



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Efecto de la salinidad sobre el metabolismo de
prolina en *Agave fourcroydes*.**

Tesis que presenta

Annette Alejandra Torres Jiménez

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: **Bioquímica y Biología
Molecular**)

Mérida, Yucatán, México

2024

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 Annette Alejandra Torres Jiménez titulado **Efecto de la salinidad sobre el metabolismo de prolina en *Agave fourcroydes***, fue realizado en la Unidad de Biología Integrativa, en la línea de investigación de Agrobiología integrativa, en el laboratorio 07 y el laboratorio de marcadores moleculares del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Manuel Martínez Estévez y la codirección del Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Teyer, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dr. José Luis Hernández Stefanoni

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 25 de noviembre de 2024

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de: Materiales y Métodos, Resultados y Discusión de este documento, proviene de las actividades de investigación 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 Federal de Protección a 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 se regirán, en todo caso, por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:



Nombre: Annette Alejandra Torres Jiménez

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca otorgada.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. (CICY) por el uso de sus instalaciones para la realización de este proyecto.

A los Doctores Manuel Martínez Estévez y Lorenzo Felipe Sánchez Teyer mis directores de tesis, por permitirme realizar este trabajo de investigación en sus laboratorios, así como por todas las enseñanzas, aprendizajes, consejos y recomendaciones; pero sobre todo por brindarme su apoyo tanto personal como académico en cada momento.

A mi Comité evaluador, la Dra. Ileana Echevarría Machado, el Dr. Emanuel Bojórquez Quintal y al Dr. Issac Zepeda Jasso por sus comentarios, consejos y aportaciones para la realización de este trabajo.

A los técnicos de laboratorio, Mtros. Fátima Medina Lara, Fabiola Escalante Erosa, Miguel Ángel Keb y Miriam Monforte González, por transmitirme sus conocimientos en el área experimental y brindarme su ayuda en todo momento, para la realización de este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio 07 y del laboratorio de marcadores moleculares, muchas gracias por su apoyo, sus consejos y los momentos agradables en el laboratorio.

Al Dr. Camilo Escalante, la Dra. María José García y la Dra. Elia Ballesteros por su valioso apoyo, recomendaciones, consejos y retroalimentación en este proyecto.

A Nath, Adri, Fran Y Ximena por su inmenso apoyo en todo momento y su amistad, sin ustedes parte de este trabajo no sería lo mismo. Gracias por todas las risas compartidas y por estar en los momentos de duda. Cada platica y cada momento de diversión me motivaron a seguir adelante.

Al Dr. Fulgencio Alatorre y al Dr. Hugo Méndez por compartir conmigo su conocimiento y apoyarme en el área experimental.

A mis compañeros de la Unidad de Biología Integrativa, Samuel, Jorge, Roberto, Diana, Orlando, Mauricio; muchas gracias por todos sus consejos y su apoyo durante mi estancia.

A mi mamá y a mis hermanas por siempre apoyarme, por todo su amor y dedicación en cada etapa de mi vida, gracias por enseñarme a nunca rendirme y siempre echarle ganas, por darme una buena educación, por siempre estar a mi lado, motivándome a seguir adelante y enseñarme a luchar por mis sueños y cumplir todas mis metas.

A Fernando, muchas gracias por tu amor incondicional y por apoyarme en todo momento en cada decisión a lo largo de este proceso. Gracias por estar a mi lado en los momentos más difíciles, por las largas noches de estudio y por creer en mí. Sin ti, este logro no habría sido posible.

Este trabajo es el resultado del esfuerzo colectivo y el aliento de quienes me han rodeado durante este recorrido; a todos ustedes gracias por haber iluminado mi camino con su apoyo y sabiduría, mi más sincero agradecimiento por hacer posible esta tesis.

DEDICATORIAS

Esta Tesis quiero dedicársela a mi familia y amigos, gracias por siempre estar ahí para mí, por sus palabras de aliento y por creer en mis sueños. Cada uno de ustedes ha jugado un papel importante en mi vida, y este logro es también es de ustedes. Estoy profundamente agradecida por el cariño y por formar parte de mi vida.

A mi mamá, por su dedicación, amor y sacrificio. A lo largo de cada etapa de mi vida, tu apoyo incondicional ha sido mi mayor fortaleza. Todo lo que soy y todo lo que he alcanzado, te lo debo a ti.

A mis queridas hermanas Monique y Paola, por enseñarme el valor del esfuerzo y dedicación. Gracias por ser mis segundas madres, por inspirarme siempre a seguir adelante y ser un claro ejemplo de superación. Gracias por ser mis cómplices en muchas cosas y siempre tener fe en mí.

A Fernando por ser mi compañero en este viaje. Tu apoyo incondicional ha sido fuente de motivación, y cada logro en esta tesis es también un reflejo de nuestro esfuerzo juntos.

A mi papá, aunque ya no estes físicamente conmigo, siempre estarás en mi corazón y tu legado me inspira a seguir adelante. Este logro también es para ti.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1. ¿QUÉ ES LA SALINIDAD?	3
1.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS SUELOS SALINOS Y SÓDICOS	3
1.2.1 SUELOS SALINOS.....	4
1.2.2 SUELOS SALINO-SÓDICOS	5
1.2.3 SUELOS SÓDICOS	5
1.3 SALINIDAD EN PLANTAS	5
1.4 AGAVES COMO MODELO DE ESTUDIO.....	11
1.4.1 <i>AGAVE FOURCROYDES</i>	13
1.4.2 CULTIVO DE AGAVE	14
1.4.3 TOLERANCIA DE LOS AGAVES.....	14
1.5 SALINIDAD EN AGAVES	15
1.6 SODIO	16
1.6.1 MECANISMOS DE TRANSPORTE DE SODIO EN LAS PLANTAS	16
1.7 TOLERANCIA A LA SALINIDAD	17
1.8 ABSORCIÓN Y TRANSPORTE DE Na ⁺ EN PLANTAS	18
1.9 PROCESOS DE TRANSPORTE DE Na ⁺ EN LA INTERFAZ SUELO-RAÍZ	19

1.10	PROLINA.....	19
1.10.1	METABOLISMO DE LA PROLINA EN LAS PLANTAS	20
1.10.2	EFEECTO DE LA PROLINA DURANTE EL ESTRÉS SALINO	23
1.10.3	DETECCIÓN, SEÑALIZACIÓN Y TRANSPORTE DE PROLINA.....	24
	JUSTIFICACIÓN	26
	HIPÓTESIS.....	27
	OBJETIVO GENERAL	27
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
	CAPÍTULO II	29
	MATERIALES Y METODOS	29
2.1.	MATERIAL VEGETAL.....	29
2.2.	CUANTIFICACIÓN DE SODIO Y POTASIO.....	29
2.3.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROLINA EN RAÍCES Y HOJAS	29
2.4	EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL Y SÍNTESIS DE ADNc	30
2.5.	EXPRESIÓN SEMICUANTITATIVA DE LOS GENES <i>P5CS</i>, <i>P5CR</i> Y <i>PDH</i> EN AGAVE SOMETIDA A ESTRÉS POR NaCl.	31
2.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
	CAPÍTULO III	33
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33

3.1 RESULTADOS	33
3.2 DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	57
3.3 CONCLUSIONES GENERALES	57
3.4 PERSPECTIVAS	58
BIBLIOGRAFÍA	59

LISTADO DE FIGURAS

Fig. 1 - <i>Agave fourcroydes</i> y fibra extraída de sus hojas (FIRCO, 2017).....	13
Fig. 2 - Sistema de transporte de sodio en plantas (Keisham, <i>et al.</i> , 2018).....	17
Fig. 3 - Metabolismo de prolina en plantas (Khanna-Chopra, R., 2019).	21
Fig. 4 - La vía metabólica de síntesis de prolina en plantas a través del glutamato y la ornitina.....	23
Fig. 5 - Material de partida A) Plantas en condición de invernadero. B) Plantas de <i>Agave fourcroydes</i> en el sustrato.....	33
Fig. 6 - Plantas de <i>A. fourcroydes</i> sometidas a diferentes tratamientos de NaCl.	34
Fig. 7 - Comparación del número de hojas de <i>A. fourcroydes</i> tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey (n=63, P<0.01).....	36
Fig. 8 - Comparación de la altura da las plantas de <i>A. fourcroydes</i> tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey (n=63, P<0.01).....	37
Fig. 9 - Comparación del Peso Fresco de Raíces de <i>A. fourcroydes</i> tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey (n=63, P<0.01).....	38
Fig. 10 - Comparación del Peso Fresco de hojas de <i>A. fourcroydes</i> tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey (n=63, P<0.01).....	39

Fig. 11 - Comparación del contenido de Na⁺ en raíces de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey (n=63, P<0.01). 41

Fig. 12 - Comparación del contenido de K⁺ en raíces de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey (n=63, P<0.01). 42

Fig. 13 - Relación de K⁺/Na⁺ en raíces de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey (n=63, P<0.01)..... 43

Fig. 14 - Comparación del contenido de Na⁺ en hojas de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey (n=63, P<0.01). 45

Fig. 15 - Comparación del contenido de K⁺ en hojas de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey (n=63, P<0.01). 46

Fig. 16 - Relación de K⁺/Na⁺ en hojas de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey (n=63, P<0.01)..... 47

Fig. 17 - Comparación del contenido de prolina en hojas de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey (n=63, P<0.01). 49

Fig. 18 - Comparación del contenido de prolina en raíces de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey (n=63, P<0.01). 50

Fig. 19 - Efecto del NaCl sobre los niveles de expresión de los genes de P5CS, P5CR y PDH en hojas de *A. fourcroydes*. 52

ABREVIATURAS

AAAP	Permeasas de aminoácidos/auxina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
APC	Aminoácido-poliamina-organocación
APP	Permeasas de aminoácidos
ARN	Ácido ribonucleico
ATF	Transportadores de aminoácidos
ATP	Adenosín Trifosfato
CAM	Crassulacean Acid Metabolism
CAT	Transportadores de aminoácidos catiónicos
CE	Conductividad eléctrica
dS·m ⁻¹	DeciSiemens por metro
GAT	Transportadores de γ -aminobutirato
Glu	Glutamato
GSA	Glutamato-semialdehído
HAK5	Transportador de potasio de alta afinidad
HKT	Transportadores de potasio de alta afinidad
LHT	Transportadores de lisina e histidina
MPa	Mega pascales
NADPH	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato
NHX	Intercambiador intracelular Na ⁺ /H ⁺
NSCC	Canales catiónicos no selectivos

OAT	Ornitina - δ -aminotransferasa
OCD	Ornitina ciclodeaminasa
Orn	Ornitina
P5C	Pirrolina-5-carboxilato
P5CDH	Pirrolina 5-carboxilasa deshidrogenasa
P5CR	Pirrolina-5-carboxilato reductasa
P5CS	Pirrolina-5-carboxilato sintetasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDH	Prolina deshidrogenasa
pH	Potencial de hidrogeno
PHS	Transportadores de poliaminas
POX	Prolina oxidasa
ProT	Transportadores de L-prolina
SOS	Excesivamente sensible a sal
SOS1	Intercambiador Na^+/H^+ de la membrana plasmática
SOS2	Cinasa de serina/treonina
SOS3	Sensor de Calcio
SSR	Marcadores moleculares de microsatélite

RESUMEN

Se realizó un estudio del efecto de la salinidad sobre el metabolismo de prolina en *Agave fourcroydes*, con el objetivo de evaluar cómo el estrés por salinidad puede afectar a este metabolito clave en la adaptación de diversas plantas a condiciones de estrés abiótico. La hipótesis planteada fue que, al igual que en otras especies, el estrés por salinidad también modificaría los niveles de prolina en *Agave fourcroydes*.

Se establecieron diversos objetivos: (1) Evaluar el impacto del estrés salino en el metabolismo de prolina en *Agave fourcroydes*; (2) Determinar la tolerancia de la planta al estrés salino; (3) Evaluar las modificaciones en el contenido de prolina bajo diferentes condiciones de estrés salino; y (4) Analizar la expresión de los genes P5CS, P5CR y PDH, que están involucrados en el metabolismo de prolina, bajo condiciones de estrés salino.

Para abordar este proyecto, se realizó un estudio experimental con 63 plantas jóvenes de *Agave fourcroydes*, que fueron cultivadas en una solución nutritiva Hoagland antes de ser sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM). Se evaluaron las respuestas al estrés salino a través de la cuantificación de sodio y potasio en raíces y hojas, utilizando espectrofotometría de absorción atómica tras una digestión ácida de los tejidos. El contenido de prolina se determinó mediante un método con Ninhidrina, y la expresión génica de los genes P5CS, P5CR y PDH se analizó a través de PCR con cebadores específicos y análisis de transcritos.

La justificación de este estudio radica en el desafío significativo que representa la alta salinidad del suelo para los cultivos agrícolas en México, incluyendo el agave. La acumulación de prolina en respuesta al estrés salino juega un papel crucial en la adaptación de las plantas, ayudando a mantener la homeostasis osmótica y la turgencia celular. Entender los niveles de prolina en *Agave fourcroydes* tiene implicaciones importantes para mejorar la resistencia de estos cultivos al estrés salino, contribuyendo a la sostenibilidad agrícola.

Los resultados muestran que las plantas expuestas a concentraciones crecientes de NaCl presentan un deterioro morfológico notable. Sin embargo, los niveles de prolina en las hojas aumentan significativamente en respuesta a la concentración de NaCl, con un incremento

observándose a partir de 150 mM durante un período de estrés de hasta 60 días. Estas conclusiones sugieren que la acumulación de prolina en *Agave fourcroydes* está estrechamente relacionada con la concentración de NaCl, proporcionando información valiosa para la selección de variedades más resistentes e incluso la mejora de la producción agrícola en suelos salinos.

ABSTRACT

A study of the effect of salinity on proline content in *Agave fourcroydes* was conducted to evaluate how salinity stress can affect this key metabolite in the adaptation of various plants to abiotic stress conditions; the hypothesis was that, as in other species, salinity stress would also modify proline levels in *Agave fourcroydes*.

Several objectives were established: (1) to evaluate the impact of salt stress on proline metabolism in *Agave fourcroydes*; (2) to determine plant tolerance to salt stress; (3) to evaluate modifications in proline content under different salt stress conditions; and (4) to analyze the expression of P5CS, P5CR and PDH genes, which are involved in proline metabolism, under salt stress conditions.

To address this project, an experimental study was conducted with 63 young plants of *Agave fourcroydes*, which were grown in a Hoagland nutrient solution before being subjected to different concentrations of NaCl (0 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM). Responses to salt stress were evaluated through the quantification of sodium and potassium in roots and leaves using atomic absorption spectrophotometry after acid digestion of the tissues. Proline content was determined by a Ninhydrin method, and gene expression of P5CS, P5CR and PDH genes was analyzed by PCR with specific primers and transcript analysis.

The rationale for this study lies in the significant challenge that high soil salinity poses to agricultural crops in Mexico, including *agave*. Proline accumulation in response to salt stress plays a crucial role in plant adaptation, helping to maintain osmotic homeostasis and cell turgor. Understanding proline levels in *Agave fourcroydes* has important implications for improving the resistance of these crops to salt stress, contributing to agricultural sustainability.

The results show that plants exposed to increasing concentrations of NaCl show a remarkable morphological deterioration. However, proline levels in leaves increase significantly in response to NaCl concentration, with an increase being observed starting at 150 mM during a stress period of up to 60 days. These findings suggest that proline accumulation in *Agave fourcroydes* is closely related to NaCl concentration, providing

valuable information for the selection of more resistant varieties and even the improvement of agricultural production in saline soils.

INTRODUCCIÓN

En México, la agricultura enfrenta desafíos significativos debido al aumento del contenido de sales en los suelos, lo cual conduce a problemas relacionados al estrés abiótico conocido como salinidad. La salinidad del suelo afecta negativamente el crecimiento y la productividad de las plantas, limitando su capacidad para prosperar en condiciones adversas. Esta problemática es particularmente relevante para cultivos de alto valor económico como los agaves, plantas que son fundamentales y multifuncionales en diversas industrias, desde la producción de bebidas hasta la fabricación de productos agroindustriales.

El estrés salino induce una serie de respuestas fisiológicas y bioquímicas en las plantas. Uno de los mecanismos de adaptación más críticos es la acumulación de prolina, un aminoácido que actúa como osmoprotector. La prolina ayuda a mantener la homeostasis osmótica y la turgencia celular, permitiendo a las plantas tolerar la salinidad. Además de su función osmótica, la prolina actúa como estabilizador de proteínas y membranas celulares. En este sentido, su acumulación protege a las proteínas de los daños provocados por el estrés oxidativo inducido por la salinidad, gracias a su capacidad para formar enlaces de hidrógeno con las proteínas, lo que contribuye a mantener su estructura terciaria y funcionalidad.

La falta de información específica sobre esta especie puede limitar nuestra comprensión sobre su capacidad para adaptarse a suelos salinos, y de esta manera afectar la selección y manejo de variedades tolerantes en la práctica agrícola.

El objetivo principal de esta investigación fue evaluar cómo el estrés salino afecta el metabolismo de prolina en *Agave fourcroydes*.

Esta investigación es crucial para comprender cómo *Agave fourcroydes* se adapta al estrés salino, ya que al identificar cómo el estrés salino afecta el contenido de prolina y la expresión génica en esta especie, este estudio puede proporcionar una base científica para desarrollar estrategias de manejo y selección de variedades tolerantes. Este conocimiento puede ayudar a mejorar la sostenibilidad y la productividad de los cultivos de agaves, contribuyendo así a la viabilidad económica y ambiental de la agricultura en suelos salinos.

Se espera que los resultados de este estudio revelen la relación entre el estrés salino y la acumulación de prolina en *Agave fourcroydes*, y nos proporcione información valiosa sobre la tolerancia a la salinidad en esta planta.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. ¿QUÉ ES LA SALINIDAD?

La salinidad del suelo es una medida de la cantidad total de sal soluble en el suelo. A medida que aumentan los niveles de sales, las plantas extraen agua del suelo con menor facilidad, lo que agrava las condiciones de estrés hídrico. La alta salinidad del suelo también puede causar desequilibrios de nutrientes, provocar la acumulación de elementos tóxicos para las plantas y reducir la infiltración de agua si el nivel de un elemento de sal, el sodio, es alto (Kotuby-Amacher *et al.*, 2000; El-Ramady *et al.*, 2024).

1.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS SUELOS SALINOS Y SÓDICOS

Cuando las sales se acumulan en los suelos por encima de un límite crítico, estos se denominan suelos salinos. La meteorización de los minerales de los materiales originales es la principal fuente de sales solubles en los suelos. Otra fuente importante es el agua de mar en las regiones costeras y estuarinas, así como la deposición atmosférica, el ascenso por capilaridad de las aguas subterráneas, las filtraciones y el agua de riego. Las sales se agregan continuamente a los suelos y, al mismo tiempo, algunas sales se eliminan continuamente del sistema del suelo por erosión y lixiviación donde hay agua disponible. En algunos casos, la lixiviación es muy baja y las sales solubles se acumulan en el suelo. A veces, una capa de sales se acumula en la superficie del suelo en forma de costra de sal.

En los suelos se encuentra una variedad de sales solubles; algunas de estas sales proporcionan nutrientes a las plantas, pero cuando se acumulan en cantidades excesivas, se vuelven dañinas para las plantas en crecimiento. Algunos suelos contienen iones de sodio intercambiables en exceso con o sin sales en exceso; se les llama suelos sódicos. Los suelos sódicos son altamente dispersos e impermeables, de reacción extremadamente alcalina y producen deficiencia de algunos nutrientes y toxicidad de otros (McCauley & Jones, 2005).

La salinidad del suelo puede ser un evento natural o puede ser antropogénico. Muchos suelos se han vuelto salinos por una mala gestión del agua. Alrededor del 23% de las tierras

cultivadas del mundo son salinas y el 37% son sódicas (Khan y Duke 2001). Casi la mitad de la superficie irrigada está gravemente afectada por la salinidad y la sodicidad secundarias (Flagella *et al.* 2002). Sin embargo, el criterio para juzgar la salinidad del suelo no es la cantidad de sales presentes en el suelo, sino la conductividad eléctrica del extracto de saturación del suelo (ECe) (Richards, 1954).

1.2.1 SUELOS SALINOS.

En México, un problema relacionado con el clima es la desertificación, la cual afecta alrededor del 22.17% del territorio nacional. El país cuenta con diferentes tipos de suelo, siendo el leptosol el más común (28.3% de la superficie nacional), seguido del regosol (13.7%), feozemas (11.7%) y calcisol (10.4%). Este último se encuentra principalmente en las regiones áridas de México, como Chihuahua, Aguascalientes, Baja California, Coahuila, Durango, Nuevo León, Sonora y Zacatecas (SEMARNAT, 2017). En estas condiciones, las sales y los minerales pueden regular la producción de metabolitos vegetales secundarios, como las saponinas, al aumentar o disminuir las vías de señalización, beneficiando así a la planta al participar en mecanismos de defensa vegetal e interacciones ambientales (Lozano *et al.*, 2017). Aunque la salinidad del suelo es potencialmente dañina para la planta, puede aumentar la producción o inducir síntesis de *novo* de metabolitos secundarios en plantas cultivadas *in vitro* (Espinosa-Leal *et al.*, 2018).

Los suelos salinos contienen sales solubles que afectan negativamente el crecimiento de la mayoría de las plantas de cultivo.

Las sales naturales en suelos salinos incluyen principalmente cloruros (Cl^-) y sulfatos (SO_4^{2-}) de sodio (Na^+), calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg^{2+}) y potasio (K^+), aunque domina el NaCl.

Los suelos salinos generalmente tienen buenas propiedades físicas; suelen ser porosos y permeables. La lixiviación en estos suelos con agua de baja salinidad tiende a dispersar los suelos salinos de textura fina, lo que da como resultado una baja permeabilidad al agua y al aire. El crecimiento irregular de los cultivos, la quema de hojas y las costras de sal blanca son indicadores de la salinidad del suelo.

1.2.2 SUELOS SALINO-SÓDICOS

Los valores de pH de estos suelos suelen ser inferiores a 8.2. Estos suelos tienen exceso de sales solubles y exceso de sodio intercambiable. Las sales dominantes en suelos salino-sódicos son cloruros y sulfatos de sodio, calcio y magnesio junto con carbonatos y bicarbonatos. Las condiciones físicas de estos suelos son buenas siempre que existan altos niveles de salinidad. La alta concentración de sales mantiene los coloides floculados y bien agregados. La lixiviación de sales puede causar dispersión y degradación acompañada de la estructura del suelo y pérdida de permeabilidad al agua (Qadir y Schubert, 2002).

1.2.3 SUELOS SÓDICOS

Los suelos sódicos (no salinos) contienen una alta proporción de sodio intercambiable (más del 15%) en superficies coloidales que mantienen las partículas dispersas y evitan que se unan a los agregados. Así, el exceso de sodio intercambiable tiene un efecto adverso sobre las propiedades físicas, químicas y nutricionales del suelo. Los contenidos de sales neutras son bajos; las sales presentes en los suelos sódicos son capaces de sufrir hidrólisis alcalina. Predominan los carbonatos y bicarbonatos de Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} . El pH de la pasta de tierra saturada es superior a 8,2; en algunos casos, puede llegar a 10,5. La materia orgánica dispersa y disuelta presente en la solución del suelo de algunos suelos altamente sódicos les da un color oscuro por lo que estos suelos se llamaban anteriormente suelos alcalinos negros (Jaramillo, 2002).

