



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto de la melatonina sobre los contenidos de prolina y el transporte de sodio y potasio en plántulas de Chile habanero (*Capsicum chinense* Jaq.) sometidas a estrés salino

Tesis que presenta

DAYRON OTERO RODRÍGUEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción en Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México  
2025

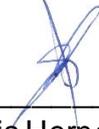
*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.*  
*POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Dayron Otero Rodríguez titulado **Efecto de la melatonina sobre los contenidos de prolina y el transporte de sodio y potasio en plántulas de Chile Habanero (*Capsicum chinense* Jaq.) sometidas a estrés salino**, fue realizado en la Unidad de Biología Integrativa, en la línea de Interacción planta ambiente, en el laboratorio 8 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Manuel Martínez Estévez y la codirección de la Dra. Ileana de la Caridad Echevarría Machado, 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 20 de enero de 2025

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los 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 de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma \_\_\_\_\_



Nombre: Dayron Otero Rodríguez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biología Integrativa del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado: **Efecto de la melatonina sobre los contenidos de prolina y el transporte de sodio y potasio en plántulas de Chile Habanero (*Capsicum chinense* Jaq.) sometidas a estrés salino**, bajo la dirección del Dr. Manuel Martínez Estévez y la Dra. Ileana de la Caridad Echevarría Machado.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradezco a Dios por permitirme poder estar con todas mis capacidades físicas y mentales para poder cumplir con este reto, agradezco por tener una familia incondicional que ha estado al tanto en cada una de las etapas de mi formación y que ha sido ese apoyo constante en todo momento, también agradezco a todas esas personas que he conocido durante todo mi recorrido en este campo y me han dejado sus experiencias y conocimientos.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi familia, especialmente a mis padres, Rodovaldo y Anabel, por su apoyo, esfuerzo y dedicación. Su amor incondicional y sacrificio me han dado fuerzas en todo momento. Les agradezco por haberme inculcado principios sólidos y enseñado los valores que me han guiado a lo largo de mi vida, así como por enseñarme a valorar a las personas que me acompañan en este camino. Gracias por estar siempre a mi lado, tanto en los momentos difíciles como en los de alegría. A mi hermano, Luis, le agradezco por su compañía y por el respaldo incondicional que me ha brindado en todo momento. A toda mi familia, que, desde mi país, Cuba, también han permanecido al pendiente de mi recorrido, les agradezco profundamente por su amor y por todos los recuerdos valiosos que hemos compartido, los cuales siempre llevaré conmigo.

Agradezco al Centro de Investigación Científica de Yucatán, primeramente, por aceptarme a formar parte de la comunidad científica de México, además de brindarme una formación de alta calidad durante estos dos años de formación académica. así como a la Unidad de Biología Integrativa por ofrecerme sus instalaciones para la realización de este proyecto.

Mi agradecimiento al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONHACYT) por la beca No. 1266325, que me permitió continuar mis estudios de maestría.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Manuel Martínez Estévez, mi asesor, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. Aprecio enormemente su dedicación, sus valiosos consejos y, sobre todo, su gran calidad humana. Gracias por todos los conocimientos compartidos a lo largo de estos dos años y por su orientación en la realización de este estudio. Sin su apoyo, este trabajo no hubiera sido posible.

También agradezco a la Dra. Ileana Echevarría Machado por su trato amable y comprensivo, así como por los consejos y el apoyo que me brindó durante los seminarios y en todo el proceso de desarrollo de este proyecto.

Agradezco también a mi comité tutorial el Dr. Manuel Martínez Estévez, la Dra. Ileana Echevarría Machado, al Dr. Felipe Lorenzo Sánchez Teyer y al Dr. Emanuel Bojórquez Quintal, por sus conocimientos, propuestas y valiosos consejos.

A mi comité revisor de tesis, el Dr. Manuel Martínez Estévez, la Dra. Ileana Echevarría Machado, al Dr. Felipe Lorenzo Sánchez Teyer, al Dr. Emanuel Bojórquez Quintal y al Dr. Isaac Zepeda Jazo les agradezco por su tiempo y dedicación en la revisión y corrección de esta tesis.

