez-Navarro, A. (1997). The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *Plant Cell.*, 9, 2281-2289.
- Santiago-Antonio, G., Lizama-Gasca, M.G., Carrillo-Pech, M., Echevarría-Machado, I. (2014). Natural variation in response to nitrate starvation among varieties of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Aust J Crop Sci.*, 8, 523-535.
- Santos, C.V., Campos, A.H., Azevedo, & Caldeira, G. (2001). In situ and in vitro senescence induced by KCl stress: nutritional imbalance, lipid peroxidation and antioxidant metabolism. *J Exp Bot.*, 52(355), 351-360.
- Schachtman, D.P., Kumar, R., Schroeder, J.I., Marsh, E.L. (1997). Molecular and functional characterization of a novel lowaffinity cation transporter (LCT1) in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94, 11079-11084.

- Schulze, L.M., Britto, D.T., Li, M., Kronzucker, H.J. (2012). A pharmacological analysis of high-affinity sodium transport in barley (*Hordeum vulgare* L.): a $^{24}\text{Na}^+ / ^{42}\text{K}^+$ study. *J Exp Bot.*, 63, 2479-2489.
- Segen, J.C. & Stauffer, J. (1998). The patient's guide to medical tests. Checkmark books, New York.
- Sekmen, A.H., Türkan, I., Takio, S. (2007). Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant *Plantago marítima* and salt-sensitive *Plantago media*. *Physiol Plant.* 131, 399-411.
- Serrano, R. & Rodríguez-Navarro, A. (2001). Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr Opin Cell Biol.* 13, 399-404.
- Serrano, R., Mulet, J.M., Rios, G., Marquez, J.A., de Larrinoa, I.F., Leube, M.P., Mendizabal, I., Pascual-Ahuir, A., Proft, M., Ros, R., Montesinos, C. (1999). A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J Exp Bot.*, 50, 1023-1036.
- Shabala, S. & Shabala, L. (2011). Ion transport and osmotic adjustment in plants and bacteria. *Biomol Concepts.*, 2, 407-419.
- Shabala, S. & Cuin, T.A. (2008). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiol Plant.*, 133, 651-669.
- Shabala, S. (2003). Regulation of potassium transport in leaves: From molecular to tissue level. *Ann Bot.*, 92, 627-634.
- Shabala, S. (2013). Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Ann Bot.*, 112, 1209-1221.
- Shabala, S. & Pottosin, I. (2014). Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: Implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiol Plant.*, 151, 257-279.
- Shabala, S., Demidchik, V., Shabala, L., Cuin, T.A., Smith, S.J., Miller, A.J., Davies, J.M., Newman, I.A. (2006). Extracellular Ca^{2+} ameliorates NaCl-induced K^+ loss from *Arabidopsis* root and leaf cells by controlling plasma membrane K^+ -permeable

channels. *Plant Physiol.*, 141, 1653-1665.

Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., Taj, M. (2001). Response of cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: the root antioxidative system. *Physiol Plant.*, 112, 487-494.

Shamshiri, M.H. & Fattahi, M. (2014). Evaluation of two biochemical markers for salt stress in three pistachio rootstocks inoculated with arbuscular mycorrhiza (*Glomus mosseae*). *J Stress Physiol Biochem.*, 10 (1), 335-346.

Sharma, S., Villamor, J.G. & Verslues, P.E. (2011). Essential role of tissue- specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiol.*, 157, 292-304.

Shi, H.Z., Ishitami, M., Kim, C.S., Zhu, J.K. (2000). The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 97, 6896-6901.

Shi, H., Lee, B., Wu, S.J., Zhu, J.K. (2003). Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in Arabidopsis thaliana. *Nat Biotechnol.*, 21, 81-85.

Singh, S., Grover, K., Begna, S., Angadi, S., Shukla, M., Steiner, R., Auld, D. (2014). Physiological response of diverse origin spring safflower genotypes to salinity. *J Arid Land Stud.*, 24, 169-174.

Smethurst, C.F., Rix, K., Garnett, T., Auricht, G., Bayart, A., Lane, P., Wilson, S.J., Shabala, S. (2008). Multiple traits associated with salt tolerance in lucerne: revealing the underlying cellular mechanisms. *Funct Plant Biol.*, 35, 640-650.

Smirnoff, N. & Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry.*, 28, 1057-1060.

Sreenivasula, N., Grimn, B., Wobus, U., Weschke, W. (2000). Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt tolerant and salt sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). *Physiol Plant.*, 109, 435-442.