1.3 SALINIDAD EN PLANTAS

La tolerancia a la salinidad en las plantas está influenciada por una combinación de factores relacionados con la planta misma, el suelo, el ambiente y sus interacciones (González-Romero et al., 2011). Sin embargo, cuando las plantas se exponen a altos niveles de salinidad, especialmente en especies leñosas, pueden experimentar diversos síntomas, como la quema y defoliación de las hojas. En cultivos como *Medicago sativa* (alfalfa) la alta salinidad reduce el rendimiento, mientras que la relación hoja-tallo aumenta, influyendo en la calidad del forraje.

Los árboles frutales, hortalizas y plantas ornamentales son más sensibles a la sal que los forrajes o los cultivos extensivos. Además, ciertas variedades, cultivares o raíces pueden

tolerar niveles más altos de sal que otros. Las plantas son más sensibles a la alta salinidad durante las etapas de plántula, inmediatamente después del trasplante y cuando están sujetas a otros estreses (por ejemplo, enfermedades, insectos, nutrientes) (Munns *et al.*, 2008).

El clima y el riego también influyen en la tolerancia a la salinidad. A medida que el suelo se seca, las sales se concentran en la solución del suelo, aumentando el estrés salino. Por lo tanto, los problemas de sal son más graves en condiciones cálidas y secas que en condiciones frías y húmedas. Es posible que sea necesario aumentar la frecuencia de riego y aplicar agua por encima de la demanda de la planta durante los períodos cálidos y secos para minimizar el estrés por salinidad (Lamz & González, 2013)

Como reportan Shrivastava & Kumar (2015), la salinización del suelo es un factor importante que contribuye a la pérdida de productividad de los cultivos. Aunque difícil de estimar con precisión, la superficie de suelos salinizados está aumentando, y este fenómeno es especialmente intenso en las zonas agrícolas de riego.

Las sales afectan el crecimiento de las plantas debido al aumento de la presión osmótica del suelo y a la interferencia con la nutrición de las plantas. Una alta concentración de sal en la solución del suelo reduce la capacidad de las plantas para adquirir agua, lo que se conoce como el efecto osmótico o de déficit de agua de la salinidad. El daño ocurre cuando la concentración es lo suficientemente alta como para comenzar a reducir el crecimiento del cultivo. El efecto osmótico de la salinidad induce cambios metabólicos en la planta idénticos a los causados por el "marchitamiento" inducido por estrés hídrico y muestra pocas diferencias de genotipo (Läuchli, A., *et al.*, 2007).

Además, el estrés salino reduce el crecimiento de las plantas debido a toxicidades de iones específicos y desequilibrios nutricionales o una combinación de estos factores (Munns *et al.*, 2008). De hecho, los efectos de la salinidad en la reducción del crecimiento de las plantas son un proceso dependiente del tiempo, Munns *et al.*, (1995) propusieron un modelo de dos fases para representar la respuesta del crecimiento de las plantas a la salinidad. La primera fase es muy rápida y la reducción del crecimiento se atribuye al desarrollo de un déficit hídrico. La segunda fase se debe a la acumulación de sales en el brote a niveles tóxicos y es muy lenta. A pesar de que este modelo se ha demostrado en *Brassica oleracea*

var. Itálica (brócoli), la importancia relativa de los dos mecanismos en la reducción del rendimiento es difícil de evaluar con confianza porque se superponen.

De manera similar a otros tipos de estrés abiótico, el estrés salino perjudica el crecimiento y la reproducción de las plantas de diversas formas. Provoca desequilibrios en los nutrientes y hormonas, toxicidad por iones, estrés oxidativo y osmótico, además de incrementar la vulnerabilidad de las plantas a enfermedades. No obstante, el estrés salino puede causar daño o incluso la muerte de las plantas principalmente de tres formas. La alta concentración de sal en el suelo altera su porosidad y conductividad hidráulica, lo que reduce el potencial hídrico del suelo. Esto provoca estrés hídrico debido a la disminución del potencial hídrico, lo que lleva a condiciones de sequía fisiológica y, en consecuencia, a la desestabilización de la membrana celular y la degradación de proteínas por los efectos tóxicos de diversos iones, principalmente el sodio (Na^+) (Hasanuzzaman & Fujita, 2022).

La salinidad afecta la fotosíntesis al disminuir la disponibilidad de CO_2 como resultado de las limitaciones de difusión y una reducción del contenido de pigmentos fotosintéticos (Ashraf, *et al.*, 2013).

Otra referencia es la acumulación de sal en *Spinacia oleracea* (espinacas) inhibe la fotosíntesis, principalmente al disminuir la conductancia de los estomas y del mesófilo al CO_2 y al reducir el contenido de clorofila, lo que puede afectar la absorbancia de la luz (Alvino *et al.*, 2000). En *Raphanus sativus* (rábano), alrededor del 80% de la reducción del crecimiento a alta salinidad podría atribuirse a la reducción de la expansión del área foliar y, por lo tanto, a una reducción de la intercepción de la luz. El 20% restante del efecto de la salinidad sobre el crecimiento probablemente se debió a una disminución en la conductancia estomática. La salinidad reduce la capacidad fotosintética total de la planta a través de la disminución del crecimiento de las hojas y la inhibición de la fotosíntesis, lo que limita su capacidad de crecimiento (Yeo, A., 2007).

La acumulación de sal en la zona de la raíz provoca el desarrollo de estrés osmótico y altera la homeostasis de los iones celulares al inducir tanto la inhibición de la absorción de elementos esenciales como K^+ , Ca^{2+} y NO_3^- como la acumulación de Na^+ y Cl^- . Las deficiencias de las plantas de varios nutrientes y los desequilibrios nutricionales pueden ser causados por la mayor concentración de Na^+ y Cl^- en la solución del suelo derivada de la

competencia iónica (es decir, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Na^+/K^+ , $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ y $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ en tejidos vegetales) (Grattan *et al.*, 1992).

El estrés salino provoca diversos cambios fisiológicos y metabólicos en las plantas, afectando su germinación, fotosíntesis, procesos biosintéticos y crecimiento general. La respuesta a la salinidad varía entre cultivos; las glicófitas generalmente muestran una disminución en crecimiento y rendimiento, mientras que las halófitas pueden prosperar y reproducirse en condiciones salinas. Con niveles osmóticos más altos en la interfaz raíz-suelo, la acumulación de Na^+ y Cl^- en el follaje causa un impacto más lento, reduciendo el crecimiento de los brotes, limitando la expansión de las hojas y frenando la formación de yemas laterales (Hasanuzzaman, & Fujita, 2022) Frente al estrés salino, las células vegetales acumulan solutos compatibles y redistribuyen iones para adaptarse al bajo potencial hídrico del suelo. También aumenta el contenido endógeno de ácido abscísico (ABA), lo que modifica la expresión genética bajo estrés salino. Además, el incremento en los niveles de iones como Na^+ y Cl^- puede provocar toxicidad iónica al alterar la homeostasis iónica y reducir la disponibilidad de nutrientes esenciales, afectando así el crecimiento y metabolismo de las plantas (Munns, R., 2011). La combinación de estrés osmótico y toxicidad iónica genera estreses secundarios que pueden perjudicar la germinación, crecimiento y desarrollo de las plantas (Munns & Tester, 2008).

Entre los diversos efectos negativos del estrés salino, una de las principales limitaciones para el crecimiento y la productividad de las plantas es la notable disminución de la fotosíntesis (Yan *et al.*, 2012). Esta reducción en la actividad fotosintética bajo condiciones salinas se debe principalmente a la disminución de la conductancia estomática, que resulta del cierre parcial de las estomas, o a la destrucción de los sistemas de pigmentos fotosintéticos en el tejido del mesófilo, provocada por la acumulación de iones tóxicos a través de la transpiración (Munns 2002, Parida *et al.*, 2004).

Zrib *et al.*, (2009) observaron una disminución en la biomasa vegetal, el área foliar y el crecimiento en diferentes cultivos de hortalizas bajo estrés salino. Los efectos del estrés salino en la arquitectura/morfología de la raíz actualmente son poco conocidos. Sin embargo, se ha informado que la biomasa de la raíz generalmente se ve menos afectada por el exceso de salinidad que los órganos por encima del suelo.

Diversos estudios han documentado que el estrés salino causa una reducción en el crecimiento de las plantas, como se ha observado en cultivos de tomate (Romero-Aranda *et al.*, 2001), algodón (Meloni *et al.*, 2001) y remolacha azucarera (Ghoulam *et al.*, 2002). No obstante, la tolerancia a la salinidad varía entre especies y cultivares, así como entre los distintos parámetros de crecimiento observados. Por ejemplo, Khan y Aziz (2001) descubrieron que las plantas de *Rhizophora mucronata* alcanzaron su crecimiento óptimo con un 50% de agua de mar, y que este crecimiento disminuyó con incrementos adicionales en la salinidad.

Los síntomas visuales de daño por sal en el crecimiento de las plantas aparecen progresivamente. Los primeros signos de estrés por sal son el marchitamiento, las hojas amarillentas y el retraso en el crecimiento. En una segunda fase, el daño se manifiesta como clorosis de las partes verdes, quema de la punta de la hoja y necrosis de las hojas, y las hojas más viejas se queman (Shannon *et al.*, 1998).

La salinidad en el suelo se produce cuando hay una elevada cantidad de sales solubles, lo cual puede restringir el crecimiento de las plantas e incluso llevar a su fallecimiento. La severidad de esta limitación aumenta en proporción a la concentración de sales (Mass y Nieman, 1997).

Existen diferentes formas de expresar la salinidad del suelo, ya sea por la cantidad de sales disueltas por unidad de volumen (g/L), o por medio de la conductividad eléctrica, que es la medida más utilizada en la actualidad y hace referencia a la concentración total de sales en la solución del suelo expresada como extracto de saturación (Pizarro 1985; Kijne *et al.*, 1998).

La presencia de salinidad en el suelo puede causar diversos impactos negativos en el desarrollo de las plantas, incluyendo la germinación, el crecimiento vegetativo y el desarrollo reproductivo, además de tener efectos indirectos en la productividad de las plantas a través de la afectación de microorganismos simbióticos beneficiosos (Castellanos, 2016).

La salinidad afecta el crecimiento y la producción de los cultivos, ya que reduce el potencial hídrico del suelo, disminuyendo así la disponibilidad de agua y creando un desequilibrio

nutricional. El exceso de elementos como el sodio y el cloro puede interferir con la nutrición mineral y el metabolismo celular, provocando efectos a diferentes niveles, desde la reducción de turgencia y crecimiento hasta la pérdida de la estructura celular. La salinidad también puede afectar la fotosíntesis, principalmente reduciendo el área foliar, el contenido de clorofila y la conductancia estomática, lo que puede disminuir la eficiencia del fotosistema II. Además, la salinidad puede interrumpir temporalmente el ciclo celular y la diferenciación, lo que se traduce en un crecimiento limitado y menos células en los meristemas. (Chinnusamy *et al.*, 2005; Parida y Das, 2005; Amini *et al.*, 2007; Vijayan *et al.*, 2008; Chaves *et al.*, 2009;).

La salinidad afecta negativamente a las plantas a través de dos mecanismos principales: estrés osmótico y toxicidad iónica. El estrés osmótico, que ocurre a corto plazo, resulta de la absorción de Na^+ y Cl^- , los cuales disminuyen el potencial osmótico entre las raíces y la solución del suelo, reduciendo así la disponibilidad de agua (Abbasi *et al.*, 2016). Por otro lado, la toxicidad iónica, causada por altas concentraciones de Na^+ y Cl^- , interfiere con la absorción de nutrientes (Tavakkoli *et al.*, 2011). La toxicidad del cloruro de sodio (NaCl) está vinculada a la conductividad eléctrica (CE), un indicador de la tolerancia de la planta al estrés salino (Isla y Aragüés, 2010). La tolerancia de los cultivos disminuye cuando la CE supera 2 dSm^{-1} , aunque algunas plantas pueden prosperar incluso a 8 dSm^{-1} . Más allá de este umbral, el crecimiento y el rendimiento de las plantas se ven negativamente afectados. Las semillas germinan de manera deficiente en condiciones salinas (Ullah y Bano, 2019), y la salinidad reduce el nivel endógeno de fitohormonas, lo que inhibe el establecimiento de plántulas (Egamberdieva y Kucharova, 2009). Si las plantas se siembran durante la primera fase de salinidad, el crecimiento de los brotes se verá comprometido en etapas posteriores (El Sayed, 2011; Wakeel *et al.*, 2011). Aunque las plántulas pueden mantener un crecimiento normal en la segunda fase de salinidad, el rendimiento final se verá afectado. La salinidad también causa varios deterioros fisiológicos en las plantas, como la reducción de la conductancia estomática, lo que limita la fijación de carbono y altera las actividades catalíticas de las enzimas involucradas en este proceso, además de dañar los pigmentos fotosintéticos (Omoto *et al.*, 2012). Se ha observado una disminución significativa en la biomasa de brotes y raíces en plantas cultivadas en suelos salinos (Kalhor *et al.*, 2016; Genc *et al.*, 2019).

1.4 AGAVES COMO MODELO DE ESTUDIO.

El género *Agave* spp, es endémico de América, se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela, la conforma aproximadamente 200 especies y 75 % se encuentran en México (García et al., 2010).

En el territorio mexicano se alberga la mayor diversidad de especies del género *Agave* en el mundo (García-Mendoza et al., 2019). Es el principal ambiente de divergencia evolutiva natural de este género y la principal área de manejo y domesticación de los agaves (Colunga-García Marín et al., 2017).

El género *Agave*, comúnmente conocido como maguey, está compuesto por 206 especies endémicas de las Américas (García-Mendoza, 2011).

Se ha sugerido que las especies de agaves se diversificaron rápidamente con la coincidencia de una mayor aridez de zonas de América del Norte con una mayor diversidad de especies polinizadoras, lo que favoreció la hibridación de las especies de *Agave* (Good-Avila et al., 2006).

Las plantas de *Agave* son nativas de varias regiones, incluyendo México, América Central, el suroeste de EE. UU. y las Islas Canarias. El 75% de las especies conocidas se encuentran en México, y de ellas, el 74% son endémicas. Los agaves pulqueros son una industria importante en México con un valor de más de \$42 millones de dólares. Los agaves, como *A. americana*, *A. atrovirens*, *A. mapisaga* y *A. salmiana*, se están estudiando como fuentes comerciales de alcohol y nutraceuticos.

Por otra parte, la mayoría de los estudios sobre el género *Agave* se han realizado a nivel poblacional utilizando marcadores de huellas genéticas de ADN. Utilizando marcadores moleculares de microsatélites (SSR), Figueredo et al. (2015) encontraron que *A. inaequides* especie utilizada para la producción de mezcal y pulque presenta alta diversidad genética y baja estructuración, siendo esta diversidad genética asociada principalmente con el ambiente o la región de origen de las muestras.

Los agaves se adaptan a diversos hábitats y suelos, algunos pueden crecer en condiciones extremas como en suelos con bajos nutrientes, suelos salinos o contaminados con iones metálicos (García-Mendoza, 2002).

En las zonas áridas y semiáridas de México, los agaves o magueyes tienen una gran importancia ecológica, económica y cultural. Desde la época prehispánica, se les ha dado valor como alimento, fuente de fibras y material para construcción de viviendas, así como materia prima para la elaboración de bebidas fermentadas y destiladas. Los magueyes pueden encontrarse desde el nivel del mar hasta los 3400 m.s.n.m., principalmente en comunidades xerófitas debido a las características morfológicas, anatómicas y fisiológicas que les permiten sobrevivir con poca humedad (García Mendoza, 2002; García, 2007; Schulte, 2009).

Las especies de *Agave* pueden crecer en diferentes tipos de sustratos, incluyendo suelos de origen ígneo y marítimo, en climas tanto cálidos como templados, y en condiciones tanto secas como húmedas. Esta capacidad sugiere que tienen mecanismos de adaptación variados a las condiciones ambientales. Estudios también han demostrado que distintas especies de *Agave* tienen diferentes respuestas a la temperatura, con algunas especies como *A. lechuguilla* y *A. salmiana* teniendo intervalos más amplios de temperatura óptima para la germinación, mientras que otras especies tienen una respuesta óptima asociada con las condiciones térmicas específicas de sus lugares de origen. (Ramírez-Tobías *et al.*, 2012).

Las especies pertenecientes al género *Agave* utilizan el proceso metabólico CAM (acrónimo en inglés de "Crassulacean Acid Metabolism"), el cual maximiza la eficiencia del agua al absorber CO₂ durante la noche, permitiendo así la adaptación de estas plantas a ambientes áridos con limitada disponibilidad de agua (Nobel, 1998; Cushman *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). El aumento en el uso del agua dulce para la producción agrícola, indica que los cultivos que sean más resistentes al calor y sequía, serán esenciales para lograr sistemas sostenibles de producción de biomasa en el futuro. Debido a su eficiente uso del agua, los magueyes se han contemplado como fuentes de materias primas bioenergéticas para ser cultivados en tierras agrícolas semiáridas, degradadas o abandonadas, con el fin de recuperar suelos secos (Cushman *et al.*, 2015).

Por lo tanto, los agaves son un recurso fitogenético valioso, ya que representan una alternativa para el desarrollo sostenible y poseen una alta capacidad bioproductiva, incluso en ambientes con baja disponibilidad de agua y temperaturas extremas (Colunga *et al.*, 2007).

1.4.1 *AGAVE FOURCROYDES*

El *Agave fourcroydes* es una planta suculenta que forma parte de la familia Asparagaceae. Es conocida por su capacidad de producir fibras largas y fuertes que son comercialmente importantes. La planta se cultiva ampliamente en México y es originaria de la península de Yucatán. Se caracteriza por tener un tallo grueso y leñoso, sus hojas tienen un alto contenido en fibra y son de más de un metro de longitud, por lo que puede medir hasta 2,5 metros de diámetro y con un tallo de hasta 1,2 metros de altura. Forma una roseta de hojas en forma de espada de unos 100-200 cm de alto y 10-15 cm de ancho. Sus hojas son de color verde grisáceo y tienen espinas marginales triangulares de 3 a 6 mm de longitud. Tiene un ciclo de vida largo, de hasta 20 años, y produce alrededor de 200 a 250 hojas (Trujillo *et al.* 2023.) Esta planta es cultivada principalmente por su fibra, que se extrae de las hojas, la cual es utilizada en la fabricación de cuerdas, sacos, cordeles y otros productos textiles.



Fig. 1 - *Agave fourcroydes* y fibra extraída de sus hojas (FIRCO, 2017).

1.4.2 CULTIVO DE AGAVE

El cultivo de *Agave* es de largo plazo, ya que, dependiendo la especie, requiere de al menos cuatro años para alcanzar la madurez de sus hojas y su máximo rendimiento se logra entre los doce y quince años. Si se suministran los nutrientes adecuados y se riega con la cantidad adecuada de agua, se pueden obtener hasta tres toneladas por hectárea. Para el cultivo de *Agave*, se recomienda una distribución en filas con una separación de un metro entre plantas y dos metros entre filas. Es importante eliminar las malas hierbas y trazar los surcos de acuerdo a la dirección del viento predominante. El terreno debe tener una buena capacidad de drenaje ya que el exceso de humedad puede afectar negativamente a los agaves. Las temperaturas ideales para su crecimiento son alrededor de 30°C durante el día y 15°C durante la noche, ya que los agaves son vulnerables a las heladas cuando la temperatura es inferior a 3°C.

Los agaves son capaces de sobrevivir en ambientes donde otros organismos no lo harían debido a su alta tolerancia a la deshidratación. Este tipo de adaptación es típico de las plantas xerófitas, que están especializadas en soportar la falta de agua durante períodos. (Nobel, 2011). No obstante, la carencia de agua inhibe el crecimiento, como se ha documentado en *Agave tequilana* (Pimienta-Barrios *et al.*, 2006) y en plántulas de *A. salmiana* (Peña-Valdivia *et al.*, 2009). Desde el punto de vista ecológico, la supervivencia en condiciones extremas es importante. Sin embargo, cuando los magueyes son cultivados como materia prima para producir mezcal, la velocidad de crecimiento es una característica importante, pues determina el tiempo en que la planta madurará y podrá ser aprovechada (Sánchez, 1989).

La succulencia y la cutícula gruesa permiten a los magueyes almacenar el agua, así mantienen potenciales de agua (ψ) elevados en sus tejidos (Andrade y Nobel, 1997). La apertura estomática nocturna, típica de la ruta fotosintética CAM, permite la absorción de dióxido de carbono cuando la pérdida de agua es poca (Nobel, 2011).

1.4.3 TOLERANCIA DE LOS AGAVES

La acumulación de prolina en la raíz de plántulas de *Agave salmiana* se ha considerado como una respuesta al estrés hídrico (Peña-Valdivia y Sánchez-Urdaneta, 2009); resultados similares se han señalado para *Aloe barbadensis* (Delatorre-Herrera *et al.*, 2010). Se

propone que la acumulación de prolina constituye un efecto protector debido a la estabilidad de su molécula, a su capacidad de proteger la integridad de las proteínas y de mejorar la actividad de diferentes enzimas (Szabados y Saviouré, 2010). Por otro lado, el déficit de humedad también promueve cambios en la distribución de biomasa entre órganos (Achten *et al.*, 2010). Al respecto, se sugiere que un valor mayor del índice raíz/vástago, cuando hay restricción de humedad, es una respuesta favorable para la planta debido a la posibilidad de aumentar la absorción de agua a través del sistema radical y disminuir la pérdida a través del vástago.

1.5 SALINIDAD EN AGAVES

En algunas especies de *Agave*, como *A. utahensis*, la alta concentración de NaCl en el suelo puede causar una deficiencia de iones, incluidos Ca^{2+} , K^+ y Mg^{2+} , debido a la competencia por la absorción (Bergsten *et al.*, 2016). Este fenómeno se debe a la competencia por la absorción de iones entre la sal (NaCl) y los iones esenciales. Cuando la concentración de NaCl en el suelo es alta la sal compite con los iones esenciales por los sitios de absorción en las raíces de la planta, los iones de sodio (Na^+) pueden reemplazar a los iones esenciales en los sitios de absorción, reduciendo la disponibilidad de Ca^{2+} , K^+ y Mg^{2+} para la planta y esto puede llevar a una deficiencia de estos iones esenciales, afectando negativamente el crecimiento y desarrollo de la planta. Este proceso implica varios mecanismos: competencia iónica, inhibición de la absorción y la alteración del equilibrio iónico (Bergsten *et al.*, 2016). Sin embargo, el NaCl puede actuar como elicitador de la producción de saponinas, esto se debe al estrés abiótico, señalización celular, alteración del equilibrio iónico (Puente-Garza, *et al.*, 2021). Las saponinas son metabolitos secundarios producidos naturalmente por las plantas debido al estrés biótico (Reichert *et al.*, 2019).

La capacidad de los agaves para tolerar la salinidad varía según la especie; por ejemplo, se ha encontrado que los niveles de conductividad eléctrica (CE) superiores a 3,0 Mp reducen significativamente el crecimiento de las raíces y los brotes de las plántulas de *Agave deserti* (Nobel y Berry, 1985). Además, se ha observado que los pesos secos de los brotes y las raíces de *A. parryi* disminuyen a una CE de $5,0 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ (Schuch y Kelly, 2008). En otro estudio, se encontró que las plantas de *A. sisalana* expuestas a $10 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ de NaCl y $10 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ de CaCl_2 tenían una reducción del peso seco del 40% después de 5 meses

(El-Gamassy *et al.*, 1974). Sin embargo, un estudio diferente encontró que la salinidad no afectó el crecimiento de *Agave americana* hasta niveles de $9,0 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ (Miyamoto, 2008). En resumen, la capacidad de diferentes especies de agave para tolerar la salinidad varía y depende de varios factores.