Gracias a la M.C. Fátima Medina Lara y a la M.C. Miriam del Socorro Monforte, por compartir sus conocimientos, metodologías y consejos, y por su amistad durante este proceso.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio 08 y 10, Camilo, Nayla, Annette, Ángel, Adrián, Federico, Fabiola y Yenisei, gracias por los momentos agradables y por la convivencia en equipo.

Gracias a mis amigos del CICY, Wendy, Gema, a mi prima Susana por los buenos momentos vividos tanto dentro como fuera del trabajo.

A todos mis amigos que han sido parte fundamental de mi vida Armando, Manuel, Javier y que han estado a mi lado en todo momento, les agradezco por su amistad sincera y constante apoyo.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo de tesis se lo quiero dedicar a mis padres, Rodovaldo y Anabel; a mi hermano, Luis; al resto de mi familia en general, sin todos ustedes a mi lado no lo hubiera logrado este reto que me he propuesto, mi cariño infinito para ustedes.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>xvii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xviii</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>5</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Melatonina como compuesto controversial en plantas.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Función de la melatonina en la protección de células vegetales.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2. Localización subcelular de la melatonina en plantas .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3. Niveles fisiológicos de melatonina en plantas .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4. Receptor de melatonina en plantas .....</b>	<b>11</b>
<b>1. 5. Melatonina endógena antes estresores abióticos .....</b>	<b>13</b>
<b>1.6. Biosíntesis de la melatonina en plantas .....</b>	<b>14</b>
<b>1.7. Regulación genética de la melatonina en plantas.....</b>	<b>17</b>
<b>1.8. Aplicación exógena de melatonina en plantas bajo condiciones de estrés abiótico .....</b>	<b>23</b>
<b>1.8.1. Estrés Abiótico.....</b>	<b>25</b>
<b>1.8.2. Estrés Salino .....</b>	<b>25</b>
<b>1.8.3. El papel de la melatonina en situaciones de estrés salino .....</b>	<b>27</b>
<b>1.9. Efectos de la aplicación exógena de melatonina en el transporte de sodio y potasio en plantas .....</b>	<b>28</b>
<b>1.10. Prolina .....</b>	<b>31</b>
<b>1.10.1. Efectos de la melatonina sobre la síntesis de prolina.....</b>	<b>32</b>

1.11. Chile habanero como planta en estudio.....	32
1.11.1. Variedades de chile habanero en México .....	34
JUSTIFICACIÓN .....	35
HIPÓTESIS.....	35
OBJETIVO GENERAL .....	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	37
CAPÍTULO II .....	38
MATERIALES Y MÉTODOS .....	38
2.1. Material vegetal.....	38
2.2. Germinación y condiciones de crecimiento .....	38
2.3. Tratamientos con melatonina.....	38
2.4. Medición de la biomasa y parámetros de crecimiento.....	39
2.5. Cuantificación de sodio y potasio.....	40
2.6. Extracción de ARN total y síntesis de ADNc .....	40
2.7. Expresión semicuantitativa de CCP5CS, CCP5CR y CCPDH en plantas de chile habanero sometidas o no al estrés por NaCl.....	41
2.9. Determinación del contenido de Pro en raíces y hojas .....	43
2.10. Análisis estadístico .....	44
CAPÍTULO III.....	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	45
3.2. Parámetros fisiológicos.....	48