Stines, A.P., Naylor, D.J., Hoj, P.B., & Heeswijck, R.V. (1999). Proline accumulation in

- developing grapevine fruit occurs independently of changes in the level of pyrroline-5-carboxylate synthetase mRNA or protein. *Plant Physiol.* 120, 923-931.
- Sun, J., Dai, S., Wang, R., Chen, S., Li, N., Zhou, X., et al. (2009). Calcium mediates root K^+/Na^+ homeostasis in poplar species differing in salt tolerance. *Tree Physiol.* 29, 1175-1186.
- Sun, Y., Kong, X., Li, C., Liu, Y., Ding, Z. (2015). Potassium Retention under Salt Stress Is Associated with Natural Variation in Salinity Tolerance among *Arabidopsis* Accessions. *PLOS ONE.*, 10(5), e0124032. doi.org/10.1371/journal.pone.0124032
- Sunarpi, H.T., Motoda, J., Kubo, M., Yang, H., Yoda, K., Horie, R., Chan, W.Y., Leung, H. Y., Hattori, K., Konomi, M., Osumi, M., Yamagami, M., Schroeder, J.I., Uozumi, N. (2005). Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na^+ unloading from xylem vessels into xylem parenchyma cells. *Plant J.*, 44, 928-938.
- Suprasanna, P., Rai, A.N., HimaKumari, P., Kumar, S.A., Kavi-Kishor, P.B. (2014). Modulation of proline: implications in plant stress tolerance and development. In: *Plant Adaptation to Environmental Change*. CAB International, Oxfordshire, pp. 68–96.
- Szabados, L. & Saviouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.*, 15, 89-97.
- Szabolcs, I. (1989). *Salt-Affected Soils*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Tavakkoli, E., Rengasamy, P., McDonald, G.K. (2010). The response of barley to salinity stress differs between hydroponics and soil systems. *Funct Plant Biol.*, 37, 621-633. doi:10.1071/FP09202.
- Tester, M. & Davenport, R. (2003). Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. *Ann Bot.*, 91, 503-507.
- Torres, M.A. & Dangl, J.L. (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol.*, 8, 397-403.
- Tun, J.C. (2001). Chile habanero, características y tecnología de producción. INIFAP, Yucatán, México.

- Tunuturk, M., Tuncturk ,R., Yildirim, B., Ciftci, V. (2011). Effect of salinity stress on plant fresh weight and nutrient composition of some Canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Afr J Biotech.* 10, 1827-1832.
- Türkan, I., Bor, M., Ozdemir, F., Koca, H. (2005). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated wáter stress. *Plant Sci.*, 168, 223-231.
- USDA-ARS. (2008). Research Databases. Bibliography on Salt Tolerance. *George E. Brown, Jr. Salinity Lab. US Dep. Agric., Agric. Res. Serv. Riverside, CA.* <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8908>
- Van Breusegem, F., Vranova, E., Dat, J.F., Inze, D. (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci.*, 161, 405-414.
- Verbruggen, N. & Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids.*, 35, 753-759.
- Verslues, P.E., & Sharma, S. (2010). Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *The arabidopsis book.*, 8, e0140. doi:10.1199/tab.0140
- Vinocur, B., & Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr Opin Biotechnol.*, 16, 123-132.
- Wakeel, A., Farooq, M., Qadir, M. & Schubert, S. (2011). Potassium Substitution by Sodium in Plants. *Crit Rev Plant Sci.*, 30 (4), 401-413.
- Wang, H., Tang, X., Wang, H., Shao, H.B. (2015). Proline accumulation and metabolism-related genes expression profiles in *Kosteletzkyia virginica* seedlings under salt stress. *Front Plant Sci.*, 6, 792.
- Wang, J., Zhang, H., Allen, R.D., (1999). Overexpression of an *Arabidopsis* peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant Cell Physiol.*, 40, 725-732.
- Wang, K., Liu, Y., Dong, K., Dong, J., Kang, J., Yang, Q., Zhou, H. & Sun, Y. (2011). The effect of NaCl on proline metabolism in *Saussurea amara* seedlings. *Afr J*

Biotechnol., 10(15), 2886-2893.

Wang, M., Zheng, Q., Shen, Q., Guo, S. (2013). The critical role of potassium in plant stress response. *Int J Mol Sci.*, 14, 7370-7390.