1.6 SODIO

El sodio es el sexto elemento más abundante en la corteza terrestre, donde comprende un 2,8% (Lutgens y Tarbuck 2003), y, después del cloruro, es el segundo soluto más abundante en los océanos. En este último, normalmente prevalece en concentraciones cercanas a los 470 mM, y estas pueden ser aún más altas en áreas de alta evaporación y precipitaciones limitadas, como las regiones cercanas a los 30° de latitud.

En general, el ion sodio (Na^+) no es necesario para el crecimiento, desarrollo ni reproducción en la mayoría de las plantas terrestres. Sin embargo, hay una excepción notable: algunas plantas C4, como *Atriplex* spp., *Kochia childsii*, mijo y ciertas gramíneas C4, requieren Na^+ para su crecimiento óptimo. Además, algunas especies necesitan pequeñas cantidades de Na^+ para facilitar procesos específicos, como la absorción de piruvato en los cloroplastos mediante un mecanismo de cotransporte Na^+ -piruvato, según estudios recientes (Furumoto *et al.*, 2011).

1.6.1 MECANISMOS DE TRANSPORTE DE SODIO EN LAS PLANTAS

Keisham, M. *et al.* (2018) señalan que el Na^+ entra a la célula mediante sistemas de transporte como los canales catiónicos no selectivos (NSCC) y transportadores como HAK5 y HKT (ver Fig. 2). Este Na^+ es detectado por un mecanismo sensorial aún no identificado, lo que activa la cascada de señalización de Ca^{2+} . El incremento en la concentración de Ca^{2+} en el citosol, provocado por el estrés salino, es percibido por SOS3, una proteína sensora de Ca^{2+} que está miristoilada. SOS3 se une a SOS2, lo que activa su función quinasa. El complejo formado por SOS2 y SOS3 se encuentra en la membrana plasmática, donde SOS2 fosforila SOS1, activando su función de antiportador de Na^+/H^+ , facilitando así la expulsión de Na^+ de la célula. Este complejo SOS2/SOS3 también inhibe el transporte de Na^+ a través de los transportadores HKT (ver Fig. 2). Además, el Na^+ se elimina a través de un nuevo mecanismo que involucra una ATPasa putativa sensible a la ouabaína (OU). El

Na^+ también se compartimenta dentro de las vacuolas a través de NHX, un intercambiador de Na^+/H^+ , como respuesta al estrés salino.

Para mayor claridad: NSCC se refiere a los canales catiónicos no selectivos; HAK5 es un transportador de potasio de alta afinidad; HKT son transportadores de potasio de alta afinidad; SOS significa "excesivamente sensible a sal"; y NHX es un intercambiador Na^+/H^+ .

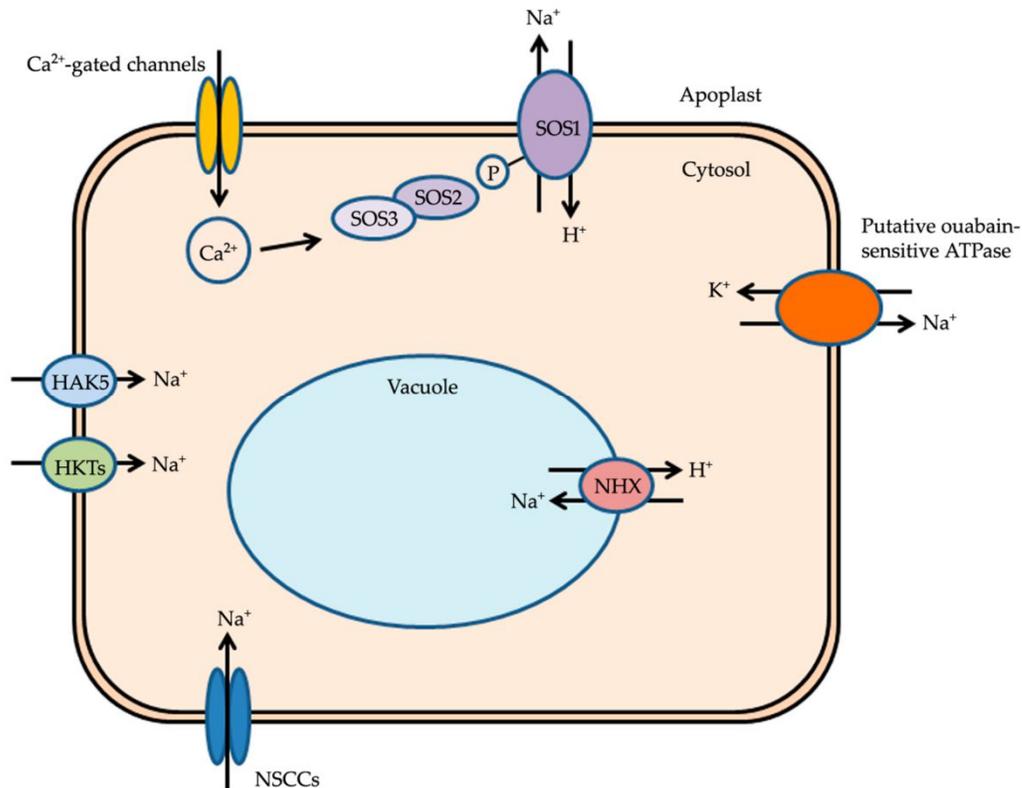


Fig. 2 - Sistema de transporte de sodio en plantas (Keisham, *et al.*, 2018).

1.7 TOLERANCIA A LA SALINIDAD

La variación en la tolerancia a la salinidad en las especies dicotiledóneas es incluso mayor que en las especies monocotiledóneas. (Munns & Tester, 2008).

Las plantas difieren mucho en su tolerancia a la salinidad, como se refleja en sus diferentes respuestas de crecimiento. De los cereales, el arroz (*Oryza sativa*) es el más sensible y la cebada (*Hordeum vulgare*) es la más tolerante.

El trigo harinero (*Triticum aestivum*) es moderadamente tolerante y el trigo duro (*Triticum turgidum ssp. durum*) lo es menos. El pasto de trigo alto (*Thinopyrum ponticum*, syn. *Agropyron elongatum*) es un pariente halófito del trigo y es una de las especies monocotiledóneas más tolerantes; su crecimiento procede a concentraciones de sal tan altas como en el agua de mar.

Algunas legumbres son muy sensibles, incluso más sensibles que el arroz (Lauchli, 1984.); la alfalfa (*Medicago sativa*) es muy tolerante, y las halófitas como el arbusto salado (*Atriplex spp.*) continúan creciendo bien a salinidades mayores que la del agua de mar.

Muchas halófitas dicotiledóneas requieren una concentración bastante alta de NaCl (100–200 mM) para un crecimiento óptimo (Flowers, *et al.*, 1977). *Arabidopsis*, en comparación con otras especies en condiciones similares de luz y humedad (es decir, con altas tasas de transpiración), es una especie sensible a la sal. Esta planta sensible puede proporcionar conocimientos limitados sobre los mecanismos de tolerancia a la salinidad a menos que se la compare con un pariente tolerante como *Thellungiella halophila*. Las diferencias entre estas dos especies se destacan por sus respuestas a NaCl 100 mM en condiciones de alta transpiración. La exposición continua a 100 mM no permite que *Arabidopsis* complete su ciclo de vida (Sickler, *et al.*, 2007), pero tiene poco efecto sobre la tasa de crecimiento de *Thellungiella*.

1.8 ABSORCIÓN Y TRANSPORTE DE Na⁺ EN PLANTAS

La tolerancia a la salinidad de las plantas es una función de la exclusión de Na⁺, la tolerancia de los tejidos a Na⁺ y la tolerancia osmótica (Munns & Tester 2008) se basa en grado variable en cada uno de estos tres componentes, incluso dentro de una sola especie (Rajendran, Tester & Roy 2009). El centro de estos tres mecanismos de tolerancia a la salinidad es el transporte de agua e iones (principalmente Na⁺, K⁺ y Cl⁻), tanto dentro como a lo largo de la planta y, como tal, es probable que este transporte esté altamente interconectado con la tolerancia a la salinidad.

Muchos procesos de transporte de Na⁺ se centran en el control de la absorción de Na⁺ por las raíces y la subsiguiente distribución de Na⁺ en el tejido de la planta para minimizar la cantidad de Na⁺ que llega al tejido del brote (exclusión de Na⁺ del brote, que abarca todos

los procesos de transporte de Na⁺ en la raíz y los brotes, que minimizan el transporte de Na⁺ al brote); o para minimizar el daño causado por el Na⁺ acumulado (a través de una partición cuidadosa del Na⁺ dentro de las células). En varias especies de cereales, se ha encontrado que la tolerancia a la salinidad se correlaciona positivamente con la exclusión de Na⁺, lo que indica que la exclusión de Na⁺ del brote es el componente principal de la tolerancia a la salinidad (Tester & Davenport 2003), aunque otras especies, como *Arabidopsis*, dependen en menor medida de la exclusión de Na⁺ (Møller & Tester 2007).

1.9 PROCESOS DE TRANSPORTE DE Na⁺ EN LA INTERFAZ SUELO-RAÍZ

Tanto el gradiente de concentración como el diferencial de voltaje a través de la membrana plasmática favorecen la entrada pasiva de Na⁺ desde la solución del suelo al citoplasma de las células epidérmicas y corticales de la raíz (Cheeseman 1982). La entrada de Na⁺ también puede ocurrir en las células endodérmicas en la punta de la raíz que no han desarrollado una banda de Caspary en las células endodérmicas en estado I sin lamelas de suberina; sin embargo, para las células endodérmicas más maduras, la absorción de iones a través de la membrana plasmática es poco probable (Moore *et al.* 2002). Para las plantas que transpiran y crecen en suelo salino, la acumulación neta de Na⁺ dentro de una célula epidérmica de la raíz ocurre ya que, a pesar de que la salida activa de Na⁺ ocurre a tasas significativas, la salida de Na⁺ es insuficiente para contrarrestar la entrada pasiva unidireccional (Davenport *et al.*, 1997).

1.10 PROLINA

La prolina es el osmolito endógeno más común que es acumulado bajo varios estreses abióticos, incluida la salinidad (Slama *et al.*, 2015). Cuando se aplica como compuesto exógeno a los cultivos, la prolina puede mejorar la tolerancia a la salinidad. Por ejemplo, en plantas de *Zea mays* estresada por sal, la aplicación foliar de prolina aumentó el crecimiento y el rendimiento de la planta (Alam *et al.*, 2016). Los efectos benéficos de la aplicación de prolina exógena sobre la tolerancia al estrés salino han sido objeto de varias revisiones. Por ejemplo, Ashraf y Foolad (2007) se centraron en el efecto de la prolina exógena sobre la germinación de semillas, el crecimiento de plántulas y la relación Na⁺/K⁺. Meena *et al.* (2019) consideraron algunos efectos benéficos de la prolina exógena en la tolerancia de las

plantas a diferentes entornos, como la reducción de la toxicidad iónica, la fijación biológica de nitrógeno y la expresión génica relacionada con la tolerancia a la sal.

1.10.1 METABOLISMO DE LA PROLINA EN LAS PLANTAS

En las plantas superiores, la biosíntesis de prolina se produce a través de dos vías que dependen de la disponibilidad relativa de los sustratos alternativos, glutamato (Glu) y ornitina (Orn). La vía Glu comienza con la pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS) que usa ATP y NAD(P)H+H⁺ para reducir Glu a glutamato-semialdehído (GSA), que se convierte espontáneamente en pirrolina-5-carboxilato (P5C). Luego, la P5C se reduce a prolina por la acción de la P5C reductasa (P5CR) utilizando NADPH y H⁺. En la mayoría de las especies de plantas, P5CS está codificado por dos genes, P5CS1 y P5CS2, mientras que P5CR está codificado por un solo gen (Szabados y Saviouré, 2010). Sin embargo, en algunas especies como *Medicago truncatula*, P5CS posiblemente esté codificado por tres genes (Nguyen *et al.*, 2013).

La ruta de Orn se ha considerado como una ruta alternativa para la biosíntesis de prolina. La ornitina - δ -aminotransferasa (OAT) transamina a Orn para producir GSA y P5C, que luego se reduce a prolina por la acción de P5CR (Mansour y Ali, 2017). De acuerdo con You *et al.* (2012), líneas transgénicas de arroz que sobreexpresan constitutivamente OAT producen niveles más altos de prolina que el tipo salvaje, lo que apunta a un papel más fundamental de la vía Orn en la biosíntesis de prolina. La sobreexpresión de OAT conduce a un aumento en la producción de prolina, ya que se está potenciando la ruta de biosíntesis.

Aunque los genes y enzimas involucrados en la biosíntesis de prolina han sido bien estudiados, el uso preferencial de Glu u Orn como sustrato aún no está claro. Algunos autores han informado que la vía preferida depende de la etapa de desarrollo, teniendo la vía Orn un papel particularmente crucial en el desarrollo de las plántulas (Schmid *et al.*, 2005). Otros, han documentado que la preferencia de la ruta depende de la especie. De hecho, AbdElgawad *et al.* (2015) notaron que la vía Glu que involucra a P5CS y P5CR es predominante en gramíneas, mientras que la vía Orn con OAT y P5CR es predominante en leguminosas.

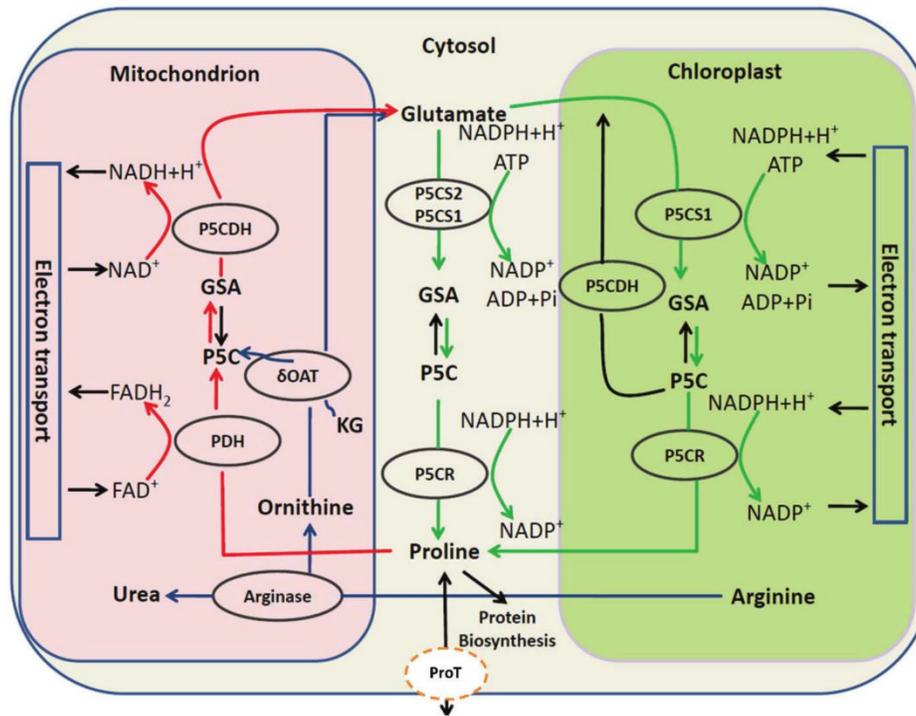


Fig. 3 - Metabolismo de prolina en plantas (Khanna-Chopra, R., 2019).

La prolina es una molécula eficaz como osmoprotector y molécula de señalización en las plantas debido a su estructura cíclica y su grupo amino secundario diferente a los aminoácidos proteinogénicos. Además, la prolina juega un papel esencial en el metabolismo primario como aminoácido libre y componente de proteínas (Singh *et al.*, 2015). Se ha demostrado que su acumulación está positivamente correlacionada con la tolerancia al estrés en las plantas, ya que se acumula en el citosol sin dañar las estructuras celulares y es crucial para la adaptación fisiológica al estrés (Sadeghipour 2020). La prolina también puede mejorar la estabilidad de las proteínas, proteger la integridad de las membranas y facilitar la activación de las enzimas, lo que aumenta la capacidad de las células para absorber agua y resistir el estrés (Hayat *et al.*, 2012). A pesar de ser considerada como un osmolito, también se sabe que la prolina tiene propiedades antioxidantes, quelantes de metales, estabilizadores de proteínas, eliminadores de ROS e inhibidores de la muerte celular programada. Estudios han demostrado que la aplicación exógena de prolina puede aumentar la tolerancia al estrés en las plantas al contribuir a los

mecanismos de tolerancia al estrés y mejorar la respuesta a futuras condiciones estresantes (Burritt, 2012; Dar *et al.*, 2016; Butt *et al.*, 2016; Hossain *et al.*, 2019).

El nivel de prolina dentro de las células vegetales está controlado por la biosíntesis, el catabolismo y el transporte entre células y compartimentos celulares (Liu & Wang, 2020). En las plantas, el pirrolina-5-carboxilato (P5C) es el precursor confirmado para la biosíntesis de prolina, y la ornitina ciclodeaminasa (OCD), la pirrolina-2-carboxilato reductasa (P2CR) y la delta-1-pirrolina-5-carboxilasa reductasa (P5CR) son las tres enzimas involucradas en la biosíntesis de prolina en los procariotas (Hossain *et al.*, 2019). Varias enzimas regulan las vías de síntesis y degradación de prolina en las plantas (Singh *et al.*, 2015). La acumulación de prolina en las plantas bajo condiciones de estrés se debe no solo al aumento de la síntesis, sino también a la inactivación de las vías de degradación, lo que resulta en la acumulación de prolina (Delauney *et al.*, 1993). La activación de la delta-1-pirrolina 5-carboxilasa sintetasa (P5CS) y P5CR y la inhibición de las enzimas oxidantes de prolina como la pirrolina deshidrogenasa (Pro DH) y la delta-1-pirrolina 5-carboxilasa deshidrogenasa (P5CDH) contribuyen a la acumulación de prolina en las células vegetales.

La producción y degradación de prolina en las plantas está regulada por diferentes procesos en distintos compartimentos celulares (Szepesi *et al.*, 2018). La síntesis de prolina se lleva a cabo mediante dos vías, la vía Glu y la vía Orn, y ambas tienen Glu y Orn como precursores de la prolina (Liu & Wang, 2020) (ver Figura 3). La vía Glu es la principal vía de síntesis de prolina, mientras que la vía Orn se considera una vía alternativa que ocurre en condiciones de desarrollo y nitrógeno supraóptimo (Da Rocha *et al.*, 2012). La vía Glu se convierte en la principal vía de producción de prolina bajo estrés por deficiencia de nitrógeno y/u otros estresores (Armengaud *et al.*, 2004). La biosíntesis de prolina a partir de Glu tiene lugar en el cloroplasto y/o el citoplasma y se lleva a cabo en dos pasos enzimáticos: P5CS reduce Glu a GSA y luego se convierte en P5C, que P5CR reduce a prolina. Para este proceso se requieren dos NADPH y se consume un ATP (Meena, M., *et al.*, 2019). La degradación de prolina, por otro lado, tiene lugar en las mitocondrias.

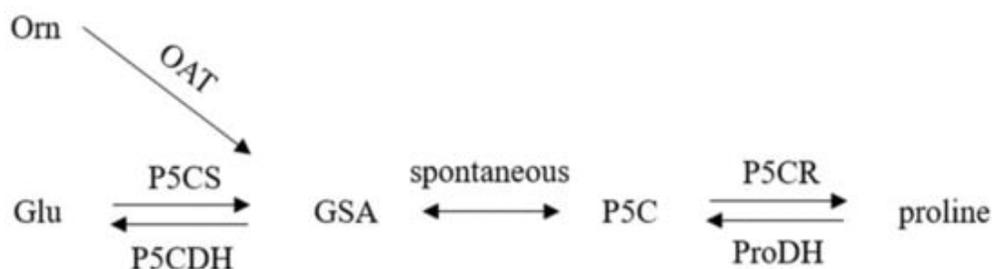


Fig. 4 - La vía metabólica de síntesis de prolina en plantas a través del glutamato y la ornitina.

En la mayoría de las plantas, la velocidad de la biosíntesis de prolina se ve limitada por el primer paso, el cual puede ser regulado por diversos factores como ABA, modificaciones epigenéticas y corte y empalme alternativo que afectan la expresión de P5CS, una enzima que tiene dos isoformas y cataliza el primer paso de la síntesis de prolina a partir de glutamato (Armengaud *et al.*, 2004). Aunque en la mayoría de las plantas solo se encuentra un gen que codifica la enzima P5CR, en *Arabidopsis* existen dos genes involucrados en la formación de la enzima P5CS, siendo P5CS1 el principal contribuyente a la acumulación de prolina durante el estrés, mientras que P5CS2 es importante para el desarrollo y el crecimiento embrionario (Funck *et al.*, 2020).

El catabolismo de la prolina de vuelta a glutamato también ocurre en la mitocondria mediante dos pasos enzimáticos, y tanto la biosíntesis como el catabolismo utilizan el intermediario común P5C (Dar *et al.*, 2016). Durante el catabolismo, la prolina es convertida en P5C por medio de la enzima prolina deshidrogenasa o prolina oxidasa (PDH o POX) y la P5C deshidrogenasa (P5CDH) que produce glutamato a partir de P5C. En *Arabidopsis* y tabaco, solo un gen ha sido identificado que codifica P5CDH, mientras que dos genes codifican PDH. Además, durante el estrés abiótico, la transcripción de PDH se activa por rehidratación, pero se suprime por deshidratación, lo que previene la degradación de prolina (Hayat *et al.*, 2012).

1.10.2 EFECTO DE LA PROLINA DURANTE EL ESTRÉS SALINO

La aplicación exógena de prolina puede mejorar efectivamente la tolerancia de las plantas al estrés salino a través de la regulación del metabolismo de la prolina endógena, en parte logrado a través de la expresión diferencial de genes específicos relacionados con la

prolina. Por ejemplo, de Freitas *et al.* (2018) demostraron que la aplicación foliar de prolina a *Z. mays* dio como resultado una disminución en la actividad de P5CS y un aumento en PDH bajo estrés salino. Se informaron resultados similares en *Sorghum bicolor* estresado por sal. Agregar prolina exógena condujo a una disminución en la actividad de P5CS tanto en *Eurya emarginata* estresada como no estresada, pero a un aumento en la actividad de PDH solo en plantas no estresadas (Zheng *et al.*, 2015). Bajo estrés salino, el cebado o priming de semillas de *Triticum aestivum* con prolina exógena disminuyó significativamente el contenido de prolina y P5C con una reducción en la actividad de P5CS, mientras que la actividad de PDH aumentó significativamente (Rady *et al.*, 2019).). El efecto de la prolina exógena sobre la expresión de PDH también es reportado por Kiyosue *et al.* (1996) y Nakashima *et al.* (1998) en *A. thaliana*. Deuschle *et al.* (2001) reportaron que, además de la PDH, la prolina exógena aumentó los niveles de transcripción de P5CDH y sugirieron que esta respuesta puede proteger a las plantas contra la toxicidad de la prolina. Sin embargo, otros autores como Nounjan *et al.* (2012) han demostrado que la aplicación de prolina exógena aumentó significativamente la expresión de P5CS y P5CR en *Oryza sativa* estresada por sal.