<b>3.2.2. Peso fresco en raíces y hojas.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.4. Peso seco de hojas y raíces.....</b>	<b>52</b>
<b>3.3. Contenidos de sodio y potasio en raíces y hojas.....</b>	<b>56</b>
<b>3.3.1. Contenidos de potasio en raíces y hojas .....</b>	<b>56</b>
<b>3.3.2. Contenidos de sodio en raíces y hojas .....</b>	<b>59</b>
<b>3.4. Contenido de prolina en raíces y hojas .....</b>	<b>61</b>
<b>3.5. Perfiles de expresión de transcritos en raíces de los genes CCP5CS, CCP5CR y CCPDH en las dos variedades contrastantes al estrés por NaCl tras aplicación de melatonina.....</b>	<b>63</b>
<b>Discusión general .....</b>	<b>67</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>71</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>73</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Funciones descritas de la melatonina en plantas superiores.....	6
Figura 1.2. Sitios subcelulares relacionados con la biosíntesis de melatonina en células vegetales .....	9
Figura 1.3. Diagrama esquemático de los componentes de señalización GPCR y análisis de mutantes <i>cand2</i> .....	12
Figura 1.4: Efectos de la melatonina endógena en condiciones de estrés abiótico .	14
Figura 1.5. Biosíntesis de la melatonina en células vegetales .....	17
Figura 1.6. La posible ruta de la melatonina que actúa en el transporte de potasio y sodio .....	31
Figura 1.7. <i>Capsicum Chinense</i> Jaq., chile habanero .....	33
Figura 1.8: Variedades de chile habanero en México por el CICY (2019).....	34
Figura 1.9. Estrategia experimental .....	37
Figura 2.1. Diseño del experimento en cumplimiento del primer objetivo.....	39
Figura 3.1. Efecto de la melatonina (MT) a concentraciones de 0 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M y 100 $\mu$ M, en condiciones de estrés salino .....	47
Figura 3.2.1. Peso fresco total.....	49
Figura 3.2.3. Peso fresco de hojas y raíces.....	51
Figura 3.2.4. Peso seco de hojas y raíces .....	52
Figura 3.2.2. Número de hojas .....	54
Figura 3.3.1. Contenido de potasio (K) en hojas y raíces de plántulas de chile habanero variedad Mayan Kisin. ....	57
Figura 3.3.2. Contenido de sodio (Na) en hojas y raíces de plántulas de chile habanero variedad Mayan Kisin .....	59

<b>Figura 3.3.3. Relación Na/K en hojas y raíces de plántulas de chile habanero variedad Mayan Kisin.....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 3.4. Contenido de prolina en hojas y raíces de plántulas de chile habanero variedad Mayan Kisin .....</b>	<b>62</b>
<b>Figura. 3.5. Expresión de algunos genes del metabolismo de prolina en raíces en presencia de MT exógena en condiciones normales y de salinidad.....</b>	<b>65</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de elementos regulados al alza o a la baja por la melatonina en determinadas condiciones de estrés abiótico.....	21
Tabla 2. Posición de los cebadores para PCR sintetizados para CcP5CS, CcP5CR y CcPDH .....	42

## ABREVIATURAS

MT	melatonina
ARN	Ácido Ribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario;
PF	Peso fresco, PS, Peso seco;
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno;
MT2CPA	2-cys peroxirredoxina A
2CPB	2-cys peroxirredoxina B
ABC1	transportador ABC del complejo Cd-PC
CIPK	proteínas quinasas que interactúan con la calcineurina B
CRK	proteínas quinasas relacionadas con el calcio
CYP707A1-A2	genes del catabolismo ABA
DREB sequía	factores de unión del elemento de respuesta a la sequía
EDS1/PAD4	corresponsable de la acción del ácido salicílico
GA	giberelina
GA3ox	genes de biosíntesis de GA
GA20ox	genes de biosíntesis de GA
GAP	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa;
GPX	glutación peroxidasa
GR	glutación reductasa
GSH1	enzima de biosíntesis de glutación 1;
GST	glutación S-transferasa
HIN	gen inducido por horquilla

HPOD	haloperoxidasa
HSA	genes sensibles al calor
HSF	factor de transcripción del estrés por calor
HSP	proteína de choque térmico
IAA	ácido indol-3-acético (auxina)
ICS1	isocorismato sintasa en la biosíntesis de ácido salicílico
M2H	melatonina 2-hidroxilasa
mRNA-SEQ	secuenciación del transcriptoma completo
MAPK	proteína quinasa activada por mitógeno
MKK	MAP quinasa quinasa
MIPS	enzima de biosíntesis de mioinositol
MT2	metalotioneína 2
MYB	familia de factores de transcripción
NAP/h69/h36/l57	genes inducidos por la senescencia
NCDE1-2-3	cis-epoxicarotenoide dioxigenasa
POD	peroxidasa
PPO	polifenol oxidasa
PK	proteína quinasa
PR	genes de resistencia a patógenos
PRX	peroxirredoxina
rbcS,	subunidad pequeña de RUBISCO
RBOH,	homólogo de oxidasa de explosión respiratoria
SAG12	gen 12 asociado a la senescencia
SEN4	gen 4 asociado a la senescencia