Wang, S.M., Zhang, J.L., Flowers, T.J. (2007). Low-affinity Na⁺ uptake in the halophyte *Suaeda maritima*. *Plant Physiol.*, 145, 559-571.

Wang, W.X., Vinocur, B., Altaman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*. 218, 1-14.

Ward, J.M., Hirschi, K.D., Sze, H. (2003). Plants pass the salt. *Trends Plant Sci.*, 8, 200-201.

Waters, S., Gilliam, M., Hrmova, M. (2013). Plant high-affinity potassium (HKT) transporters involved in salinity tolerance: structural insights to probe differences in ion selectivity. *Int J Mol Sci.*, 14, 7660-7680.

White, P.J., Bowen, H.C., Demidchick, V., Nichols, C., Davies, J.M. (2002). Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochim Biophys Acta.*, 1564, 299-309.

WRRRI (Water Resources Research Institute). (1997). Transboundary Aquifers of the El Paso/Ciudad Juarez/Las Cruces Region. Texas Water Development Board and New Mexico Water Resources Research Institute. U.S. Environmental Protection Agency (Region VI).

Wu, H.H., Shabala, L., Barry, K., Zhou, M.X., Shabala S. (2013). Ability of leaf mesophyll to retain potassium correlates with salinity tolerance in wheat and barley. *Physiol Plant.*, 149, 515-527.

Wu, H., Shabala, L., Zhou, M. & Shabala, S. (2015b). MIFE technique-based screening for mesophyll K⁺ retention for crop breeding for salinity tolerance. *Bio-protocol.*, 5, e1466. <http://www.bio-protocol.org/e1466>.

Wu, H., Zhu, M., Shabala, L., Zhou, M. & Shabala, S. (2015a). K⁺ retention in leaf mesophyll, an overlooked component of salinity tolerance mechanism: A case study

- for barley. *J Integr Plant Biol.*, 57, 171-185.
- Wyn Jones, R.G., Brady, C.J., Speirs, J. (1979). Ionic and osmotic relations in plant cells. In *Recent Advances in the Biochemistry of Cereals* (D. L. Laidman and R. G. Wyn Jones, eds.), pp. 63–103. Academic Press, London and Orlando.
- Xiong, L. & Zhu, J.K. (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ.*, 25, 131-139.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinoaki, K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol.*, 57, 781-803.
- Yazici, I., Türkan, I., Sekmen, A.H., Demiral, T. (2007). Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation. *Environ Exp Bot.*, 61, 49-57.
- Yeo, A. (1998). Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J Exp Bot.*, 49, 915-929.
- Yeo, A.R., Caporn, S.J.M., Flowers, S.A. (1985). The Effect of Salinity upon Photosynthesis in Rice (*Oryza sativa* L.): Gas Exchange by Individual Leaves in relation to their Salt Content. *J Exp Bot.*, 36, 1240-1248.
- Yildiztugay, E., Sekmen, A.H., Turkan, I., Kucukoduk, M. (2011). Elucidation of physiological and biochemical mechanisms of an endemic halophyte *Centaurea tuzgoluensis* under salt stress. *Plant Physiol Bioch.*, 49, 816-824.
- Yokoi, S., Bressan, R.A., Hasegawa, M.P. (2002). Salt stress tolerance of plants. JIRCAS Working Report 25-33.
- Zafar, M. (2008). Genetic studies for salt tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). PhD Thesis. University of Agriculture. Faisalabad. Pakistan.
- Zamudio-Moreno, E. (2013). Efecto del estrés hídrico sobre el metabolismo de capsaicinoides en frutos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigacion Cientifica de Yucatan, A.C. Mexico.