La inducción de la acumulación de prolina bajo estrés ocurre usualmente debido al aumento de la síntesis de novo y no parece depender tanto de eventos de proteólisis (Heuer, B., 2010). La reducción en la turgencia es probablemente el desencadenante principal para la acumulación de prolina en plantas bajo estreses relacionados con la ósmosis como sequía, estrés térmico y salinidad. Estas condiciones usualmente inducen el cierre estomático, limitando la absorción de carbono y posteriormente disminuyendo el consumo de NADPH por el ciclo de Calvin, agotando el pool del aceptor de electrones NADP⁺. Las plantas bajo estrés también muestran cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial que impiden que la prolina alcance su sitio de oxidación. También demuestran una incorporación deteriorada de prolina a las proteínas para mantener altos niveles de prolina libre en el citoplasma y los cloroplastos (Heuer, B., 2010).

1.10.3 DETECCIÓN, SEÑALIZACIÓN Y TRANSPORTE DE PROLINA.

La prolina tiene diferentes funciones en las plantas durante el crecimiento y desarrollo y la exposición a estrés biótico y abiótico. Por lo tanto, el contenido de prolina y su transporte en las plantas son esenciales para la producción de cultivos en mayor calidad y cantidad.

En condiciones de estrés abiótico, el transporte de prolina depende de las señales ambientales (Meena *et al.*, 2019).

El metabolismo de la prolina en las plantas se ha investigado durante más de 40 años, pero se sabe poco sobre las vías de señalización (Hayat *et al.*, 2012). Junto al metabolismo de la prolina, el transporte intracelular de prolina tiene lugar entre el citosol, los cloroplastos y las mitocondrias. El transporte de prolina y su cantidad en diferentes tejidos como el xilema y el floema están influenciados y controlados por la glutamina sintetasa (Mondal *et al.*, 2021). La glutamina es la primera molécula nitrogenada orgánica que se transamina para producir otros aminoácidos o compuestos que contienen N (Pratelli & Pilot, 2014). En plantas no estresadas, la prolina se acumula en las vacuolas, mientras que bajo estrés abiótico se detecta un alto contenido de prolina en el citosol (Gagneul *et al.*, 2007). Además, bajo diferentes tensiones, la prolina representa hasta el 80 % del conjunto total de aminoácidos libres en comparación con menos del 5 % en condiciones normales. Esta mayor acumulación de prolina en condiciones de estrés se atribuye a una biosíntesis mejorada y una degradación limitada de esta molécula (Kaur *et al.*, 2017). Se cree que la biosíntesis de prolina está controlada por enzimas que se encuentran en el citosol, como P5CS1, P5CS2 y P5CR, mientras que la degradación de prolina se realiza por enzimas presentes en las mitocondrias, como PDH1/ERD5, PDH2, P5CDH y OAT (Szabados, & Saviouré, 2010). El transporte de prolina a través de la membrana plasmática se realiza mediante dos grandes grupos de transportadores: el aminoácido-poliamina-organocación (APC) y la familia de transportadores de aminoácidos (ATF), cada uno de los cuales se divide en subfamilias. La familia ATF incluye permeasas de aminoácidos (AAP), transportadores de lisina e histidina (LHT), transportadores de L-prolina (ProT), permeasas de aminoácidos/auxina (AAAP), transportadores de γ -aminobutirato (GAT), transportadores de aminoácidos aromáticos y neutros, y proteínas similares a transportadores de aminoácidos. La familia APC está compuesta por transportadores de aminoácidos/colina, transportadores de poliaminas H⁺ (PHS) y transportadores de aminoácidos catiónicos (CAT) (Hossain *et al.*, 2021).

JUSTIFICACIÓN

La salinidad excesiva en los suelos es un problema creciente en México, afectando negativamente la productividad y calidad de los cultivos agrícolas, incluyendo el Agave. Esta investigación busca abordar este desafío mediante el estudio del papel de la prolina en la adaptación de las plantas a la salinidad del suelo.

La literatura sugiere que la prolina juega un papel crucial en la respuesta de las plantas al estrés abiótico, como la salinidad. Sin embargo, se requiere una comprensión más profunda de los mecanismos involucrados en la síntesis y acumulación de prolina en condiciones de salinidad.

Comprender los niveles de prolina en *Agave fourcroydes*, tiene importantes implicaciones en la agricultura y la biotecnología. La selección de variedades con mayores niveles de prolina podría mejorar la tolerancia al estrés inducido por la salinidad en los cultivos de agaves. Este enfoque podría contribuir significativamente a mitigar los efectos negativos de la salinidad del suelo en la producción agrícola y promover la sostenibilidad de los sistemas de cultivo.

HIPÓTESIS

Si el estrés por salinidad modifica los contenidos de prolina en diferentes especies, entonces este tipo de estrés pudiera tener los mismos efectos en *Agave fourcroydes*.

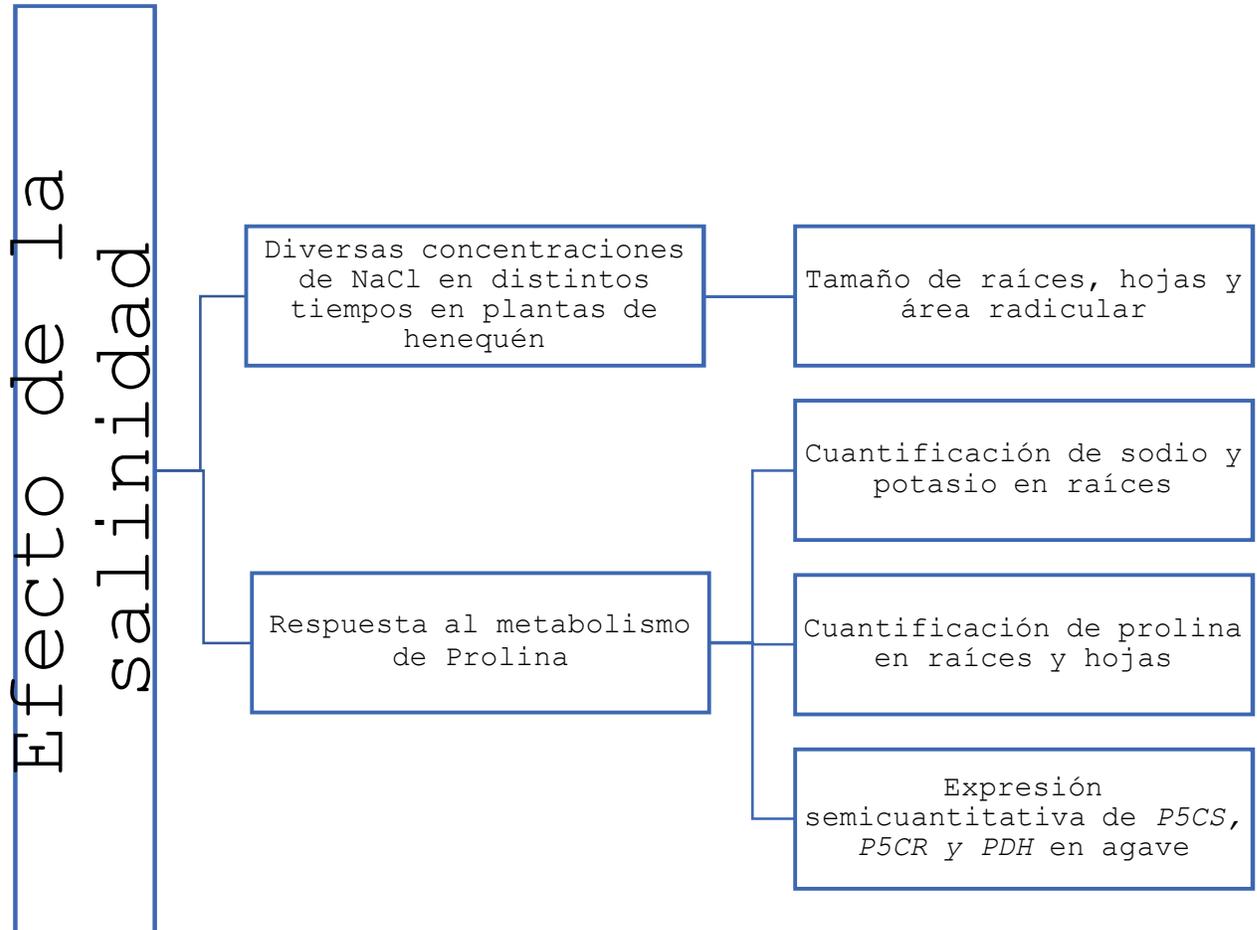
OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del estrés salino (NaCl) sobre el metabolismo de prolina en plantas de henequén (*Agave fourcroydes*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la tolerancia al estrés salino en *Agave fourcroydes*.
- Evaluar las modificaciones del contenido de prolina en condiciones de estrés salino en *A. fourcroydes*.
- Analizar la expresión de los genes *P5CS*, *P5CR* y *PDH* bajo condiciones de estrés salino involucrados en el metabolismo de prolina en *A. fourcroydes*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal empleado fueron 63 plantas de *A. fourcroydes* provenientes de cultivo de tejidos, adaptadas a condiciones de invernadero durante 12 meses. Posteriormente se transfirieron en recipientes de plástico con vermiculita y con solución Hoagland a 1/5 de su fuerza iónica durante un mes y posteriormente se adicionó a esta solución las concentraciones de NaCl correspondientes a cada tratamiento (0mM, 25mM, 50mM, 100mM, 150 mM NaCl) regándose cada 3 días hasta la cosecha de cada tratamiento, en cada día correspondiente (15,30 45 y 60 días respectivamente).

2.2. CUANTIFICACIÓN DE SODIO Y POTASIO

En cada tiempo de cosecha (15,30 45 y 60 días) las plantas 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 pesaron 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. Posteriormente, se realizó la digestión ácida de los tejidos con 5 mL de HCl al 40% sobre una placa de calentamiento, se le adicionó 1 mL de HCl al 100% y se aforó a 25 mL de agua desionizada hasta su posterior lectura. La determinación del contenido de K⁺/Na⁺ en hojas y raíces se realizó en un espectrofotómetro de absorción atómica modelo 2380 Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA).

2.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROLINA EN RAÍCES Y HOJAS

Para determinar el contenido de prolina se utilizó la metodología descrita por Bates *et al.* (1973) modificada y el protocolo reportado por Escalante Magaña (2020). El material vegetal (peso fresco) de raíz y hoja (0.1 gr) se macero 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 µL de ninhidrina ácida y 200 µL del sobrenadante del extracto vegetal (mezcla de reacción), los cuales se incubaron a 96-100 °C por 60 min., posteriormente, los tubos se

incubaban 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 previamente fue agitada vigorosamente por un tiempo de 20 segundos hasta la separación de las fases orgánica y acuosa. En una cubeta de cuarzo se transfiere la fase orgánica que contiene al cromóforo y se realiza la lectura a una absorbancia a 520 nm.

El tolueno fue utilizado como blanco; y la concentración de prolina se determinó a partir de una curva de concentración estándar calculada con base al peso fresco (usualmente expresado como microgramo por gramo o micromol por gramo de peso fresco, respectivamente) de donde se partió.

2.4 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL Y SÍNTESIS DE ADNc

Se utilizaron tejidos de raíz y hojas (0.1 gr) de plantas de *A. fourcroydes*, que se encontraban bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

Para la extracción del ARN total de los tratamientos con NaCl, se utilizó la metodología del TRIZOL. En breve se tomó 0.1 gr de tejido (hoja y raíz) pulverizado, se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL y se añadió 1 mL del reactivo de TRizol mezclando por inmersión. Posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 12 000 rpm a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 mL y se le adicionaron 200 µL de cloroformo, para posteriormente mezclarlo en vortex por 15 segundos he incubarlo por 3 min a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 min a 4°C, se tomó la fase acuosa superior, se transfirió a un tubo nuevo y se le adicionaron 500 µL de isopropanol frio al 100% para incubar las muestras durante 10 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 12 000 rpm por 10 min a 4°C, se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 75%, se mezcló en vortex 10 segundos y se centrifugó a 7 500 rpm por 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se dejó secando de 10 a 40 min. Se resuspendió el ARN total en 50 µL de agua con DEPC (dietilpirocarbonato) estéril. La integridad del ARN se evaluó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Para la cuantificación las muestras de ARN de cada tratamiento, se cuantificó en el equipo NANODROP 2000 (Thermo SCIENTIFIC).

Para evitar posibles contaminaciones con ADN genómico, el ARN total (5 µL) se trató con un mix de DNAsa I (2 µL), regulador de DNAsa I (2 µL) y agua libre de DNAsa (6 µL) incubando a 37 °C por 30 min y la reacción se detendrá con una solución STOP (EDTA) a 65 °C por 10 min.

Posteriormente, se procedió a realizar la síntesis de la primera cadena de ADNc mediante transcripción reversa. Por lo que se prepararon diluciones a 100 ng/µL de cada muestra. Se mezclaron 15µL del ARN tratado con 2µL de Oligo dT y 3µL de agua (Volumen final 20µL). Se incubó a 70°C. por 10 min. Y posteriormente se dejó reposando en hielo durante 10 min. Se preparó la mezcla de la RT con: 1µL transcriptasa reversa, 4µL regulador de reacción, 1µL dNTP's, 2.6µL MgCl₂, 0.5µL RNAsin, 5.9µL agua libre de nucleasas (Volumen final =15µL). Se mezclaron los volúmenes de la reacción de oligo dT y de RT para un Volumen final de 35µL. Se incubó a 25°C. por 5 min. e inmediatamente se incubó de nuevo a 42°C. por 60 min. La RT se inactivó incubando a 70°C por 15min. Finalmente se cuantifico el ADN complementario y se prepararon diluciones de 100 ng/µL para su posterior amplificación con el gen de interés.

2.5. EXPRESIÓN SEMICUANTITATIVA DE LOS GENES *P5CS*, *P5CR* Y *PDH* EN AGAVE SOMETIDA A ESTRÉS POR NaCl.

Una vez obtenido el ADNc se procederá a evaluar los niveles de transcritos de *P5CS*, *P5CR* y *PDH* a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores específicos para *A. fourcroydes*, los cuales fueron diseñados con base en las secuencias de los genes de interés.

Para la obtención de las secuencias de los genes de interés (*P5CR*, *P5CS*, *PDH*) se utilizaron bases de datos como NCBI y Phytozome, y se utilizaron como referencia secuencias de especies cercanas a *Agave fourcroydes* (*Agave tequilana*, *Yucca aloifolia*, *Yucca filamentosa*, *Asparagus officinalis*).

Se realizó un alineamiento entre estas especies para analizar y tomar los sitios conservados en las secuencias para el diseño de los cebadores, los cuales se diseñaron empleando el programa Oligo.

La secuencia de los cebadores para AfP5Cr es: F_P5CR_90 5' GTC CGG CGT CCT CCC CCC TT 3'; R_P5CR_349 5' ACC CTG ATT ACT CGT CGA TG 3' (fragmento corto) y R_P5CR_584 5' AGG AAG ACC AGC AGC CAC AC 3' (fragmento largo).

Para AfP5CS la secuencia de los cebadores es: F_P5CS_30 5' CGT CAA GCG CAT TAT CGT CA 3'; R_P5CS_233 5' TGG GGG TTT TTG GAG ATC AG 3' (fragmento corto) y R_P5CS_524 5' TGC CAA CAG AGC CGC TAA AC 3' (fragmento largo).

Para AfPDH la secuencia de los cebadores es: F_PDH_17 5' GAA TCC TCG CCA ACA AAA CC 3'; R_PDH_184 5' AGG ATG GCC AGC GAG CGG AC 3' (fragmento corto) y R_PDH_584 5' CGG GTC TTT CTT CTG CCA TC 3' (fragmento largo).

Posteriormente, se utilizarán estos cebadores para evaluar los niveles de transcritos de *P5CS*, *P5CR* y *PDH* mediante una PCR, asegurándonos de que las condiciones de reacción serán las adecuadas para cada cebador, utilizando también controles positivos y negativos.

2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con un análisis ANOVA de una vía, y se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey utilizando el software SigmaPlot® versión 12.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RESULTADOS.

Para esta etapa inicial se trabajó con plantas de *Agave fourcroydes* que son provenientes de cultivo de tejidos y fueron adaptadas a condiciones de invernadero durante casi 12 meses.

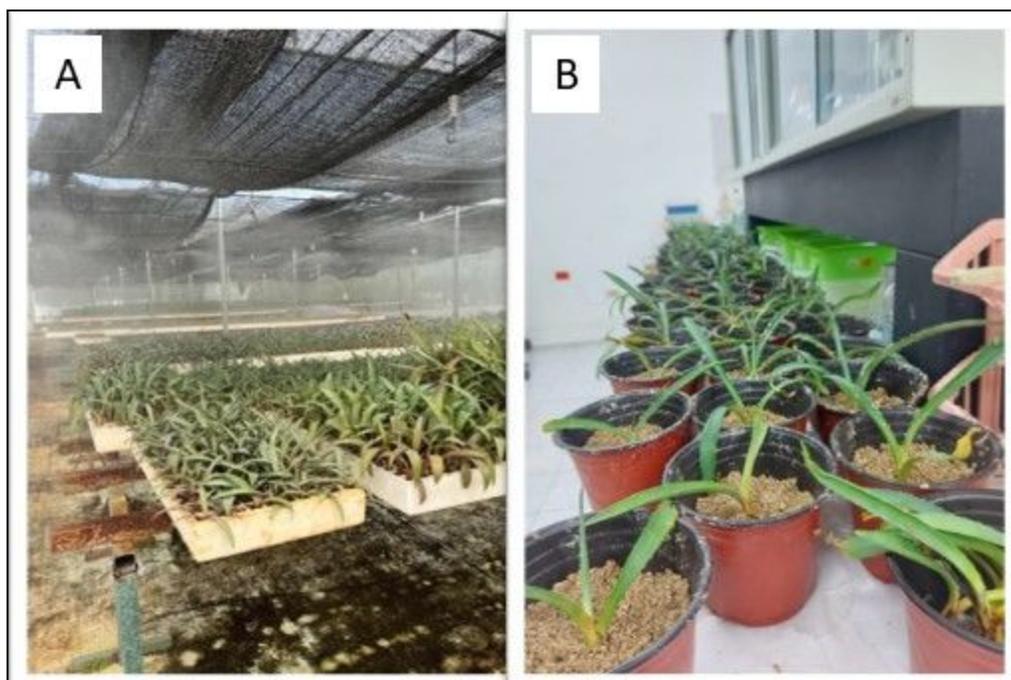


Fig. 5 - Material de partida A) Plantas en condición de invernadero. B) Plantas de *Agave fourcroydes* en el sustrato.

A partir de ese material fueron seleccionadas 63 plantas, homogéneas en el tamaño y número de hojas. Como se observa en la figura 5, las plantas seleccionadas fueron trasplantadas en recipientes de plástico con sustrato después de 60 días de aclimatación se comenzó la adición de las diferentes concentraciones de NaCl para la colecta de muestras y su análisis. Las plantas fueron sometidas a diversas concentraciones de NaCl (0, 25, 50, 100, 150 mM) y el monitoreo de estas se realizó a los 15, 30, 45 y 60 días de cultivo posteriores al tratamiento.

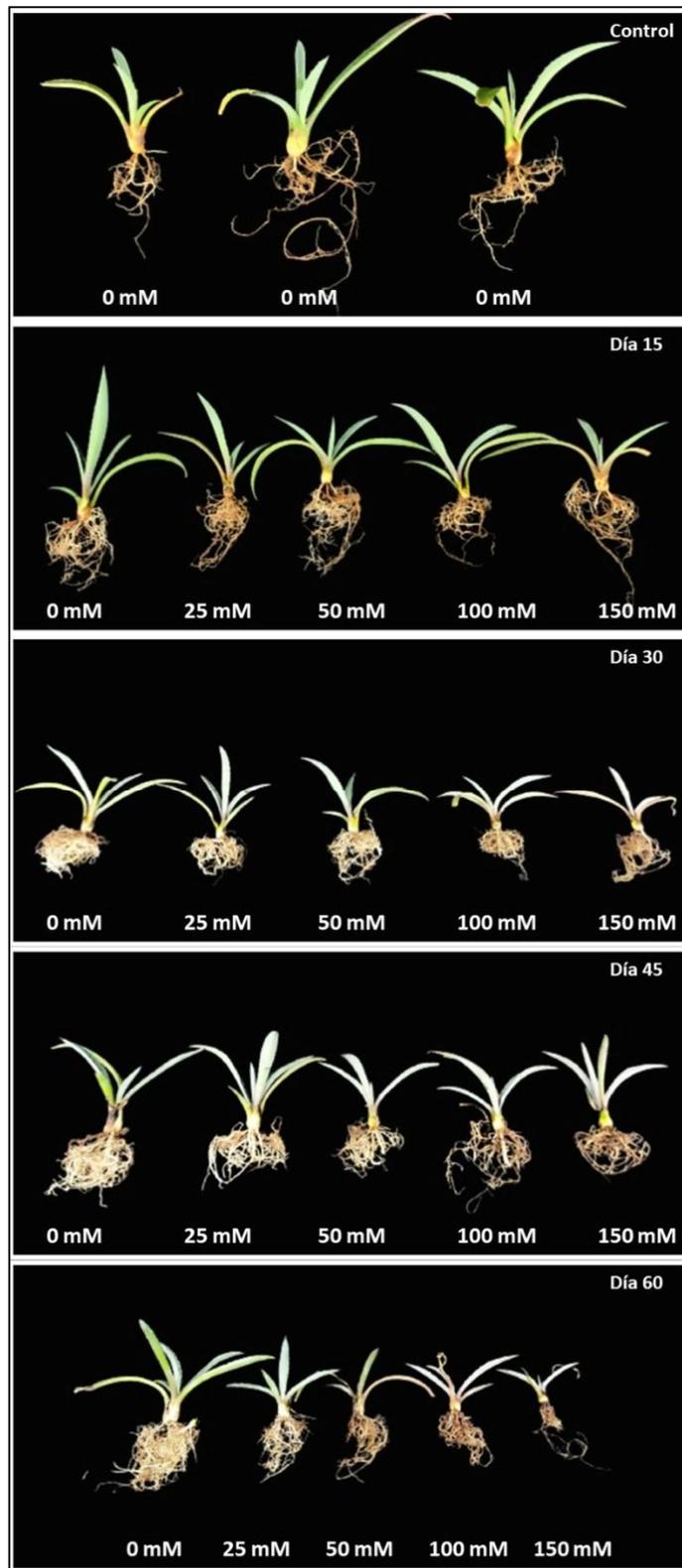


Fig. 6 - Plantas de *A. fourcroydes* sometidas a diferentes tratamientos de NaCl.

En la figura 6 se muestran las plantas de *A. fourcroydes* bajo diferentes condiciones: sin tratamiento (testigo) y expuestas a concentraciones variables de NaCl (0, 25, 50, 100 y 150 mM). A los 15 días, no se observan diferencias en tamaño entre las plantas testigo y aquellas tratadas con 0 mM de NaCl. Sin embargo, en los demás tratamientos se pueden apreciar ligeras diferencias en el tamaño respecto a las plantas control, aunque estos cambios no son marcados.

A los 30 días del tratamiento con NaCl, se evidencian diferencias en el sistema radicular y en el número de hojas en comparación con el día 15 y las plantas control. Además, se observa una ligera disminución en el tamaño de las plantas tratadas con 150 mM de NaCl respecto a su estado a los 15 días y a las plantas control.

A los 45 días, se notan afectaciones más notorias en la raíz y la altura de las plantas, especialmente en las concentraciones de 100 y 150 mM de NaCl, en comparación con las afectaciones en el día 30 y las plantas control.