SGR	permanecer verde
SLAC1	canal 1 de aniones lentos de células protectoras
SNAT	serotoninaN- acetiltransferasa
SOD,	superóxido dismutasa
T5H	triptamina 5-hidroxilasa
TCA,	ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TDC1	triptófano descarboxilasa 1
TRX	tiorredoxina

## RESUMEN

En los últimos años, el número de estudios sobre la melatonina en plantas ha aumentado paulatinamente. De esta molécula se conoce en la actualidad su multifuncionalidad en animales, pero también se ha demostrado una gran relevancia en el reino vegetal. Se sabe que esta molécula tiene una función importante en el desarrollo de las plantas y en su respuesta a condiciones de estrés ambiental, particularmente a través de su actividad antioxidante. Sin embargo, los estudios previos indican que esta función es dependiente de la especie y las dosis de este compuesto. A la fecha no se han realizado estudios en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), un cultivo de alto valor comercial en México. El objetivo de este estudio fue dilucidar los efectos de la melatonina sobre el crecimiento de esta especie, cultivada en presencia o ausencia de salinidad (NaCl) y evaluar los contenidos de prolina, un aminoácido marcador de estrés de salinidad y de potasio y sodio. El experimento fue conducido en condiciones de hidroponía, en plantas de 45 días después de germinadas (sometidas o no a 100 mM de NaCl) y la aplicación de melatonina (dosis de 0 a 100  $\mu$ M) se realizó vía foliar. Se evaluó el crecimiento de la planta, con base a peso fresco y seco, así como los contenidos de prolina y los iones K y Na. De igual manera, se determinaron los niveles de transcritos de los genes que codifican las enzimas relacionadas al metabolismo de la prolina. La aplicación de melatonina no modificó el crecimiento de las plantas, al menos hasta el día siete de tratamiento, pero revirtió el efecto inhibitorio de la salinidad, particularmente a 25  $\mu$ M. La acumulación de prolina en los tejidos después de la aplicación del estrés por NaCl fue reducida en las plantas tratadas con melatonina y de igual manera, estos tratamientos modificaron los niveles de transcritos evaluados. En cambio, el tratamiento con melatonina provocó un aumento en los contenidos de Na en los tejidos, efecto que fue dependiente de la dosis, mientras no modificó significativamente los niveles de K en hoja y raíz. Este trabajo expone los primeros resultados del efecto de la melatonina sobre el chile habanero y demuestra que este compuesto puede tener un efecto protector sobre este cultivo ante condiciones de salinidad, efecto que debe de ser estudiado a profundidad a nivel bioquímico y molecular en experimentos futuros.

## ABSTRACT

In recent years, the number of studies on melatonin in plants has gradually increased. This molecule is currently known to be multifunctional in animals, but it has also been shown to have great relevance in the plant kingdom. It is known that this molecule has an important function in plant development and in its response to environmental stress conditions, particularly through its antioxidant activity. However, previous studies indicate that this function is dependent on the species and the doses of this compound. To date, no studies have been conducted on habanero chili (*Capsicum chinense* Jacq.), a crop of high commercial value in Mexico. The objective of this study was to elucidate the effects of melatonin on the growth of this species, grown in the presence or absence of salinity (NaCl) and to evaluate the contents of proline, an amino acid that is a marker of salinity stress, and potassium and sodium. The experiment was conducted under hydroponic conditions, in plants 45 days after germination (subjected or not to 100 mM NaCl) and the application of melatonin (doses from 0 to 100  $\mu$ M) was carried out via foliar application. Plant growth was evaluated, based on fresh and dry weight, as well as proline content and K and Na ions. Likewise, transcript levels of genes encoding enzymes related to proline metabolism were determined. Melatonin application did not modify plant growth, at least until day seven of treatment, but reversed the inhibitory effect of salinity, particularly at 25  $\mu$ M. Proline accumulation in tissues after application of NaCl stress was reduced in plants treated with melatonin and likewise, these treatments modified the transcript levels evaluated. In contrast, treatment with melatonin caused an increase in Na content in tissues, an effect that was dose-dependent, while it did not significantly modify K levels in leaves and roots. This work presents the first results of the effect of melatonin on habanero chili and demonstrates that this compound can have a protective effect on this crop under saline conditions, an effect that should be studied in depth at the biochemical and molecular level in future experiments.