- Zepeda-Jazo, I., Shabala, S., Chen, Z., Pottosin, I. (2008). Na⁺-K⁺ transport in roots under salt stress. *Plant Signal Behav.*, 3, 401-403. doi:10.4161/psb.3.6.5429
- Zhang, H.X. & Blumwald, E. (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat Biotechnol.*, 19, 765-768.
- Zhang, J.L., Flowers, T.J., Wang, S.M. (2010). Mechanisms of sodium uptake by roots of higher plants. *Plant Soil.* 326, 45-60.
- Zhang, J-L., Shi, H. (2013). Physiological and molecular mechanisms of plant salt tolerance. *Photosynth Res.*, 115, 1-22.
- Zhang, Y, Liu, Z, Khan, A.A., Lin, Q., Han, Y., Mu, P., Liu, Y., Zhang, H., Li, L., Meng, X., Ni, Z., Xin, M. (2016). Expression partitioning of homeologs and tandem duplications contribute to salt tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sci Rep.*, 6, 1-10.
- Zhani, K., Ben, Fredj, M., Mani, F. & Hannachi, C. (2012b). Impact of salt stress (NaCl) on growth, chlorophyll content and fluorescence of Tunisian cultivars of chili pepper (*Capsicum frutescens* L.). *J Stress Physiol Biochem.*, 8, 236-252.
- Zhani, K., Hermans, N., Ahmad, R. & Hannachi, C. (2013). Evaluation of salt tolerance (NaCl) in Tunisian chili pepper (*Capsicum frutescens* L.) on growth, mineral analysis and solutes synthesis. *J Stress Physiol Biochem.*, 9, 209-228.
- Zhao, F., Song, C.P., He, J., Zhu, H. (2007). Polyamines improve K⁺/Na⁺ homeostasis in barley seedlings by regulating root ion channel activities. *Plant Physiol.*, 145, 1061-1072.
- Zheng, J.L., Zhao, L.Y., Wu, C.W., Shen, B., Zhu, A.Y. (2015). Exogenous proline reduces NaCl-induced damage by mediating ionic and osmotic adjustmen and enhancing antioxidant defense in *Eurya emarginata*. *Acta Physiol Plant.*, 37, 181.
- Zhu, J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu rev plant biol.*, 53, 247-273.
- Zhu, J.K., Liu, J., Xiong, L. (1998). Genetic analysis of salt tolerance in arabidopsis. Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell.*, 10, 1181-1191.

Zhu, J.K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.*, 6, 66-71.

Zhu, J.K. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol.*, 6, 441-445.

Zhu, J.K. (2007). *Plant Salt Stress*: John Wiley & Sons, Ltd.

ANEXO

Cuadro A1 Solución modificada de Hoagland (Martínez-Cordero *et al.*, 2004).

COMPUESTO	Fórmula	Concentración
Macronutrientes		
Nitrato de potasio	KNO_3	1.2 mM
Nitrato de calcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.8 mM
Fosfato de potasio	K_2HPO_4	0.2 mM
Sulfato de magnesio	MgSO_4	0.2 mM
Micronutrientes		
Cloruro de calcio	CaCl_2	50 μM
Ácido bórico	H_3BO_3	12.5 μM
Sulfato de manganeso	MnSO_4	1 μM
Sulfato de zinc	ZnSO_4	1 μM
Sulfato cúprico	CuSO_4	0.5 μM
Molidato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1 μM
Cloruro de níquel	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1 μM
Hierro-ácido etilendiaminotetraacético	Fe-EDTA	10 μM

Cuadro A2. Efecto del estrés salino sobre la biomasa de raíces y hojas de diferentes variedades de chile habanero.

Cultivar	Tratamiento	Raíz (g planta ⁻¹)		Hoja (g planta ⁻¹)	
		PF	PS	PF	PS
Chan	Testigo t0 (-NaCl)	0.157 (0.05)	0.010 (0.003)	0.241 (0.07)	0.024 (0.01)
	Testigo (-NaCl) (7d)	0.289 (0.05)	0.018 (0.003)	0.525 (0.10)	0.052 (0.01)
	+ NaCl (7d)	0.144 (0.03)	0.009 (0.002)	0.155 (0.10)	0.022 (0.01)
	Testigo (-NaCl) (R)	1.206 (0.57)	0.037 (0.015)	0.492 (0.21)	0.130 (0.04)
	+ NaCl (R)	0.192 (0.02)	0.014 (0.002)	0.370 (0.10)	0.033 (0.01)
Kisin	Testigo t0 (-NaCl)	0.111 (0.02)	0.008 (0.002)	0.171 (0.03)	0.016 (0.003)
	Testigo (-NaCl) (7d)	0.204 (0.07)	0.019 (0.005)	0.670 (0.17)	0.055 (0.02)
	+ NaCl (7d)	0.301 (0.07)	0.018 (0.004)	0.354 (0.03)	0.043 (0.01)
	Testigo (-NaCl) (R)	1.685 (0.59)	0.053 (0.018)	0.700 (0.26)	0.157 (0.03)
	+ NaCl (R)	0.195 (0.05)	0.013 (0.003)	0.383 (0.15)	0.031 (0.01)
Ba'alche	Testigo t0 (-NaCl)	0.157 (0.05)	0.012 (0.003)	0.345 (0.10)	0.035 (0.01)
	Testigo (-NaCl) (7d)	0.184 (0.05)	0.023 (0.006)	0.612 (0.09)	0.062 (0.01)
	+ NaCl (7d)	0.393 (0.16)	0.022 (0.008)	0.105 (0.11)	0.015 (0.02)
	Testigo (-NaCl) (R)	1.107 (0.21)	0.055 (0.010)	0.678 (0.12)	0.144 (0.03)
	+ NaCl (R)	0.244 (0.10)	0.016 (0.006)	0.037 (0.05)	0.004 (.005)
Génesis	Testigo t0 (-NaCl)	0.194 (0.07)	0.012 (0.004)	0.254 (0.06)	0.025 (0.01)
	Testigo (-NaCl) (7d)	0.395 (0.09)	0.023 (0.006)	0.645 (0.12)	0.063 (0.02)
	+ NaCl (7d)	0.269 (0.07)	0.022 (0.008)	0.188 (0.11)	0.026 (0.02)
	Testigo (-NaCl) (R)	1.289 (0.39)	0.055 (0.010)	0.641 (0.27)	0.133 (0.007)
	+ NaCl (R)	0.209 (0.04)	0.016 (0.006)	0.151 (0.13)	0.015 (0.013)