A los 60 días de tratamiento se observa una disminución en el tamaño de las plantas de agave dependiente de la concentración de NaCl, siendo la disminución más drástica a 150 mM. También fue evidente una disminución en la longitud y número de hojas en los tratamientos con 25-150 mM de NaCl, principalmente a la mayor concentración. El sistema radicular disminuyó con las concentraciones de NaCl, y se observó cambios en la coloración de las raíces, estas fueron más oscuras (marrón) en comparación con el control. Los síntomas más drásticos del estrés salino en las plantas de agave se observaron a la mayor concentración, 150 mM de NaCl (Figura 6). Esto pudiera ser debido a que las plantas adultas de *Agave* suelen tolerar niveles altos de sales mediante un ajuste osmótico, que implica la reducción del contenido de agua y un aumento en los iones Na^+ y Cl^- en los brotes (Schuch y Kelly, 2008). Además, estas plantas pueden evitar la acumulación de sal en sus hojas como una adaptación al estrés salino. Sin embargo, debido a que las plantas estudiadas aquí eran plantas jóvenes, desconocemos la capacidad de estas para almacenar sales.

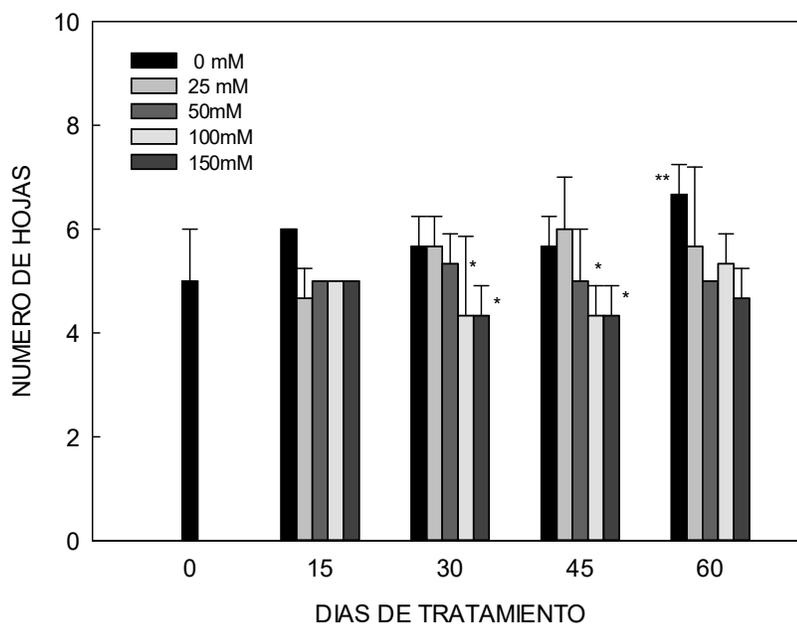


Fig. 7 - Comparación del número de hojas de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey (n=63, P<0.01).

La caracterización de los parámetros fisiológicos de las plantas en este estudio es de vital importancia como referente para interpretar los resultados derivados de los experimentos de estrés, por lo cual, se estudiaron las características fisiológicas de crecimiento de las plantas en dicho estudio y se cuantificó el número de hojas, tamaño de la planta, así como el peso fresco de hojas y raíces.

En la figura 7 se presentan los resultados del número de hojas en plantas tratadas con diferentes concentraciones de NaCl. Los datos indican que las principales diferencias se observan en la concentración de 0 mM al día 60, así como en las concentraciones de 100 y 150 mM en los días 30 y 45. Para los demás tratamientos y tiempos no se detectaron diferencias significativas. Las plantas demostraron tolerancia a pesar de las altas concentraciones de NaCl, esto debido a que el número de hojas no disminuyó tanto en comparación de las concentraciones más bajas con las más altas. El efecto de la concentración de NaCl hasta 25 mM en el número de hojas no fue significativo, excepto en la concentración de 0 mM al día 60. Además, los efectos del estrés salino sobre las características morfológicas de *Agave fourcroydes* fueron mínimos. Esto es consistente con

el estudio de *Aloe vera* (Derouiche *et al.*, 2023), que mostró cómo diferentes concentraciones de NaCl afectan las características de las hojas en la planta *Aloe brevifolia*. En ese estudio, concentraciones de hasta 51 mM de NaCl no tuvieron un efecto significativo en el número y grosor de las hojas. Asimismo, a una concentración de 155 mM de NaCl, los efectos del estrés salino fueron mínimos, registrándose sólo una disminución del 15% en el grosor de las hojas y menos de tres hojas adicionales en comparación con las plantas de control no expuestas a salinidad.

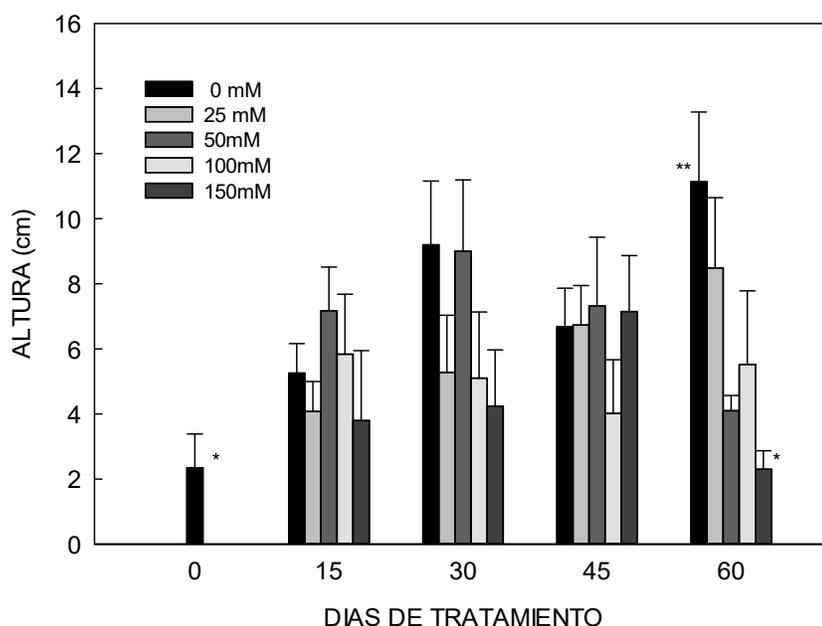


Fig. 8 - Comparación de la altura de las plantas de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey ($n=63$, $P<0.01$).

En la figura 8 se muestra la cuantificación de la altura de las plantas de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento. En esta gráfica, los resultados muestran que las principales diferencias están entre la concentración de 0 mM al día 60, con la concentración de 0 mM del día 0 y 150 mM en el día 60. Esto coincide con lo reportado por Miyamoto (2008) quien encontró que las plantas de *A. americana* mostraban una alta tolerancia a niveles elevados de sal y no experimentaron reducción en su crecimiento cuando se regaban con agua con una conductividad eléctrica (CE) de $9,4 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$.

Fuentes y Rodríguez (1988) revelaron que la altura de las hojas y los brotes se reducía al aumentar la salinidad en diferentes *Aloe spp.*; también Kock (1980) Upchurch (1981) y Nobel y Berry (1985) obtuvieron los mismos resultados sobre *Agave spp.* El éxito en establecerse en niveles tan elevados de salinidad sugiere que al menos algunas especies de *Agave* muestran una notable capacidad de tolerancia a la sal. Varios estudios previos han demostrado el efecto negativo del estrés salino en el desarrollo de varias plantas: okra (Gouveitcha *et al.* 2021), tomates (Kinsou *et al.* 2019), habas (Benidire *et al.* 2015), chiles (Kpinkoun *et al.* 2019), azafrán (Mzabr *et al.* 2017) y romero (Chetouani *et al.* 2019).

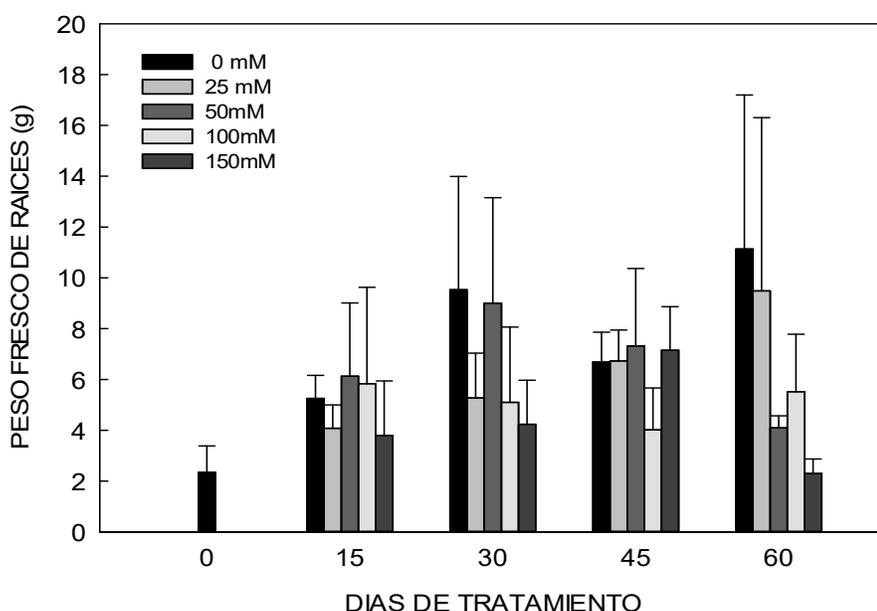


Fig. 9 - Comparación del Peso Fresco de Raíces de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey (n=63, P<0.01).

En la figura 9 se muestran los resultados de la comparación del peso fresco de raíces de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento. En cuanto a los resultados obtenidos, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y entre los diferentes días de evaluación. Sin embargo, a los 60 días del experimento se observa una tendencia en la disminución del peso fresco a partir de 50 mM de NaCl. Schuch y Kelly (2008) encontraron que cuando se riega con

agua con una CE de $5 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$, los pesos secos de las plantas de *A. parryi* en macetas disminuyeron en un 33% en comparación con las plantas cultivadas en el campo expuestas a condiciones de baja salinidad ($0,6 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$). Esto indica que algunas plantas de *Agave* de la misma especie pueden ser más tolerantes a la salinidad que otras. Estos datos de peso fresco coinciden con los estudios de Bergsten (2013) donde *A. parryi* se desempeña bien en niveles de CE de hasta $6,0 \text{ dS/m}^1$. En cambio, Miyamoto (2008) descubrió que el crecimiento de las plantas de *A. parryi* de un año de edad se redujo significativamente a $9,4 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$.

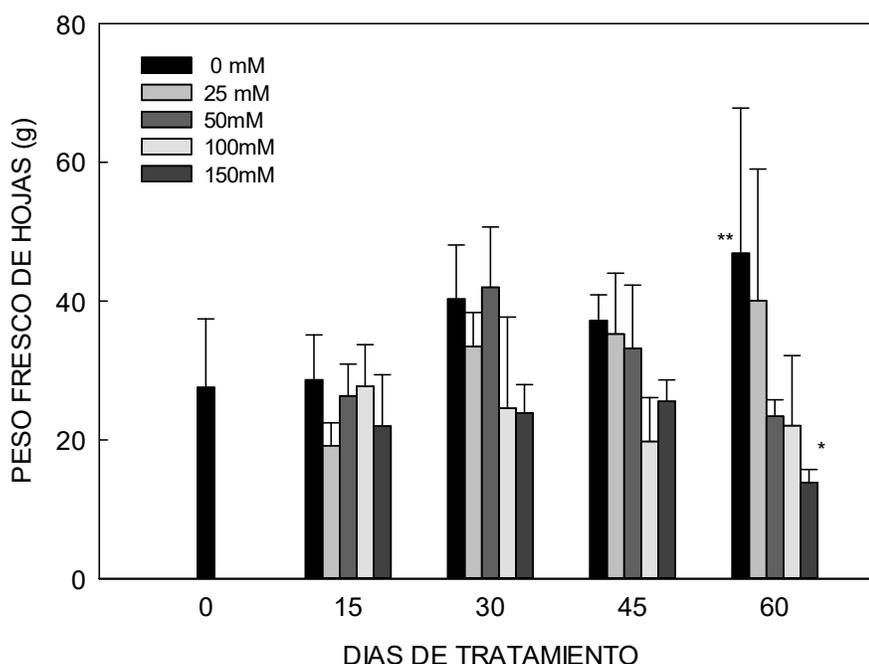


Fig. 10 - Comparación del Peso Fresco de hojas de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey ($n=63$, $P<0.01$).

En la figura 10 se muestra la comparación del peso fresco de hojas de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento. Los resultados muestran diferencias significativas en el peso fresco de las hojas solo en el día 60 entre el tratamiento testigo y 150 mM de NaCl. Sin embargo, considerando que los datos pasaron la prueba de normalidad, la desviación estándar es muy grande en algunos tratamientos. En general, la desviación estándar es mayor en los tratamientos con

concentraciones más altas de NaCl y en los días de crecimiento más tardíos. Estas diferencias se hacen más evidentes estadísticamente a la concentración de 150 mM en el día 60 de cultivo, pero también podemos comentar que las tendencias en los días 30 y 45, de igual forma, son a la disminución del peso fresco de las hojas, aun no mostrando diferencias estadísticas. Esto podría deberse a que las concentraciones más altas de NaCl tienen un mayor efecto sobre el crecimiento de las plantas, lo que resulta en una mayor variabilidad en el peso fresco de las hojas. Además, los días de crecimiento más tardíos podrían estar asociados con una mayor variabilidad ambiental, lo que también podría contribuir a una mayor desviación estándar.

Es importante destacar que los datos obtenidos son el resultado de un estudio a corto plazo con plantas de agave expuestas a estrés salino durante 60 días de tratamiento; por tal motivo, no fue posible observar diferencias estadísticas entre las concentraciones. Para agaves la tasa de crecimiento es lenta y a nivel fenotípico es muy difícil encontrar tales diferencias a corto plazo, aun estando sometidas a un estrés severo como el de 150 de NaCl, por lo que, los parámetros fisiológicos pudieran no darnos una respuesta clara del efecto.

Las plantas de *Agave* son originarias de México y tienen un papel importante en la industria de alimentos funcionales. Los agaves crecen, fundamentalmente, en suelos secos y desérticos, que tienen un alto contenido de sal; sin embargo, se sabe poco sobre su respuesta a las condiciones de salinidad (Puente-Garza *et al.*, 2021)

La cuantificación de Na⁺ y K⁺ es importante como parámetros directamente relacionados con la tolerancia de las especies vegetales al estrés salino. El contenido de sodio y potasio en hojas y raíces se determinó por absorción atómica mediante una digestión ácida de las hojas y raíces.

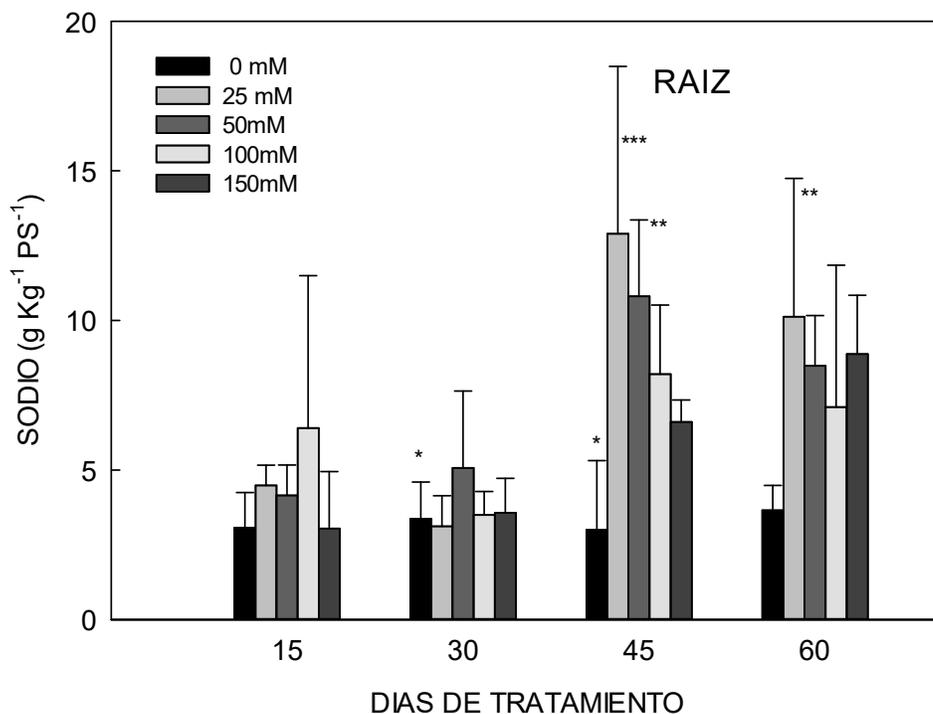


Fig. 11 - Comparación del contenido de Na^+ en raíces de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey ($n=63$, $P<0.01$).

El Na^+ , es tóxico para la gran mayoría de las plantas, principalmente en las plantas glicófitas. Este elemento se encuentra en concentraciones muy bajas en el citoplasma de las células y se acumula en vacuolas; el sistema de toma de Na^+ no depende del consumo de energía celular ya que este se interioriza de manera pasiva a favor de su gradiente electroquímico y modifica una serie de vías metabólicas que deben ser atendidas a nivel celular con precisión.

En la figura 11 se muestran los resultados del contenido de Na^+ en las raíces de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl . Podemos observar que a partir de las concentraciones de 25 mM de NaCl hay un aumento en comparación con las concentraciones de 0 mM en todos los casos, esta tendencia es más pronunciada en los primeros DDC (15 y 30 días) y se estabiliza en los DDC posteriores (45 y 60 días), sin embargo, a partir de los 25 mM comienza a disminuir el contenido de Na^+ en raíces al aumentar las concentraciones de NaCl en las plantas.

Al día 30 no hay diferencia en el contenido de Na^+ entre los tratamientos, incluyendo el control. A los 45 días de tratamiento, el contenido de Na^+ incremento al doble en las raíces de los tratamientos 25 y 50 mM de NaCl; también se observó un aumento de Na^+ en las otras dos concentraciones de sal. El contenido de Na^+ se mantuvo al día 60 y no se observaron diferencias entre los tratamientos con NaCl, pero si entre el tratamiento 25 mM y el testigo. Al no observaron un aumento en el contenido de Na^+ entre los tratamientos, es posible que exista una saturación en el transporte de este ion o un equilibrio por una adaptación a las condiciones de exceso de sodio.

La relación K^+/Na^+ es importante como uno de los parámetros para determinar el grado de tolerancia de alguna especie a salinidad en los suelos, por lo que se hace indispensable cuantificar los contenidos de K^+ y determinar la relación K^+/Na^+ . La relación entre el sodio (Na^+) y el potasio (K^+) en las plantas de *Agave* es crucial para comprender si la retención de K es un factor de tolerancia al estrés salino en agaves.

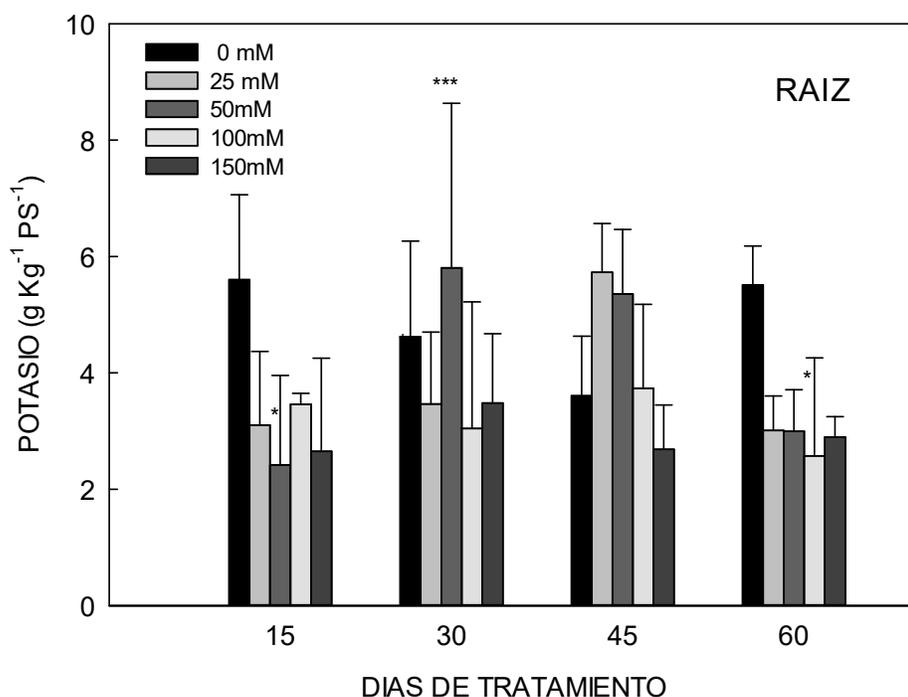


Fig. 12 - Comparación del contenido de K^+ en raíces de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey ($n=63$, $P<0.01$).

En la figura 12 se muestra la cuantificación del contenido de K^+ en raíces de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl. El contenido de K fue mayor en el tratamiento testigo, y menor en los tratamientos con NaCl, principalmente con altas concentraciones como 100 mM y 150 mM de NaCl. El contenido de K^+ disminuyó con el tiempo, con la concentración de NaCl. Este resultado era el esperado pues el incremento en los contenidos intracelulares de Na^+ provoca una despolarización de la membrana y por ende una fuga de K^+ hacia el exterior de la célula a través de los canales de rectificación saliente de K^+ (KOR) o canales catiónicos no selectivos (NSCC). Es congruente observar que al día 60 de tratamiento, el contenido de K^+ se reduce en todos los tratamientos con NaCl (25-150 mM); por lo tanto, esto nos permite concluir que la retención de K no es un mecanismo de tolerancia en agaves (Shabala y Pottosin, 2014) por lo menos en nuestro estudio.

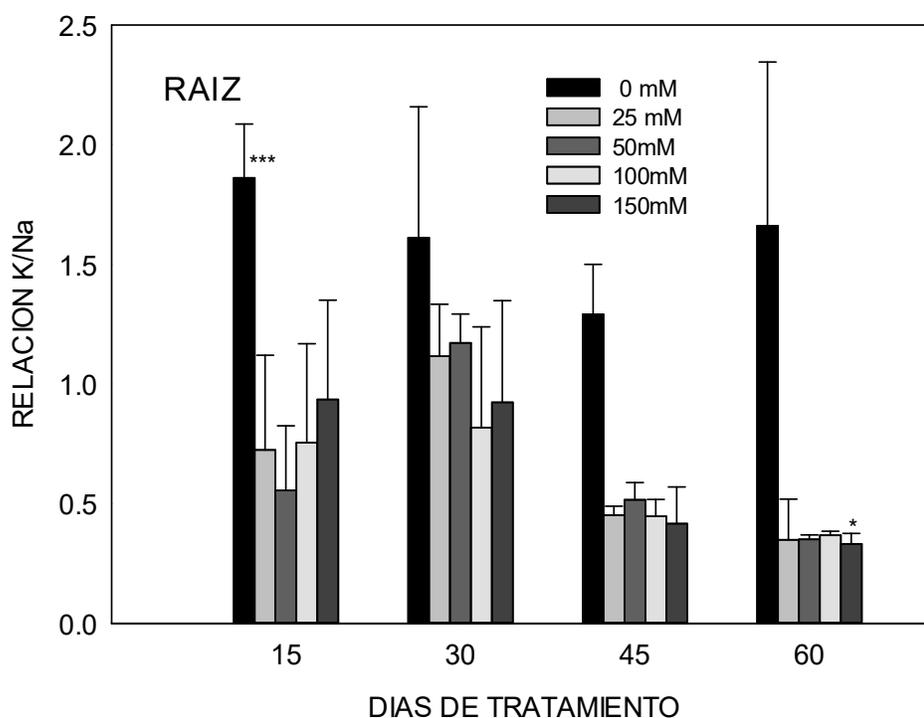


Fig. 13 - Relación de K^+/Na^+ en raíces de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey ($n=63$, $P<0.01$).