## INTRODUCCIÓN

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es considerada un compuesto orgánico de bajo peso molecular que actúa como una molécula de señalización pleiotrópica y desempeña funciones vitales, tanto en animales como en plantas, al regular muchos procesos fisiológicos (Han *et al.*, 2017). En animales, se identificó por primera vez en 1958, en la glándula pineal bovina. Se considera una hormona que regula múltiples procesos biológicos en estos organismos, como la actividad antioxidante, la mejora inmunológica, los ritmos circadianos, el comportamiento sexual, la fisiología del sueño, la fisiología reproductiva estacional, además de la homeostasis y la temperatura (Lerner *et al.*, 1958).

En 1995, por primera vez se observó la presencia de melatonina en plantas vasculares (Dubbels *et al.*, 1995; Hattori *et al.*, 1995). En la actualidad se tienen algunos datos relevantes sobre el papel de melatonina como agente antioxidante sobre el control de un grupo de moléculas que contienen oxígeno con diferente reactividad química (especies reactivas de oxígeno, ROS) y la peroxidación lipídica en tejidos animales (Reiter *et al.*, 2014). Una hipótesis que existe sobre el papel universal de la melatonina podría hacer énfasis en que es un antioxidante en varios organismos, como mamíferos, aves y peces, entre otros (Vivien-Roels y Péve, 1993). Se puede decir que esta teoría se fortaleció por su identificación en plantas y en otros organismos fotosintéticos, como las algas (Pape y Lüning, 2006). La información obtenida en plantas comprobó la idea de que la melatonina es un compuesto antioxidante común, que es capaz de interactuar con una multitud de ROS y otro grupo de moléculas que contienen nitrógeno con diferente reactividad química (especies reactivas de nitrógeno, RNS), siendo un elemento fundamental en la funcionabilidad de las membranas biológicas, especialmente en las mitocondriales (Galano *et al.*, 2011, García *et al.*, 2014).

La melatonina en las plantas tiene un papel como agente protector frente a distintos tipos de estrés, tanto en situaciones bióticas como abióticas (Wang *et al.*, 2018). En un inicio, por su similitud estructural con el ácido indol-3-acético (IAA, auxina), muchos investigadores se dedicaron a profundizar en el estudio de la función de esta versátil molécula (Hernández-Ruiz *et al.*, 2004). Si bien esta similitud estructural fue un punto de partida importante, el interés por la melatonina en plantas también se debe a que es conocida por sus potentes propiedades antioxidantes, lo que la convierte en un agente protector frente al estrés oxidativo inducido por diversos factores, como la radiación UV, el frío, el calor y la contaminación. Esto despertó el interés en estudiar cómo la melatonina podría ayudar a las plantas a resistir o mitigar estos efectos de estrés, además está involucrada en la regulación del crecimiento y el desarrollo de las plantas. Al igual que las auxinas, la melatonina puede participar en procesos

clave como la germinación de semillas, la formación de raíces y la floración. Esta capacidad para influir en el desarrollo de la planta fue otro aspecto importante para los investigadores. La melatonina también ha demostrado tener un papel en la defensa contra patógenos y herbívoros, lo que sugiere su función en la respuesta al estrés biótico. Su implicación en la regulación de genes relacionados con la defensa puede ser un mecanismo crucial para que las plantas protejan sus tejidos frente a ataques de microorganismos y otros organismos dañinos (Arnao y Hernández-Ruiz, 2018).

Se ha demostrado que la melatonina vegetal no solo actúa como antioxidante, sino también induce cambios sustanciales en la expresión de genes cuyos productos proteicos participan en muchos aspectos fisiológicos. Además, el descubrimiento del primer receptor de melatonina vegetal ha propiciado que se considere esta molécula reguladora como una nueva hormona vegetal. En la actualidad se tiene conocimiento sobre su biosíntesis, degradación, conjugación, transporte, receptor(es), cadena de transducción de señales y efecto(s) fisiológico(s) y esto ha hecho que muchos la consideren como una molécula con posibles efectos hormonales en las plantas (Reiter, Tan, & Galano, 2014).