* (P<0.05; prueba de Tukey).

Cuadro A3. Efecto del estrés salino sobre parámetros de crecimiento en la parte radicular y aérea de las cuatro diferentes variedades de chile habanero.

Cultivar	Condición o tratamiento	Área (cm ²)		Altura /planta (cm)	# hojas /planta
		Foliar	Radicular		
Chan	Testigo t0 (-NaCl)	13.85 (3.40)	14.90 (4.08)	5.74 (0.40)	7.67 (0.58)
	Testigo (-NaCl) (7d)	34.50 (4.70)	20.79 (3.62)	10.06 (5.45)	10.0 (1.73)
	+ NaCl (7d)	9.196 (2.98)	12.70 (0.86)	5.81 (0.04)	5.0 (2.65)
	Testigo (-NaCl) (R)	92.85 (28.49)	42.15 (15.04)	9.22 (0.63)	13.67 (1.16)
	+ NaCl (R)	18.15 (1.44)	18.09 (0.90)	7.33 (0.69)	11.0 (1.0)
Kisin	Testigo t0 (-NaCl)	10.83 (1.17)	14.50 (2.91)	6.35 (0.45)	7.33 (0.58)
	Testigo (-NaCl) (7d)	40.64 (4.50)	24.05 (3.64)	7.33 (0.67)	10.0
	+ NaCl (7d)	19.35 (1.24)	25.71 (3.42)	6.32 (0.19)	6.67 (0.58)
	Testigo (-NaCl) (R)	107.7 (16.60)	47.40 (1.96)	9.45 (0.46)	13.33 (1.53)
	+ NaCl (R)	17.19 (3.42)	18.05 (2.63)	7.51 (0.73)	8.67 (1.53)
Ba'alche	Testigo t0 (-NaCl)	22.27 (5.73)	15.56 (3.03)	7.84 (1.22)	9.67 (0.58)
	Testigo (-NaCl) (7d)	41.92 (4.93)	24.29 (4.15)	8.10 (0.20)	10.33 (1.16)
	+ NaCl (7d)	10.15 (4.17)	29.40 (8.60)	6.76 (0.84)	1.67 (1.53)
	Testigo (-NaCl) (R)	73.54 (7.40)	46.47 (7.78)	9.69 (0.51)	13.33 (1.16)
	+ NaCl (R)	3.650 (2.43)	21.43 (0.77)	8.54 (0.67)	4.0 (3.61)
Génesis	Testigo t0 (-NaCl)	16.69 (0.59)	17.89 (5.67)	6.93 (0.42)	8.67 (0.58)
	Testigo (-NaCl) (7d)	40.82 (0.98)	32.72 (4.50)	7.72 (0.27)	11.33 (0.58)
	+ NaCl (7d)	12.74 (1.85)	22.87 (1.45)	7.00 (0.47)	5.0 (1.00)
	Testigo (-NaCl) (R)	78.87 (6.97)	45.06 (3.84)	8.86 (0.37)	13.33 (0.58)
	+ NaCl (R)	5.448 (0.94)	19.20 (3.46)	6.91 (0.10)	6.67 (1.53)

* (P<0.05; prueba de Tukey).