La figura 13 ilustra la relación K^+/Na^+ (potasio/sodio) en raíces de *Agave fourcroydes* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl durante 60 días de tratamiento. La disminución de la relación K^+/Na^+ en raíces refleja un aumento en la concentración de Na^+ y una disminución en la concentración de K^+ . Una relación mayor a 1 indica que la planta está reteniendo potasio y esto es de vital importancia para su tolerancia. Por otro lado, una relación >1 indica que las concentraciones intracelulares de Na^+ son mayores que las de K^+ , indicando un desbalance iónico y posible toxicidad. Por ejemplo, aunque Na^+ también es un catión monovalente, no es capaz de sustituir al K^+ en sus funciones biológicas. La figura muestra la relación K^+/Na^+ menor a 1 en raíces de los tratamientos con NaCl (25-150mM), siendo la relación $K/Na \geq 0.5$ en los días 45 y 60 del experimento. Este cambio en el equilibrio iónico puede tener diversas consecuencias fisiológicas, tales como la disminución de la absorción de K^+ , la acumulación de Na^+ en las células o el cierre de estomas. La desviación estándar observada en la relación K^+/Na^+ en raíces puede atribuirse a diversos factores, como la variabilidad natural de las plantas, la heterogeneidad del suelo en cuanto a la disponibilidad de Na^+ y K^+ , y las condiciones ambientales durante el crecimiento, como la temperatura, la humedad y la luz solar.

Por tanto, los resultados del análisis muestran la capacidad de las plantas de *A. fourcroydes* para acumular Na^+ en sus raíces, esto contrario a lo que asumimos es un síntoma de susceptibilidad al estrés salino. Por lo que, esta acumulación de Na^+ puede tener consecuencias fisiológicas negativas si no se acompaña de mecanismos para mantener una relación K^+/Na^+ favorable.

Ríos-Ramírez *et al.*, (2021) demostraron que, en *Agave angustifolia*, las plantas con suministro adecuado de potasio crecieron más y fueron más vigorosas en comparación con aquellas con deficiencia de potasio. Además, las plantas expuestas a altos niveles de sodio mostraron una disminución en la relación K^+/Na^+ , afectando negativamente su crecimiento y desarrollo. Esto concuerda con estos resultados respecto a que las altas concentraciones de NaCl afectan el desarrollo de los agaves.

Por otro lado, Rodríguez y colaboradores (2023), reportaron un estudio sobre cómo diferentes niveles de potasio y sodio en suelo afectan el crecimiento de *Agave durangensis*. Los resultados muestran que las plantas cultivadas en suelos con niveles adecuados de potasio tienen mejor crecimiento, mayor producción de biomasa y mejor salud general. Lo anterior tiene un impacto en este análisis, ya que con base a eso se puede concluir que las

plantas expuestas a altos niveles de NaCl muestran síntomas de estrés y reducción en la relación K^+/Na^+ , lo que impacta negativamente su crecimiento.

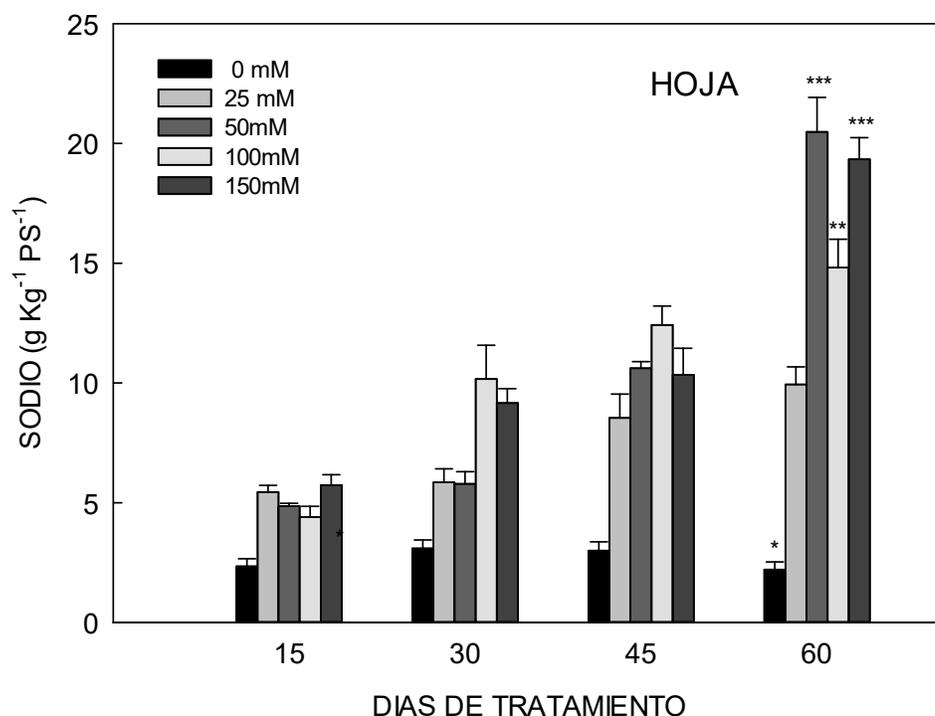


Fig. 14 - Comparación del contenido de Na^+ en hojas de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey ($n=63$, $P<0.01$).

En la figura 14 se muestra el contenido de sodio en las hojas de las plantas tratadas con NaCl. Los resultados indican que el contenido más alto de sodio se obtuvo en el día 60 con las concentraciones de 50 y 150 mM. El segundo tratamiento con mayor cantidad de sodio también se observó en el día 60, pero con una concentración de 100 mM. Por otro lado, también existieron diferencias en las condiciones con menor cantidad de sodio, específicamente en el día 15 y en el día 60 con una concentración de 0 mM. Estos resultados sugieren que la cantidad de sodio de las hojas de las plantas aumenta con el tiempo y con mayores concentraciones de NaCl. Sin embargo, en ausencia de sal (0 mM), las plantas mantienen un bajo contenido de sodio en las hojas, incluso en los periodos más largos de tratamiento. Esto destaca la capacidad de las plantas para acumular sodio en respuesta al estrés salino, lo que puede ser un indicador importante de su tolerancia y

adaptación a estos ambientes. Sin embargo, el sodio puede acumularse en exceso en las células de la planta, provocando toxicidad y rompiendo la homeostasis iónica, lo que inhibe muchas enzimas y procesos metabólicos. Para combatir el exceso de sodio, las plantas tolerantes a la salinidad (halófitas) emplean estrategias como la compartimentación del sodio en la vacuola, evitando su acumulación en el citoplasma y protegiendo así sus funciones celulares críticas (Ariza, 2012).

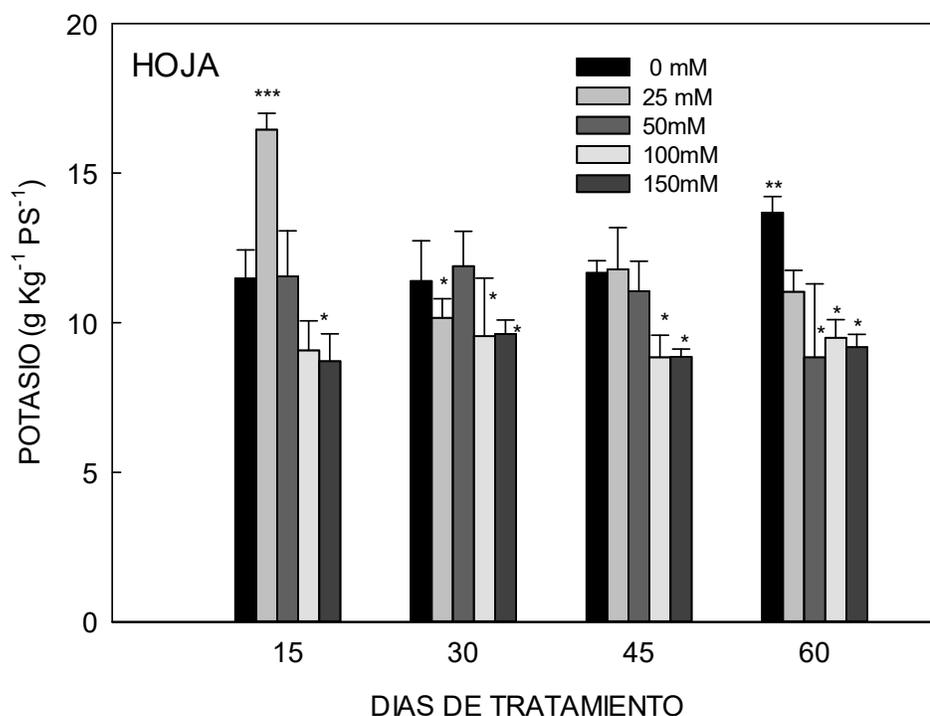


Fig. 15 - Comparación del contenido de K^+ en hojas de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey ($n=63$, $P<0.01$).

En la figura 15 se muestra el contenido de potasio en las hojas de *A. fourcroydes*. El tratamiento con la mayor cantidad significativa de K^+ se observa en el día 15 a una concentración de 25 mM de NaCl. En el día 60 el mayor contenido de K^+ registrado fue en la concentración de 0mM. En el caso de los tratamientos del día 15, 30 y 45, se pudo observar que a partir de 50mM de NaCl había una disminución en el contenido de K^+ . En el trabajo de Lastiri *et al.* (2017), se encontró que la concentración de K^+ es más baja en plantas como pasto ryegrass (*Lolium perenne*), avena (*Avena sativa*) y cebada (*Hordeum*

vulgare) cuando están estresadas por salinidad en comparación con los tratamientos sin estrés. Esto sugiere que el potasio es un mecanismo clave de tolerancia al estrés salino, debido a su capacidad para mantener la turgencia celular, el ajuste osmótico y el crecimiento.

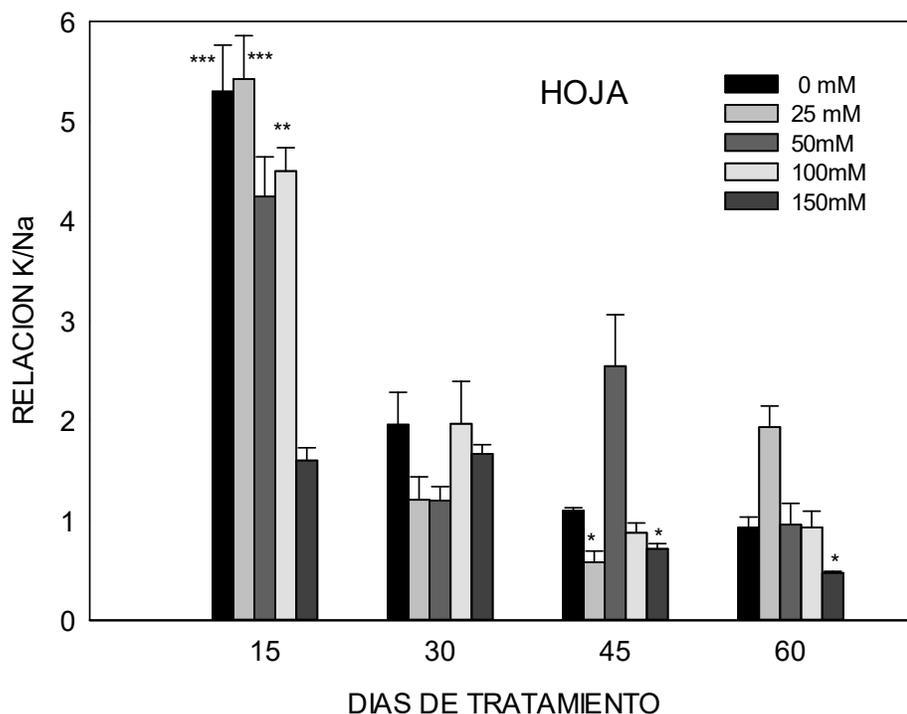


Fig. 16 - Relación de K^+/Na^+ en hojas de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey ($n=63$, $P<0.01$).

La figura 16 muestra la relación K^+/Na^+ en hojas de *A. fourcroydes* sometidos a diferentes concentraciones de NaCl, en este resultado, se puede observar que una relación mayor a 1 en los tratamientos a los 25 y 30 días lo que indica que los contenidos de K^+ son superiores a los de Na^+ , mostrando, es estos tiempos, una tendencia a la tolerancia de estas plantas, a pesar de estar acumulando Na^+ de manera significativa en las hojas, sin embargo las plantas cultivadas 45 y 60 días en presencia de las diferentes concentraciones de Na^+ muestran una relación menor a 1, lo que indica que el Na^+ está ocupando espacios destinados a K^+ en el citosol celular.

Con la cuantificación de esta relación se pueden identificar los efectos del estrés salino en el transporte de los iones en estudio, concluyendo que a medida que se incrementan los contenidos de Na^+ , el transporte de K^+ hacia el exterior celular se hace más activo.

En condiciones de estrés salino provocado por NaCl, las plantas típicamente absorben grandes cantidades de Na^+ , lo que resulta en una disminución de los niveles de K^+ en sus tejidos (Hasegawa *et al.*, 2000). Las plantas tolerantes a la sal generalmente acumulan Na^+ en sus tallos y hojas, mientras que las plantas sensibles no lo hacen. Ning *et al.* (2005) observaron que en *Aloe vera* sometido a estrés salino, los niveles de Na^+ y Cl^- aumentaron con la concentración de sal, mientras que los niveles de K^+ y Ca^{2+} mostraron una tendencia opuesta. El Na^+ se acumuló principalmente en el tallo, con cantidades menores en las hojas y raíces, mientras que el Cl^- se concentró principalmente en las hojas, con menor presencia en tallos y raíces.

Zheng *et al.* (2004) encontraron que, en plántulas de *Aloe vera* bajo estrés por NaCl, tienen un significativo aumento de Na^+ y Cl^- en secciones transversales de raíces y hojas, mientras que la absorción de K^+ y Ca^{2+} en las raíces y su transporte a las hojas fueron inhibidos. Blumwald *et al.* (2000) sugieren que, bajo alta salinidad, el Na^+ puede entrar en la célula debido a que sus radios iónicos hidratados son similares a los del K^+ , lo que dificulta que los transportadores discriminen entre estos dos iones. Las plantas utilizan diversas estrategias para limitar la entrada de Na^+ en las células, por ejemplo, la expulsión de Na^+ fuera de la célula. Otro mecanismo que evita la toxicidad iónica es la compartimentación de Na^+ en vacuolas para mantener la homeostasis iónica.

En un estudio de Murillo-Amador *et al.* (2014), se observó una alta acumulación de K^+ en las hojas de *Aloe vera* bajo moderado estrés por NaCl, indicando una absorción eficiente de K^+ . Este hallazgo coincide con la propuesta de Jacoby (1998), quien sugirió que la acumulación de K^+ ayuda a la planta a adaptarse a la salinidad al actuar osmóticamente y evitar la entrada de Na^+ en las raíces y brotes. La relación Na^+/K^+ también se ha propuesto como un indicador fitofisiológico para evaluar la sensibilidad de las plantas al estrés por NaCl (De Lacerda *et al.*, 2005). Estudios adicionales han demostrado que una alta relación Na^+/K^+ puede indicar trastornos metabólicos como reducción en la síntesis de proteínas y actividades enzimáticas, así como un aumento en la permeabilidad de la membrana (Brady *et al.*, 1984).

Uno de los mecanismos que utilizan las plantas para contrarrestar los efectos de los diferentes estreses abióticos es el incremento en los contenidos de prolina, reportado como marcador para determinar si una planta tiene niveles altos niveles de estrés, de ahí la importancia de su estudio.

Para determinar el contenido de prolina en raíces y hojas de *A. fourcroydes* se utilizó la metodología descrita por Bates *et al.* (1973) modificada y reportada por Escalante (2020).

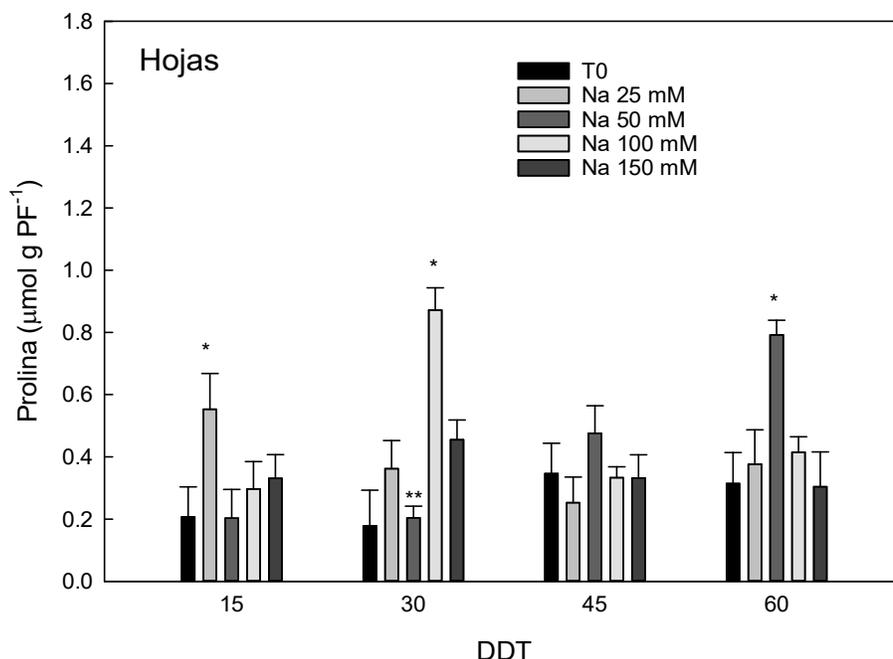


Fig. 17 - Comparación del contenido de prolina en hojas de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey (n=63, P<0.01).

En la figura 17 se muestran los resultados del contenido de prolina en hojas de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl. Se puede observar que existe una tendencia a que los contenidos de prolina incrementen a medida que incrementan las concentraciones de NaCl, haciendo énfasis en la concentración de 50 mM, y con algunas excepciones, por ejemplo, las plantas sometidas a 25 mM, y que estos incrementos dependen del tiempo en el cual la planta está sometida a la presión del estrés salino y de la concentración de NaCl a la cual están expuestas. De igual forma, el contenido de prolina fue mayor en concentraciones menores a 150 mM de NaCl en los diferentes días

de tratamiento, siendo las de mayor contenido de prolina las plantas con 100 mM de NaCl en el día 30. Se puede sugerir que la acumulación de prolina en esta especie ante estrés salino es muy selectiva, los mayores contenidos no se presentan en las mayores concentraciones de NaCl a excepción del día 30 de tratamiento en 100 mM de NaCl. Lo más probable es que la respuesta al estrés salino en esta especie sea diferente a otras especies, e inclusive a plantas del mismo género.

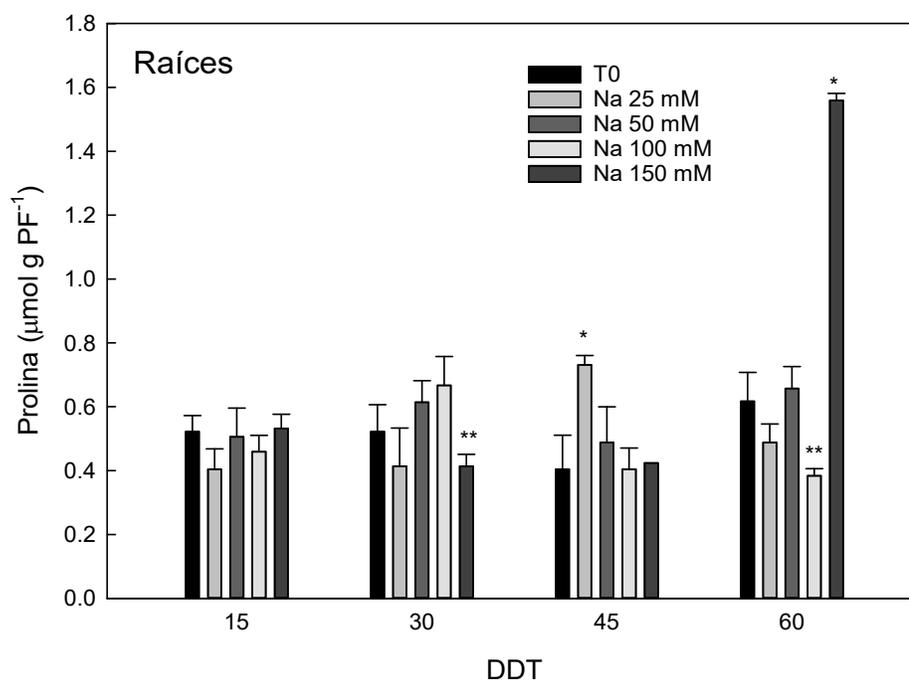


Fig. 18 - Comparación del contenido de prolina en raíces de *A. fourcroydes* tratadas con diferentes concentraciones de NaCl a diferentes días de crecimiento (DDC). Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican las principales diferencias (**valor más alto, *valor más bajo), mediante la prueba de Tukey (n=63, P<0.01).

En la figura 18 se muestran los resultados del contenido de prolina en raíces de *A. fourcroydes* tratadas con las distintas concentraciones de NaCl. Se pudo observar que el contenido de prolina aumentó drásticamente con la concentración más alta de NaCl (150mM) a los 60 días. Por otro lado, el contenido de prolina fue muy similar en los demás días con las distintas concentraciones de NaCl, a excepción del contenido de prolina en el día 30 con la concentración de 150 mM y el día 60 con la concentración de 100 mM de NaCl, donde dicho contenido fue más bajo que en los demás tratamientos.

Durante el estudio, se encontró que las concentraciones menores a 150 mM de NaCl en el día 60, resultaron en mayores niveles de prolina en todas las etapas del tratamiento. En el día 30, las plantas con una concentración de 100 mM de NaCl mostraron el contenido más alto de prolina en comparación con otras concentraciones evaluadas

Un estudio reciente por Derouiche et al., (2023) en tres especies de Aloe (*A. vera*, *A. brevifolia* y *A. arborescens*) reportan un aumento de prolina bajo estrés salino. El contenido más alto de prolina se registró en *Aloe brevifolia*, lo que demuestra su adaptación. La prolina reduce el posible efecto osmótico, lo que permite a las plantas soportar la falta de agua (Nana, R., et., 2009). Resultados similares han sido reportados en arroz (Joseph et al., 2015). También se observó que la prolina aumenta en hojas de *Hibiscus tuberosus* con riego de agua de mar (Xiao-Hua et al., 2009), lo que probablemente reduce el potencial hídrico foliar bajo estrés salino (Chu et al., 1974). También, se encontró que la prolina se acumula en plántulas de alcachofa de Jerusalén bajo estrés salino como una protección contra el daño foliar (Huang et al., 2013), también se relaciona a este aminoácido con el estrés por sequía (Delatorre-Herrera et al., 2010). Los estudios indican que la prolina, siendo un aminoácido estable (Balibrea et al., 1999), se acumula en plantas de *Aloe* bajo estrés hídrico, aunque menos notablemente que en otras especies como la soja, donde puede aumentar hasta un 400% (Lobato et al., 2008). Estos estudios destacan el papel crucial de la prolina como un mecanismo adaptativo en las plantas frente a diversas formas de estrés ambiental, incluyendo la salinidad y la sequía.