El metabolismo de la melatonina en plantas se conoce bien; el triptófano es su precursor, y las enzimas que actúan en esta vía son diferentes a las del reino animal (Back *et al.*, 2016). La luz y la temperatura son dos factores importantes que regulan este proceso en las plantas. En cuanto a su catabolismo, la 2-hidroximelatonina es el catabolito principal en plantas, pero también se conocen otros catabolitos derivados del ácido cianúrico (Byeon *et al.*, 2015).

Al igual que las hormonas vegetales, la melatonina tiene una serie de posibles efectos celulares y fisiológicos, como cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y en la permeabilidad de las membranas mediada por transportadores de iones (Li *et al.*, 2016), cambios en la apertura y/o cierre de las estomas, en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y nitrógeno, así como en los metabolitos osmoprotectores, como es el caso de la prolina (Wei *et al.*, 2015). La melatonina actúa en otros procesos como la estimulación del crecimiento, la inducción del enraizamiento, el tropismo (Arnao & Hernández-Ruiz, 2017), la germinación de semillas y la fotosíntesis; optimizando la eficiencia y el intercambio de agua/ $\text{CO}_2$  de las hojas. También regula procesos vitales en las plantas, como la maduración y/o senescencia, el reloj biológico interno y la partenocarpia (Liang *et al.*, 2018).

Recientemente, algunos estudios han demostrado que la aplicación exógena de melatonina mejora la homeostasis iónica de las plantas bajo estrés salino. Se ha descrito además que la melatonina aumenta significativamente el contenido de  $\text{K}^+$  en el citoplasma y disminuye el de

Na<sup>+</sup> y esto crea una relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> significativamente mayor en plantas sometidas a estrés por salinidad (Jiang *et al.*, 2016). La investigación sobre los efectos de esta molécula en la respuesta al estrés salino ha sido desarrollada principalmente en cultivos de relevancia económica para México. A través de estos estudios, se ha buscado comprender mejor los mecanismos moleculares involucrados y, con ello, identificar estrategias que permitan mitigar los efectos negativos del estrés salino en la productividad agrícola. Este enfoque es crucial dado que el estrés salino es uno de los principales factores limitantes en la agricultura mexicana, afectando la disponibilidad de agua y la calidad de los suelos en diversas regiones del país.

El género *Capsicum*, con gran valor comercial en todo México, es originario de las regiones tropicales y subtropicales de América Central y del Sur. Esta planta pertenece a la familia *Solanaceae* e incluye diversas especies de pimientos con una alta relevancia económica. Entre las especies más conocidas, se destacan aquellas que producen frutas con características picantes, tales como *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens* y *Capsicum chinense*. El chile habanero que es el fruto que proviene de *Capsicum chinense*, es reconocido por su sabor característico y su alta pungencia, siendo considerado uno de los chiles más picantes del mundo (Menichini *et al.*, 2009).

En este contexto, el objetivo de la presente tesis es analizar el impacto de la aplicación exógena de melatonina sobre la tolerancia al estrés salino en cultivos de chile habanero, centrándose particularmente en evaluar el efecto de la melatonina sobre parámetros fisiológicos, bioquímicos y moleculares en las plántulas de *Capsicum chinense*.

El enfoque en el chile habanero como objeto de estudio se justifica por su relevancia económica en México y su vulnerabilidad al estrés salino, lo que limita su cultivo en muchas zonas productivas. El uso de melatonina podría representar una estrategia viable para mejorar la tolerancia de esta planta frente a la salinidad, lo cual tendría un impacto directo en la productividad y sustentabilidad del cultivo. Al comprender los mecanismos moleculares y fisiológicos asociados a esta respuesta, se espera contribuir al desarrollo de prácticas agrícolas más resilientes y sostenibles para los cultivos de chile en el país.