En el caso de *Agaves sp.*, Peña-Valdivia et al., (2009) reportan que las raíces de *A. salmiana* acumulaban prolina de 1,6 a 2,1 mmol mg⁻¹ de peso seco bajo condiciones de estrés hídrico (-2,5 MPa). Además, Langlé-Argüello et al., (2019) investigaron los efectos del déficit hídrico en las características fisiológicas, morfológicas y la generación de prolina en las raíces y examinaron el impacto del riego restringido (-3,5 MPa) en ocho especies de *Agave*. En plantas de la especie *A. americana* sometida a estrés hídrico (30% PEG y riego restringido) los contenidos de prolina claramente incrementan a medida que el estrés aumenta (Alfaro-Corres et al., 2023); el comportamiento de nuestro modelo es similar frente a un estrés diferente, sin embargo, como se mostró en la Fig. 19 el contenido de prolina aumentó en raíces ante una alta concentración de NaCl como lo fue 150mM en el día 60.

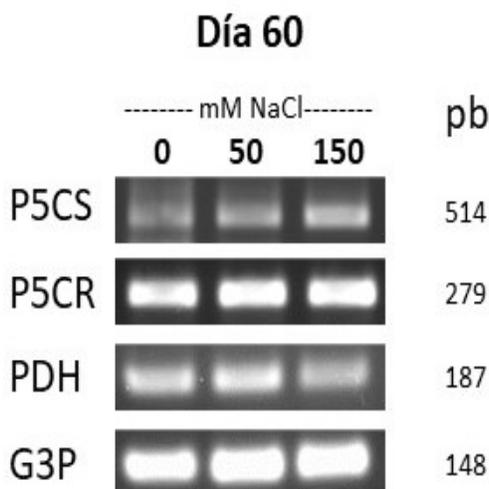


Fig. 19 - Efecto del NaCl sobre los niveles de expresión de los genes de P5CS, P5CR y PDH en hojas de *A. fourcroydes*.

En la figura 19 se ilustran los resultados obtenidos al evaluar el efecto del NaCl sobre los niveles de expresión de P5CS, P5CR y PDH en plantas de *A. fourcroydes* las cuales fueron sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0, 50, 150 mM) durante 60 días; y el gen G3P fue utilizado como control de carga. Para determinar los niveles de los transcritos implicados en el metabolismo de prolina, se realizó previamente una extracción de ARN total, así como la síntesis de ADNc para cada tratamiento.

Para el gen P5CS, se observó un ligero incremento en los niveles de transcritos a medida que aumentaba la concentración de NaCl en donde 150 mM de NaCl, se pudo observar el mayor nivel de expresión de P5CS.

Para el caso de P5CR (comparándolo con P5CS), hubo un aumento en la expresión de este transcrito, siendo la de 50 mM de NaCl la de mayor expresión.

Por otro lado, con PDH, se pudo observar que el nivel de expresión disminuyó a 150 mM, así como también a 0mM, por lo que 50mM fue la concentración que obtuvo el nivel de expresión más alto.

3.2 DISCUSIÓN

Bergsten y colaboradores (2016), observaron variabilidad natural en la tolerancia a la salinidad entre especies de agaves; siendo *A. utahensis* sensible, *A. parryi* y *A. weberi* especies tolerantes. Esta variabilidad puede explicarse por diferencias genéticas y fisiológicas entre las especies, que les permiten contrarrestar el estrés por salinidad. La sensibilidad de *A. utahensis* a la salinidad plantea desafíos para su conservación en regiones donde la salinización de los suelos es un problema creciente. Es fundamental considerar esta limitación al seleccionar especies para proyectos de restauración en áreas degradadas. Aunque el estudio no profundiza en los mecanismos fisiológicos que subyacen a la tolerancia a la salinidad en las especies de agaves, se pueden plantear algunas hipótesis. Es probable que las especies tolerantes hayan desarrollado mecanismos para limitar la absorción de iones de sodio, para compartimentalizar los iones en vacuolas, o para producir compuestos osmoprotectores que les permitan mantener el equilibrio hídrico. Tal como fue en el caso de esta investigación, en donde se pudo observar que las plantas de *Agave fourcroydes* demostraron cierta tolerancia a pesar de las altas concentraciones de NaCl, mostrando algunos efectos del estrés salino sobre las características morfológicas, tanto como en el número de hojas, altura de la planta y peso fresco de raíces. Sin embargo, dada la naturaleza robusta de la especie y el tiempo de evaluación, no se puede descartar la posibilidad de que efectos más sutiles a nivel fisiológico y molecular se manifiesten con el tiempo.

Por otra parte, Hernández en 2019, evaluó el efecto del riego con soluciones de NaCl, Na₂SO₄ y NaHCO₃ con 5, 10, 15 y 20 dS·m⁻¹ en el crecimiento, y concentración de azúcares y prolina de plantas de *A. salmiana* de 12 semanas de edad. El número de hojas y el crecimiento de las hojas nuevas no se afectaron con ningún nivel de salinidad de NaCl. En cuanto a la acumulación de biomasa, los tratamientos con NaCl y Na₂SO₄ no afectaron a *A. salmiana*. Las concentraciones de azúcares totales disminuyeron significativamente con los tratamientos con NaCl y NaHCO₃. Por otro lado, las diferencias en la concentración de prolina en hojas con el NaCl y NaHCO₃ no fueron significativas, sin embargo, la concentración de prolina en la raíz incrementó significativamente con NaCl, respecto a las plantas testigo. Como conclusión obtuvieron que no existe relación entre el contenido de azúcares totales y de prolina con la tolerancia al estrés salino de *A. salmiana* provocado por Na₂SO₄ y NaHCO₃. Además, el aumento del contenido de prolina en las raíces de *A.*

salmiana muestra una relación positiva con la tolerancia a la salinidad con $16.78 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ de NaCl.

Por otro lado, Alfaro y colaboradores en 2023 obtuvieron como resultado que la acumulación de prolina en las plantas sometidas a riego restringido refuerza la idea de que la prolina actúa como un osmorregulador crucial en la respuesta al estrés hídrico. Los hallazgos del estudio son coherentes con investigaciones anteriores que sugieren que la prolina es un marcador confiable de estrés hídrico en plantas. Sin embargo, el aumento de la concentración de prolina en condiciones *in vitro*, comparado con las condiciones de suelo, puede indicar diferencias en los mecanismos de adaptación al estrés entre estos dos entornos. Esto sugiere que las condiciones *in vitro* pueden inducir una respuesta de estrés más pronunciada. También el estudio evaluó la respuesta de *Agave americana* L. al déficit hídrico, comparando el efecto del riego restringido en condiciones de suelo con el uso de polietilenglicol (PEG) *in vitro*. Los resultados mostraron una disminución en la biomasa bajo condiciones de déficit hídrico en ambos contextos. Comparaciones con estudios previos en diferentes especies de *Agave* revelaron variaciones en la respuesta a la sequía, con algunas especies mostrando un incremento en la biomasa de la raíz mientras que otras no. La observación de que especies como *A. angustifolia*, *A. tequilana*, *A. asperrima*, *A. lechuguilla*, y *A. striata* aumentan la biomasa de la raíz bajo estrés hídrico. La capacidad de aumentar la biomasa de la raíz puede ser una adaptación específica que permite una mayor absorción de agua en ciertas especies, lo cual puede ser crucial para su supervivencia en condiciones áridas.

Moghbeli y colaboradores en 2012 mostraron un efecto contrastante hacia los resultados obtenidos en esta investigación respecto a el estrés salino, ya que, en su investigación, obtuvieron un impacto negativo en casi todas las características evaluadas. En dicha investigación analizaron en la especie *Aloe* los efectos de la salinidad sobre el número de hojas, la altura de la planta y el peso de la raíz, donde identificaron que la salinidad restringe la capacidad de las plantas para crecer y desarrollarse de manera óptima. El efecto del estrés salino se vuelve más pronunciado con el tiempo, y las plantas sometidas a altos niveles de salinidad experimentan una reducción más pronunciada. Esta tendencia es relevante para entender cómo el estrés salino afecta a las plantas a lo largo de su desarrollo. Los resultados de este estudio concuerdan con Shabala y Mackay (2011) que han demostrado que la salinidad afecta negativamente el crecimiento de las plantas.

Los resultados obtenidos en este trabajo, son consistentes con investigaciones previas que documentan la reducción en la altura de las hojas y el número de brotes con el incremento de salinidad en plantas como *Aloe* y *Agave*. Esta reducción puede atribuirse a la toxicidad de iones específicos (Na^+ y Cl^-) y a la dificultad de las plantas para mantener el equilibrio hídrico y osmótico bajo condiciones salinas (Munns y Tester, 2008). La disminución en el crecimiento y el rendimiento con mayores niveles de salinidad subraya la sensibilidad de estas plantas a las condiciones de estrés salino. Por lo cual, la disminución en la altura de la planta, el peso de la planta, el peso de la hoja con el aumento de la salinidad y el tiempo de muestreo refleja la influencia negativa del estrés salino prolongado. La disminución progresiva en estos parámetros con el tiempo indica que las plantas no solo sufren de efectos inmediatos negativos debido a la salinidad, sino que también experimentan una acumulación de estrés que afecta su crecimiento y producción a largo plazo. Esto se puede comparar con nuestros resultados, ya que el *Agave fourcroydes* es una especie que es conocida por su lento crecimiento y su longevidad en donde los primeros años, la planta se dedica a desarrollar un sistema radicular fuerte y a producir hojas basales (Trujillo *et al.*, 2023). Se destaca que en base a esto y al compararlo con estudios previos, es necesario que el análisis sobre el impacto de la salinidad en el henequén se extienda durante un periodo más largo, acorde con las etapas de su desarrollo y edad, para poder determinar con mayor precisión el impacto que tiene la salinidad a largo plazo en el desarrollo de esta especie.

Mustafa (1995) encontró que niveles bajos de salinidad (0,1%) pueden promover el crecimiento en *Aloe vera*, mientras que niveles más altos (0,4%) tienen efectos negativos. En este punto destacamos que esta especie tarda entre 18 y 24 meses en madurar por completo en comparación con el henequén que tarda entre 4 y 6 años (Trujillo *et al.*, 2023). Esto sugiere que la tolerancia a la salinidad puede variar entre especies y que el impacto de la salinidad puede ser más severo de lo que se observa en estudios con diferentes metodologías o condiciones experimentales.

Casierra-Posada y colaboradores en 2017, nos muestra que en *Furcraea hexapetal* la acumulación de materia seca en los tallos aumentó, mientras que en las hojas disminuyó con el incremento en la concentración de NaCl. Esto puede reflejar un mecanismo de adaptación donde la planta redirige recursos hacia estructuras menos afectadas por el estrés salino. Así mismo, se demostró que esta especie puede tolerar niveles de salinidad

hasta 60 mM de NaCl sin efectos severos en el crecimiento o la composición de las hojas. Esto es relevante para la selección de cultivos en suelos salinos, ya que esta especie podría ser viable en regiones con niveles moderados de salinidad. Sin embargo, a concentraciones más altas (90 mmol de NaCl), la planta muestra signos evidentes de estrés, lo que limita su viabilidad en condiciones más salinas. La tolerancia de *Furcraea hexapetala* a niveles moderados de salinidad concuerda con estudios que reportan la capacidad de algunas especies de *Agave* y *Aloe* para manejar salinidad en suelos (Miyamoto, 2008; Schuch y Kelly, 2008). Sin embargo, la respuesta ante concentraciones más altas de NaCl refuerza la idea de que, aunque algunas especies sean tolerantes, estas aún tienen límites en su capacidad para soportar niveles elevados o prolongados de salinidad.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

3.3 CONCLUSIONES GENERALES

1. La altura de hojas, número de hojas, peso fresco de hojas y raíces fue disminuyendo a medida que las concentraciones de NaCl aumentaban.
2. La relación K^+/Na^+ en hojas es diferente que, en raíces, indicando que las raíces acumulan más Na^+ que K^+ , mientras que en hojas la relación sucede de manera inversa, protegiendo a las hojas de la toxicidad por estrés salino.
3. El contenido de prolina en hojas depende de la concentración de NaCl aplicada siendo la concentración de 150 mM la que produce un incremento de este aminoácido durante el tiempo de estrés al que se somete, en este caso hasta 60 días.
4. El contenido de prolina en raíces no depende de las concentraciones de Na^+ aplicada, solo hay un incremento significativo a los 60 días de cultivo y a 150 mM de NaCl, lo que pudiera indicar que solo hay una respuesta significativa a tenores altos de salinidad.
5. El efecto de 150mM de NaCl sobre los niveles de expresión de P5CS y P5CR fue similar al nivel de expresión del gen G3P, Sin embargo, el nivel de expresión de PDH disminuyó.
6. Los resultados obtenidos para corroborar la tolerancia a la salinidad de la especie *Agave fourcroydes* no son concluyentes.

3.4 PERSPECTIVAS

1. Corroborar la relación entre la expresión de los genes y el nivel de Prolina en *A. fourcroydes* bajo estrés por salinidad.
2. Realizar los mismos estudios bajo condiciones *in vitro* para conocer el posible comportamiento de *A. fourcroydes*.
3. Para una comprensión más completa de la dinámica del contenido de K^+ y Na^+ en raíces de *A. fourcroydes*, se podrían realizar investigaciones adicionales que consideren variables y factores relevantes como las características del suelo, las prácticas de riego o las condiciones climáticas.
4. Sería imprescindible analizar e investigar que otros mecanismos de tolerancia tiene henequén ante la salinidad y como el metabolismo de la planta puede influir en dichos mecanismos.
5. Aunque se pudo identificar que la prolina desempeñó un papel en la respuesta del *A. fourcroydes* al estrés salino, sería interesante realizar la evaluación de los efectos de NaCl a largo plazo.

BIBLIOGRAFÍA

Abbasi, H., Jamil, M., Haq, A., Ali, S., Ahmad, R., and Malik, Z. (2016). Salt stress manifestation on plants, mechanism of salt tolerance and potassium role in alleviating it: a review. *Zemdirbyste-Agricul.* 103, 229–238.

AbdElgawad, H., De Vos, D., Zinta, G., Domagalska, M. A., Beemster, G. T. S., Asard, H. (2015). Grassland species differentially regulate proline concentrations under future climate conditions: an integrated biochemical and modelling approach. *New Phytol.* 208, 354–369.

Achary, V. M. M., Parinandi, N. L., & Panda, B. B. (2012). Aluminum induces oxidative burst, cell wall NADH peroxidase activity, and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Environmental and molecular mutagenesis*, 53(7), 550-560.

Achten, W. M., Maes, W. H., Reubens, B., Mathijs, E., Singh, V. P., Verchot, L., & Muys, B. (2010). Biomass production and allocation in *Jatropha curcas* L. seedlings under different levels of drought stress. *biomass and bioenergy*, 34(5), 667-676..

Alam, R., Das, D. K., Islam, M. R., Murata, Y., & Hoque, M. A. (2016). Exogenous proline enhances nutrient uptake and confers tolerance to salt stress in maize (*Zea mays* L.). *Progressive agriculture*, 27(4), 409-417.

Al-Mayahi, A. M. W. (2014). Effect of copper sulphate and cobalt chloride on growth of the in vitro culture tissues for date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Ashgar. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 9(1), 6.

Alvino, A., D'Andria, R., Delfino, S., Lavini, A., & Zanetti, P. (2000). Effect of water and salinity stress on radiation absorption and efficiency in sunflower. *Italian Journal of Agronomy*, 4(2), 53-60.

Amini, F., Ehsanpour, A. A., Hoang, Q. T., & Shin, J. S. (2007). Protein pattern changes in tomato under in vitro salt stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54, 464-471.

Andrade, J. L., & Nobel, P. S. (1997). Microhabitats and Water Relations of Epiphytic Cacti and Ferns in a Lowland Neotropical Forest 1. *Biotropica*, 29(3), 261-270.

Ariza, F. J. A. (2012). *Salinidad y vegetación*. Recuperado de <https://www.um.es/docencia/geobotanica/ficheros/tema18.pdf>

Armengaud, P., Thiery, L., Buhot, N., Grenier-de March, G., & Savouré, A. (2004). Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. *Physiologia plantarum*, 120(3), 442-450.

Ashraf, M. F. M. R., & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and experimental botany*, 59(2), 206-216.

Ashraf, M. H. P. J. C., & Harris, P. J. (2013). Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica*, 51(2), 163-190.

Balibrea ME, Parra M, Bolarin MC, Perez-Alfocea F (1999) PEG-osmotic treatment in tomato seedlings induces salt-adaptation in adult plants. *Australian Journal Plant Physiology* 26: 781–786.

Benidire, L., Daoui, K., Fatemi, Z. A., Achouak, W., Bouarab, L., & Oufdou, K. (2015). Effet du stress salin sur la germination et le développement des plantules de *Vicia faba* L. (Effect of salt stress on germination and seedling of *Vicia faba* L.). *Journal of Materials and Environmental Science*, 6(3), 840-851.

Bergsten, S. J. (2013). Certain Agave Species Exhibit the Capability to be Moderately Productive Under Conditions of High Salt and Drought Stress. Brigham Young University.

Bergsten, S. J., Koeser, A. K., & Stewart, J. R. (2016). Evaluation of the impacts of salinity on biomass and nutrient levels of Agave species with agricultural potential in semiarid regions. *HortScience*, 51(1), 30-35.

Blumwald E, Aharon GS, Apse MP (2000) Sodium transport in plant cells. *Biochimica Biophysica Acta* 1465: 140–151.

Boyer, J. S. (1982). Plant productivity and environment. *Science*, 218(4571), 443-448.

Brady CJ, Gibson TS, Barlow EWR, Speirs J, Wyn Jones RG (1984) Salt tolerance in plants. I. Ions compatible organic solutes and the stability of plant ribosomes. *Plant Cell Environment* 7: 571–578.

Burritt, D. J. (2012). Proline and the cryopreservation of plant tissues: functions and practical applications. *Current frontiers in cryopreservation*, 10, 36249.

Butt, M., Ayyub, C. M., Amjad, M., & Ahmad, R. (2016). PROLINE APPLICATION ENHANCES GROWTH OF CHILLI BY IMPROVING PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ATTRIBUTES UNDER SALT STRESS. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 53(1).

Casierra-Posada, F., Carreño-Patiño, A. & Cutler, J. Growth, Fiber and Nitrogen Content in Sisal Plants (*Furcraea* sp) Under NaCl Salinity. *Gesunde Pflanzen* 69, 83–90 (2017).

Castellanos, J. (2016). La salinidad de los suelos, un problema que amenaza su fertilidad. *México: Instituto para la Innovación Tecnológica en Agricultura, Intagri*.

Chaves, M. M., Flexas, J., & Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of botany*, 103(4), 551-560.

Cheeseman J.M. (1982) Pump-leak sodium fluxes in low salt corn roots. *Journal of Membrane Biology* 70, 157–164.

Chetouani, M., Mzabri, I., Amar, A., Boukroute, A., Kouddane, N., & Berrichi, A. (2019). Morphological-physiological and biochemical responses of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) to salt stress. *Materials Today: Proceedings*, 13, 752-761.

Chinnusamy, V., Jagendorf, A., & Zhu, J. K. (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop science*, 45(2), 437-448.

Chu TM, Aspinall D, Paleg LG (1974) Stress metabolism VI. Temperature stress and the accumulation of proline in barley and radish. *Australian Journal Plant Physiology* 1: 87–97.

Colunga-GarcíaMarín, P., & Zizumbo-Villarreal, D. (2007). Tequila and other Agave spirits from west-central Mexico: current germplasm diversity, conservation and origin. *Plant conservation and biodiversity*, 79-93.

Cushman, J. C., Davis, S. C., Yang, X., & Borland, A. M. (2015). Development and use of bioenergy feedstocks for semi-arid and arid lands. *Journal of Experimental Botany*, 66(14), 4177-4193.

Da Rocha, I. M. A., Vitorello, V. A., Silva, J. S., Ferreira-Silva, S. L., Viégas, R. A., Silva, E. N., & Silveira, J. A. G. (2012). Exogenous ornithine is an effective precursor and the δ -ornithine amino transferase pathway contributes to proline accumulation under high N recycling in salt-stressed cashew leaves. *Journal of Plant Physiology*, 169(1), 41-49.

Dar, M. I., Naikoo, M. I., Rehman, F., Naushin, F., & Khan, F. A. (2016). Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development. *Osmolytes and plants acclimation to changing environment: emerging omics technologies*, 155-166.

Davenport R.J., Reid R. & Smith F. (1997) Sodium-calcium interactions in two wheat species differing in salinity tolerance. *Physiologia Plantarum* 99, 323–327

De Freitas, P. A. F., de Carvalho, H. H., Costa, J. H., Miranda, R., de, S., da, C. K. D., et al. (2019). Salt acclimation in sorghum plants by exogenous proline: physiological and biochemical changes and regulation of proline metabolism. *Plant Cell Rep.* 38, 403–416.

De Lacerda CF, Cambraia J, Oliva MA, Ruiz HA (2005) Changes in growth and in solute concentrations in sorghum leaves and roots during salt stress recovery. *Environmental Experimental Botany* 54: 69–76.

Delatorre-Herrera J, Delfino I, Salinas C, Silva H, Cardemil L (2010) Irrigation restriction effects on water use efficiency and osmotic adjustment in Aloe vera plants (*Aloe barbadensis* Miller). *Agricultural Water Management* 97: 1564–1570.

Delatorre-Herrera J, Delfino I., Salinas C., Silva H. y Cardemil L. 2010. Irrigation restriction effects on water use efficiency and osmotic adjustment in Aloe Vera plants (*Aloe barbadensis* Miller). *Agricultural Water Management* 97:1564-1570.

Delauney, A. J., & Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The plant journal*, 4(2), 215-223.

Derouiche, M., Mzabri, I., Ouahhoud, S., Dehmani, I., Benabess, R., Addi, M., ... & Kouddane, N. (2023). The effect of salt stress on the growth and development of three Aloe species in eastern Morocco. *Plant stress*, 9, 100187.

Deuschle, K., Funck, D., Hellmann, H., Däschner, K., Binder, S., Frommer, W. B. (2001). A nuclear gene encoding mitochondrial Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. *Plant J.* 27, 345–356.

Egamberdieva, D., and Kucharova, Z. (2009). Selection for root colonising bacteria stimulating wheat growth in saline soils. *Biol. Fertil. Soils* 45, 563–571.

El Sayed, H. E. S. A. (2011). Influence of salinity stress on growth parameters, photosynthetic activity and cytological studies of *Zea mays*, L. plant using hydrogel polymer. *Agric. Biol. J. Am.* 2, 907–920.

El-Ramady, H., Prokisch, J., Mansour, H., Bayoumi, Y. A., Shalaby, T. A., Veres, S., & Brevik, E. C. (2024). Review of crop response to soil salinity stress: Possible approaches from leaching to nano-management. *Soil Systems*, 8(1), 11.

Enrique, A. A., Alberto, L. C., Antonio, G. F., Manuel, M., María, S. et al. (2023). Effect of Water Stress Induced by Polyethylene Glycol on Growth, Proline Accumulation in *Agave americana* L.. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 92(2), 629–643.

Escalante Magaña, C. A. (2020). *Efecto 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 de doctorado]. Centro de Investigación Científica de Yucatán.