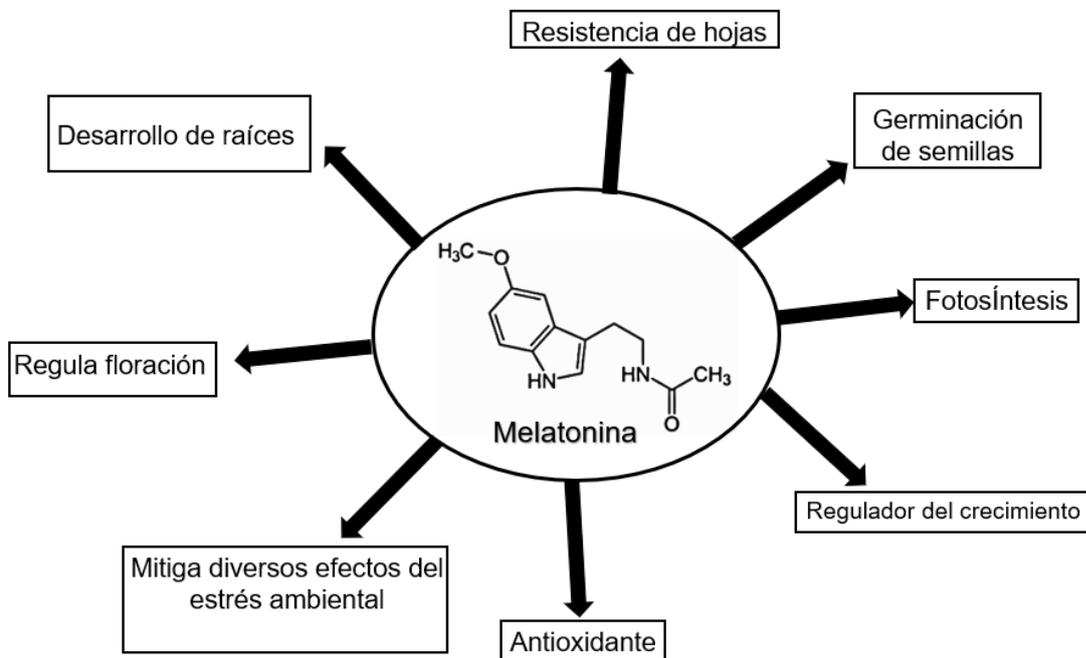
# CAPÍTULO I

## ANTECEDENTES

### 1. Melatonina como compuesto controversial en plantas.

La melatonina es considerada un neurotransmisor de indolamina y una importante molécula de señalización multifuncional en plantas superiores. Desde su descubrimiento en el reino vegetal, se han propuesto varias teorías sobre la misma, principalmente en los últimos 10 años. La melatonina en plantas, conocida como "fitomelatonina" por algunos autores (Blask *et al.*, 2004) fue propuesta inicialmente como una interesante molécula antioxidante natural.

Su presencia se ha descrito en alimentos de origen vegetal en concentraciones elevadas (hasta mg/100 g PF) y su posterior incorporación al torrente sanguíneo tras la ingesta la convierten en un excelente nutraceutico para el ser humano debido a sus propiedades bioactivas que ofrecen beneficios para la salud más allá de su función como regulador del ritmo circadiano en los seres humanos, su capacidad para influir positivamente en diversas funciones biológicas y prevenir enfermedades la convierte en una opción atractiva para su inclusión en dietas y como suplemento alimenticio. (Pita *et al.*, 2014). Además, se ha sugerido el posible uso de plantas ricas en melatonina como bioagente de recuperación para suelos contaminados químicamente, como una práctica innovadora de fitorremediación (Fumagalli *et al.*, 2014). En la actualidad se discuten ampliamente las funciones de la melatonina relacionadas con diversos aspectos, como su papel protector frente a estresores bióticos y abióticos. Además, su función como regulador vegetal en el enraizamiento, crecimiento y otras características morfogénicas, los cambios en los niveles de melatonina que experimentan ritmos biológicos y su acción como modulador de la expresión génica, entre otros (**Figura 1.1**).



**Figura 1.1. Funciones descritas de la melatonina en plantas superiores**

En una primera hipótesis se pensó que la melatonina en las plantas tenía una función muy similar a la descrita en mamíferos. Es por tal motivo que el primer análisis experimental del papel fisiológico de la melatonina en plantas fue enfocado en comprobar su posible función como molécula reguladora en los ritmos circadianos y en aspectos relacionados con la fotoperiodicidad, como la floración (Tan *et al.*, 2012). Junto a este proceso fisiológico, los fotorreceptores, la vernalización, las hormonas y los ritmos circadianos se complementan en una red compleja de regulación para que mediante estas interacciones permitan que la planta se adapte a su entorno de forma eficiente. Estas interacciones complejas aseguran que la planta florezca en el momento adecuado, lo que es crucial para su reproducción y supervivencia.