FAO. (2008). FAO Land and Plant Nutrition Management Service. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>

Flagella Z, Cantore V, Giuliani MM, Tarantio E, De Caro A (2002) Crop salt tolerance physiological, yield and quality aspects. *Rec Res Dev Plant Biol* 2:155–186

Flowers TJ, Troke PF, Yeo AR. (1977). The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28:89–121

Fuentes V, Rodriguez N, Rodriguez C, Ramos R (1988). Salinity tolerance including *Aloe arborescens* and other species. *Agrotecnia Cuba*, 20: 1–6.

Funck, D., Baumgarten, L., Stift, M., Von Wirén, N., & Schönemann, L. (2020). Differential contribution of P5CS isoforms to stress tolerance in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 11, 565134.

Furumoto T, Yamaguchi T, Ohshima-Ichie Y, et al. (2011). A plastidial sodium-dependent pyruvate transporter. *Nature* 476, 472–475.

Gagneul, D., Aïnouche, A., Duhazé, C., Lugan, R., Larher, F. R., & Bouchereau, A. (2007). A reassessment of the function of the so-called compatible solutes in the halophytic Plumbaginaceae *Limonium latifolium*. *Plant Physiology*, 144(3), 1598-1611.

García-Mendoza, A. (2002). Distribution of agave (Agavaceae) in México.

García-Mendoza, A. J. (2011). Tres especies nuevas de Manfreda (Agavaceae) del sur de México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 82(3), 747-757.

García-Mendoza, A. J., Franco Martínez, I. S., & Sandoval Gutiérrez, D. (2019). Cuatro especies nuevas de Agave (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta botánica mexicana*, (126).

Genc, Y., Taylor, J., Lyons, G. H., Li, Y., Cheong, J., Appelbee, M., et al. (2019). Bread wheat with high salinity and sodicity tolerance. *Front. Plant Sci.* 10:1280.

Ghoulam, C., Foursy, A., & Fares, K. (2002). Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environmental and experimental Botany*, 47(1), 39-50.

González-Romero, Sara Lucía, Franco-Mora, Omar, Ramírez-Ayala, Carlos, Ortega-Escobar, Héctor Manuel, Quero-Carrillo, Adrián Raymundo, & Trejo-López, Carlos. (2011). Germinación y crecimiento de alfalfa bajo condiciones salinas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 2(1), 169-174.

Good-Avila, S. V., Souza, V., Gaut, B. S., & Eguiarte, L. E. (2006). Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), 9124-9129.

Gouveitcha, M. B. G., Mensah, A. C. G., Montcho Hambada, D., Assogba Komlan, F., & Gandonou, C. B. (2021). Réponse au stress salin de quelques cultivars de gombo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) produits au Bénin au stade jeune plant. *Journal of Applied Biosciences*, 161, 16616-16631.

Grattan, S. R., & Grieve, C. M. (1992). Mineral element acquisition and growth response of plants grown in saline environments. *Agriculture, ecosystems & environment*, 38(4), 275-300.

Greenway, H., & Munns, R. (1980). Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual review of plant physiology*, 31(1), 149-190.

Hara, Y. (1992). Physical and chemical soil properties affecting the growth habits of *Agave* species (Master's thesis, The University of Arizona).

Hasanuzzaman, M., & Fujita, M. (2022). Plant responses and tolerance to salt stress: Physiological and molecular interventions. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4810.

Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K., & Bohnert, H. J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual review of plant biology*, 51(1), 463-499.

Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments: a review. *Plant signaling & behavior*, 7(11), 1456-1466.

Hernández González, D. I. (2019). *Efecto de la salinidad en el desarrollo temprano de Agave salmiana Otto Ex Salm-Dyck* (Master's thesis).

Heuer, B. (2010). Role of proline in plant response to drought and salinity. *Handbook of plant and crop stress*, 3, 213-238.

Hossain, A., Azeem, F., Shahriar, S. M., & Islam, M. T. (2021). Regulation of proline transporters in salt stress response in plants. In *Transporters and Plant Osmotic Stress* (pp. 291-306). Academic Press.

Hossain, A., Garai, S., Mondal, M., & Latef, A. A. H. A. (2021). The Key Roles of Proline against Heat, Drought and Salinity-Induced Oxidative Stress in Wheat (*Triticum aestivum* L.). In *Organic Solutes, Oxidative Stress, and Antioxidant Enzymes Under Abiotic Stressors* (pp. 171-190). CRC Press.

Hossain, M. A., Kumar, V., Burritt, D. J., Fujita, M., & Mäkelä, P. (2019). Osmoprotectant-mediated abiotic stress tolerance in plants. *Proline Metabolism and Its Functions in Development and Stress Tolerance; Springer Nature: Cham, Switzerland*, 41-72.

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.

Isla, R., and Aragüés, R. (2010). Yield and plant ion concentrations in maize (*Zea mays* L.) subject to diurnal and nocturnal saline sprinkler irrigations. *Field Crops Res.* 116, 175–183.
Jacoby B (1999) Mechanisms involved in salt tolerance of plants. In: Pessaraki M. (Ed.), *Handbook of Plant and Crop Stress*. Marcel Dekker Inc., New York, pp: 97–123.

Jaramillo Jaramillo, D. F. (2002). *Introducción a la ciencia del suelo*. Escuela de Geociencias y Medio Ambiente.

Joseph, E. A., Radhakrishnan, V. V., & Mohanan, K. V. (2015). A study on the accumulation of proline-an osmoprotectant amino acid under salt stress in some native rice cultivars of North Kerala, India. *Universal Journal of Agricultural Research*, 3(1), 15-22.

Kalhor, N. A., Rajpar, I., Kalhor, S. A., Ali, A., Raza, S., Ahmed, M., et al. (2016). Effect of salts stress on the growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Am. J. Plant Sci.* 7:2257.

Kaur, D., Grewal, S. K., Kaur, J., & Singh, S. (2017). Differential proline metabolism in vegetative and reproductive tissues determine drought tolerance in chickpea. *Biologia plantarum*, 61, 359-366.

Keisham, M., Mukherjee, S., & Bhatla, S. C. (2018). Mechanisms of sodium transport in plants—progresses and challenges. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 647.

Khan MA, Duke NC (2001) Halophytes- a resource for the future. *Wetl Ecol Manag* 6:455–456

Khan, M. A., & Aziz, I. (2001). Salinity tolerance in some mangrove species from Pakistan. *Wetlands Ecology and Management*, 9, 229-233.

Khanna-Chopra, R., Semwal, V. K., Lakra, N., & Pareek, A. (2019). Proline—A key regulator conferring plant tolerance to salinity and drought. In *Plant tolerance to environmental stress* (pp. 59-80). CRC Press.

Kinsou, E., Montcho, D., Zanklan, S. A., Kpinkoun, J. K., Komlan, F. A., Mensah, A. C. G., & Gandonou, C. B. (2019). Salt resistance of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars produced in Benin at germination stage. *International Journal of Plant & Soil Science*, 28(2), 1-12.

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.

Kock GC (1980). Drought resistant fodder shrub crops (*Agave americana*) in South Africa. *Herbage Abst.* G-55, 1068.

Kotuby-Amacher, J., Koenig, R., & Kitchen, B. (2000). Salinity and plant tolerance. Electronic Publication AG-SO-03, Utah State University Extension, Logan.

Kpinkoun, J. K., Zanklan, S. A., Komlan, F. A., Mensah, A. C., Montcho, D., Kinsou, E., & Gandonou, C. B. (2019). Évaluation de la résistance à la salinité au stade jeune plant de quelques cultivars de piment (*Capsicum* spp.) du Benin. *Journal of Applied Biosciences*, 133, 13561-13573.

Lamz Piedra, Alexis, & González Cepero, María C. (2013). La salinidad como problema en la agricultura: la mejora vegetal una solución inmediata. *Cultivos Tropicales*, 34(4), 31-42.

Langlé-Argüello, L. A., Martínez-Gutiérrez, G. A., Santiago-García, P. A., Escamirosa-Tinoco, C., Morales, I., & Enríquez-del-Valle, J. R. (2019). Nutrient solutions and drought in plant growth and fructans content of *Agave potatorum* Zucc. *HortScience*, 54(9), 1581-1584.

Lastiri Hernández, M. A., Álvarez Bernal, D., Soria Martínez, L. H., Ochoa Estrada, S., & Cruz-Cárdenas, G. (2017). figlinidad en la germinación y emergencia de siete especies forrajeras. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(6), 1245-1257.

Lauchli A. (1984). Salt exclusion: an adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions. In *Salinity Tolerance in Plants: Strategies for Crop Improvement*, ed. RC Staples, pp. 171–87. New York: Wiley

Läuchli, A., & Grattan, S. R. (2007). Plant growth and development under salinity stress. In *Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops* (pp. 1-32). Springer, Dordrecht.

Liu, J., & Wang, Y. S. (2020). Proline metabolism and molecular cloning of Amp5CS in the mangrove *Avicennia marina* under heat stress. *Ecotoxicology*, 29, 698-706.

Lobato AKD, Neto CFD, dos Santos BG, da Costa RCL, Cruz FJR, Neves HKB, Lopes MJD (2008) Physiological and biochemical behavior in soybean (*Glycine max* cv. Sambaiba) plants under water deficit. *Australian Journal Crop Science* 2: 25–32.

Maas EV, Hoffman GJ (1977) Crop salt tolerance – current assessment. *Journal of the Irrigation and Drainage Division, Proceedings of the American Society of Civil Engineers* 103, 115–130.

Mansour, M. M. F., Ali, E. F. (2017). Evaluation of proline functions in saline conditions. *Phytochemistry* 140, 52–68.

McCauley, A. D., & Jones, J. B. (2005). "Sodic soils: A review of their properties and management." *Journal of Soil Science*, 39(2), 257-272.

Meena, M., Divyanshu, K., Kumar, S., Swapnil, P., Zehra, A., Shukla, V., ... & Upadhyay, R. S. (2019). Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon*, 5(12).

Meloni, D. A., Oliva, M. A., Ruiz, H. A., & Martinez, C. A. (2001). Contribution of proline and inorganic solutes to osmotic adjustment in cotton under salt stress. *Journal of Plant Nutrition*, 24(3), 599-612.

Miyamoto, S. (2008). Salt tolerance of landscape plants common to the southwest. Texas Water Resources Institute.

Moghbeli, E., Fathollahi, S., Salari, H., Ahmadi, G., Saliqehdar, F., Safari, A., & Grouh, M. S. H. (2012). Effects of salinity stress on growth and yield of Aloe vera L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(16), 3272-3277.

Møller I.S. & Tester M. (2007) Salinity tolerance of Arabidopsis: a good model for cereals? *Trends in Plant Science* 12, 534–540.

Mondal, R., Kumar, A., & Chattopadhyay, S. K. (2021). Structural property, molecular regulation, and functional diversity of glutamine synthetase in higher plants: a data-mining bioinformatics approach. *The Plant Journal*, 108(6), 1565-1584.

Moore C.A., Bowen H.C., Scrase-Field S., Knight M.R. & White P.J. (2002) The deposition of suberin lamellae determines the magnitude of cytosolic Ca²⁺ elevations in root endodermal cells subjected to cooling. *The Plant Journal* 30, 457–465.

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 Phytologist* 167, 645–663.

Munns R, Hussain S, Rivelle A, James R (2002) Avenues for increasing salt tolerance of crops and the role of physiologically based selection traits. *Plant and Soil* 253, 201–218.

Munns R, James RA, Lauchli A (2006) Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany* 57, 1025–1043.

Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59, 651–681.

Munns, R. (2011). Plant adaptations to salt and water stress: differences and commonalities. *Advances in botanical research*, 57, 1-32.

Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59(1), 651-681.

Munns, R., Schachtman, D. P., & Condon, A. G. (1995). The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. *Functional Plant Biology*, 22(4), 561-569.

Murillo-Amador, B., Córdoba-Matson, M. V., Villegas-Espinoza, J. A., Hernández-Montiel, L. G., Troyo-Dieguez, E., & García-Hernández, J. L. (2014). Mineral content and biochemical variables of *Aloe vera* L. under salt stress. *PLoS One*, 9(4), e94870.

Mustafa, M. (1995). Physiological studies on growth and active constituents of *Aloe vera* L. *Floriculture Zagazig University*.

Mzabri, I., Legsayer, M., Chetouani, M., Amar, A., Kouddane, N., Boukroute, A., ... & Berrichi, A. (2017). Saffron (*Crocus sativus* L.) yield parameter assessment of abiotic stressed corms stored in low temperature. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 8(10), 3588-3597.

Nakashima, K., Satoh, R., Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1998). A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118, 1233–1241.

Nana, R., Tamini, Z., & Sawadogo, M. (2009). Effets d'un stress hydrique intervenu pendant le stade végétatif et la phase de floraison chez le gombo. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 3(5).

Negacz, K., Malek, Ž., de Vos, A., & Vellinga, P. (2022). Saline soils worldwide: Identifying the most promising areas for saline agriculture. *Journal of arid environments*, 203, 104775.

Nguyen, M. L., Kim, G. B., Hyun, S. H., Lee, S. Y., Lee, C. Y., Choi, H. K., et al. (2013)..

Ning JF, Liu ZP, Liu L, Shao J (2005) Study of effect of NaCl stress on *Aloe vera* *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* 5..

Nobel PS. 2011. *Sabiduría del desierto, agaves y cactus: CO₂, agua, cambio climático*. 2a ed. Biblioteca Básica de Agricultura, Texcoco.

Nobel, P. S., & Berry, W. L. (1985). Element responses of agaves. *American journal of Botany*, 72(5), 686-694.

Nounjan, N., Nghia, P. T., Theerakulpisut, P. (2012). Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes. *J. Plant Physiol.* 169, 596–604.

Omoto, E., Taniguchi, M., and Mayake, H. (2012). Adaptation responses in C4 photosynthesis of maize under salinity. *J. Plant Physiol.* 169, 469–477.

Osman, K. T. (2018). Saline and sodic soils. In *Management of soil problems* (pp. 255-298). Springer, Cham.

Parida AK, Das AB, Mitra B (2004) Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. *Trees* 18: 167–174

Parida, A. K., & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60(3), 324-349.

Pena-Valdivia, C. B., & Sanchez-Urdaneta, A. B. (2009). Effects of substrate water potential in root growth of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck seedlings. *Biological research*, 42(2), 239-248.

Pena-Valdivia, C. B., & Sanchez-Urdaneta, A. B. (2009). Effects of substrate water potential in root growth of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck seedlings. *Biological research*, 42(2), 239-248.

Physiological and metabolomic analysis of a knockout mutant suggests a critical role of MtP5CS3 gene in osmotic stress tolerance of *Medicago truncatula*. *Euphytica* 193, 101–120

Pimienta-Barrios E., Zañudo-Hernández J. y García-Galindo J. 2006. FOTOSÍNTESIS ESTACIONAL EN PLANTAS JÓVENES DE *Agave tequilana*. *Agrociencia* 40:699-709.

Pratelli, R., & Pilot, G. (2014). Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. *Journal of experimental botany*, 65(19), 5535-5556.

Puente-Garza, C. A., Espinosa-Leal, C. A., & García-Lara, S. (2021). Effects of saline elicitors on saponin production in *Agave salmiana* plants grown in vitro. *Plant Physiology and Biochemistry*, 162, 476-482.

Qadir, M., Quillerou, E., Nangia, V., Murtaza, G., Singh, M., Thomas, R. J. Dreschel, P., and Noble, A. D. 2014. Economics of salt-induced land degradation and restoration. *Natural Resources Forum*. 38: 282-295.

Rady, M., Kusvuran, A., Alharby, H. F., Alzahrani, Y., Kusvuran, S. (2019). Pretreatment with proline or an organic bio-stimulant induces salt tolerance in wheat plants by improving antioxidant redox state and enzymatic activities and reducing the oxidative stress. *J. Plant Growth Regul.* 38, 449–462.

Rajendran K., Tester M. & Roy S.J. (2009) Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant, Cell & Environment* 32, 237–249.

Rajendran, K., Tester, M., & Roy, S. J. (2009). Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant, cell & environment*, 32(3), 237-249.

Ramírez-Tobías H.M., Peña-Valdivia C.B., Aguirre R.J.R., Reyes-Agüero J.A., Sánchez-Urdaneta A.B. y Valle G.S. 2012. Seed germination temperatures of eight Mexican *Agave* species with economic importance. *Plant Species Biology* 27:124-137.

Reichert, C. L., Salminen, H., & Weiss, J. (2019). Quillaja saponin characteristics and functional properties. *Annual review of food science and technology*, 10(1), 43-73.

Rengasamy P. 2002. Transient salinity and subsoil constraints to dryland farming in Australian sodic soils: an overview. *Aust. J. Exp. Agric.* 42:351–61

Richards LA (1954) Diagnosis and improvements of saline and alkali soils. USDA Agriculture Handbook 60. USA

Ríos-Ramírez, Suzel del Carmen, Enríquez-del Valle, José Raymundo, Rodríguez-Ortiz, Gerardo, Ruíz-Luna, Judith, & Velasco-Velasco, Vicente Arturo. (2021). El crecimiento de

Agave angustifolia Haw. con relación a la condición nutrimental. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 12(5), 865-873.

Rodríguez, J. L. G., López, H. S., Rodríguez, J. Á. S., & González, J. C. M. (2023). PRODUCCIÓN DE PLANTA Y ESTABLECIMIENTO DE PLANTACIONES COMERCIALES DE *Agave durangensis* Gentry.

Romero-Aranda, R., Soria, T., & Cuartero, J. (2001). Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant science*, 160(2), 265-272.

Sadeghipour, O. (2020). Cadmium toxicity alleviates by seed priming with proline or glycine betaine in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Egyptian Journal of Agronomy*, 42(2), 163-170.

Sánchez L.A. 1989. *Oaxaca, Tierra de Maguey y Mezcal*. Instituto Tecnológico de Oaxaca, Oaxaca.

Sathyaseelan, Neenu & K S, Karthika. (2019). Aluminium toxicity in soil and plants. 2. 15-19.

Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. J., Demar, M., Vingron, M., et al. (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat. Genet.* 37 (5), 501–506.

Schuch, U. K., & Kelly, J. J. (2008). Salinity tolerance of cacti and succulents.

Schuch, U.K., Kelly, J.J., 2008. Salinity tolerance of cacti and succulents. College of Agriculture and Life Sciences, University of Arizona Tucson.

Schulte, P. J. (2009). Water transport processes in desert succulent plants. *Perspectives in Biophysical Plant Ecophysiology: A Tribute to Park S. Nobel*, 39-55.

Shabala, S., & Mackay, A. (2011). Ion transport in halophytes. In *Advances in botanical research* (Vol. 57, pp. 151-199). Academic Press.

Shabala, S., & Pottosin, I. (2014). Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiologia plantarum*, 151(3), 257-279.

Shannon, M. C., & Grieve, C. M. (1998). Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia horticulturae*, 78(1-4), 5-38.

Shrivastava, P., & Kumar, R. (2015). Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi journal of biological sciences*, 22(2), 123-131.

Sickler CM, Edwards GE, Kiirats O, Gao Z, Loescher W. (2007). Response of mannitolproducing *Arabidopsis thaliana* to abiotic stress. *Funct. Plant Biol.* 34:382–91

Singh, M., Singh, V. P., Dubey, G., & Prasad, S. M. (2015). Exogenous proline application ameliorates toxic effects of arsenate in *Solanum melongena* L. seedlings. *Ecotoxicology and environmental safety*, 117, 164-173.

Slama, I., Abdelly, C., Bouchereau, A., Flowers, T., & Saviouré, A. (2015). Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Annals of botany*, 115(3), 433-447.

Szabados, L., & Saviouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, 15(2), 89-97.

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

Szepesi, Á., & Szöllősi, R. (2018). Mechanism of proline biosynthesis and role of proline metabolism enzymes under environmental stress in plants. In *Plant metabolites and regulation under environmental stress* (pp. 337-353). Academic Press.

Tarbuck, E. J., Lutgens, F. K., & Samy, S. (2003). *Foundations of earth science*. Pearson, New Jersey.

Tavakkoli, E., Fatehi, F., Coventry, S., Rengasamy, P., and McDonald, G. K. (2011). Additive effects of Na⁺ and Cl⁻ ions on barley growth under salinity stress. *J. Exp. Bot.* 62, 2189–2203.

Tester M. & Davenport R.J. (2003) Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* 91, 503–527.

Trujillo-Ramírez, D., Bustos-Vázquez, M. G., Martínez-Velasco, A., & Torres-de los Santos, R. (2023). INTEGRAL USE OF HENEQUEN (*Agave fourcroydes*): APPLICATIONS AND TRENDS—A REVIEW. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 26(2).

Ullah, A., and Bano, A. (2019). Role of PGPR in the reclamation and revegetation of saline land. *Pak. J. Bot.* 51, 27–35.

Upchurch RP (1981). *New Crops for Arid Lands. Advances in Food Producing Systems for Arid and Semi-arid Lands. Part B. USA, New York, Academic Press.*

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>

Vijayan, K., Chakraborti, S. P., Doss, S. G., Ghosh, P. D., & Ercisli, S. (2008). Combining Ability for Morphological and Biochemical Characters in Mulberry (*Morus spp.*) under Salinity Stress. *International Journal of Industrial Entomology*, 16(2), 67-74.

Wa Lwalaba, J. L., Zvogbo, G., Mulembo, M., Mundende, M., & Zhang, G. (2017). The effect of cobalt stress on growth and physiological traits and its association with cobalt accumulation in barley genotypes differing in cobalt tolerance. *Journal of Plant Nutrition*, 40(15), 2192-2199.

Wakeel, A., Sümer, A., Hanstein, S., Yan, F., and Schubert, S. (2011). In vitro effect of different Na⁺/K⁺ ratios on plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize and sugar beet shoot. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 341–345.

Wang, N., & Nobel, P. S. (1998). Phloem transport of fructans in the crassulacean acid metabolism species *Agave deserti*. *Plant physiology*, 116(2), 709-714.

Xiao-Hua L, Jin-He C, Ling L, Qing L, Zhao-Pu L (2009) Effect of seawater stress on physiological and biochemical responses of five jerusalem artichoke ecotypes. *Soil Science Society of China* 19: 208–216.

Yan K, Chen P, Shao H, Zhao S, Zhang L, Zhang L, Xu G, Sun J (2012) Responses of photosynthesis and photosystem II to higher temperature and salt stress in Sorghum. *J Agron Crop Sci* 198: 218–226

Yeo, A. (2007). Salinity. *Plant solute transport*, 340-370.

You, J., Hu, H., Xiong, L. (2012). An ornithine d-aminotransferase gene OsOAT confers drought and oxidative stress tolerance in rice. *Plant Sci.* 197, 59–69.

Zhang, L., Chen, F., Zhang, G. Q., Zhang, Y. Q., Niu, S., Xiong, J. S., ... & Liu, Z. J. (2016). Origin and mechanism of crassulacean acid metabolism in orchids as implied by comparative transcriptomics and genomics of the carbon fixation pathway. *The Plant Journal*, 86(2), 175-185.

Zheng QS, Liu ZP, Liu YL, Liu L (2004) Effects of iso-osmotic salt and water stresses on growth and ionic distribution in Aloe vera seedlings. *Chinese Journal Plant Ecology* 28: 823–827.

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 adjustment and enhancing antioxidant defense in *Eurya emarginata*. *Acta Physiol. Plant* 37, 181.

Zribi, L., Fatma, G., Fatma, R., Salwa, R., Hassan, N., & Néjib, R. M. (2009). Application of chlorophyll fluorescence for the diagnosis of salt stress in tomato “*Solanum lycopersicum* (variety Rio Grande)”. *Scientia Horticulturae*, 120(3), 367-372.