En 1997, Kolar y colaboradores, demostraron la presencia de melatonina en plantas de *Chenopodium rubrum* L. de 15 días de edad. Estos autores estudiaron los cambios en los niveles de melatonina en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, encontrando niveles bajos o indetectables durante el período de luz y un aumento considerable en la oscuridad, llegando a una concentración máxima de 240-550 pg/g de peso fresco bajo estas condiciones. Este comportamiento y el rango de concentraciones de melatonina tuvieron cierta similitud a lo observado en el reino animal, lo que trajo consigo grandes expectativas. De manera contrastante, en un estudio posterior no se lograron observar estas modificaciones en los niveles de melatonina durante el fotoperiodo aplicado, aunque siempre se produjo el pico máximo de este compuesto en la oscuridad (Wolf *et al.*, 2001). En un trabajo más reciente, este mismo grupo, estudió el efecto de la aplicación exógena de melatonina sobre la floración

de la planta de día corto *Chenopodium rubrum*, antes mencionada. El tratamiento con melatonina no provocó efectos tóxicos ni cambios en la forma, color o número de hojas, en comparación con las plantas de control. Solo la melatonina exógena a las dosis de 100 y 500  $\mu\text{M}$  (muy por encima de los niveles fisiológicos) tuvo un efecto inhibitor débil sobre la floración, pero no sobre el momento y el ritmo (fase, período) del proceso. Además, la melatonina aplicada en el ápice y los cotiledones de las plantas jóvenes permaneció prácticamente sin metabolizar y fue pobremente transportada a otras partes de la planta después de 37 h. Por lo tanto, no está claro si la melatonina afecta o no la floración de esta especie (Kolar *et al.*, 2003).

### **1.1. Función de la melatonina en la protección de células vegetales**

En los estudios más recientes en plantas se ha aplicado un enfoque experimental similar al descrito para animales. La protección contra el daño de los radicales libres es un aspecto importante de esta indolamina en diferentes modelos biológicos (Tan *et al.*, 2003). Se han realizado algunos estudios interesantes con invertebrados (Hardeland *et al.*, 2006). En las plantas, hasta la fecha no se han encontrado pruebas claras que respalden la función protectora de la melatonina. Sin embargo, existen varias hipótesis, pero solo basadas en los niveles de melatonina en los órganos de las plantas. Así, Hardeland (2016) planteo la hipótesis sobre el posible papel de la melatonina en el mantenimiento de la latencia en las semillas, debido a la alta concentración que se observó en este órgano.

También, se ha sugerido alguna relación entre los diferentes contenidos de melatonina de dos cultivares de *Nicotiana tabacum* y su susceptibilidad a la exposición al ozono (Manchester *et al.*, 2000). Otro resultado relevante fue el descrito por Murch y Saxena (2002), quienes dilucidaron el posible papel protector de la melatonina durante el desarrollo floral de *Hypericum perforatum* L. Estos autores encontraron que la serotonina y la melatonina tuvieron concentraciones más elevadas en determinadas etapas del proceso del desarrollo floral y que sus máximos niveles coincidieron con el máximo potencial de regeneración de las anteras aisladas. También plantearon que la melatonina podría actuar como un agente protector del estrés, generando un mecanismo adaptativo para garantizar la reproducción.

Se ha descrito el efecto de la melatonina como protectora de la apoptosis inducida por frío en células en suspensión de zanahoria (Lei *et al.*, 2004). En esta investigación, el efecto antiapoptótico de la melatonina no pudo vincularse experimentalmente con la generación de ROS; aunque se demostró que tiene funciones importantes como factor de integridad de membrana (en membranas nucleares y plasmáticas) en estas células cultivadas.

Un estudio más relevante de estos autores fue el descubrimiento de que el pretratamiento con melatonina de las células de suspensión de zanahoria aumentó significativamente el nivel de las poliaminas, putrescina y espermidina. Aunque los autores sugirieron que el efecto de la melatonina sobre los niveles de poliaminas puede estar relacionado con algunos eventos fotoperiódicos, es más probable una posible interrelación entre auxina, melatonina y poliaminas. En general, la aplicación de hormonas estimulantes del desarrollo vegetal (auxinas, citoquininas y giberelinas) aumenta el contenido de poliaminas en los tejidos vegetales, mientras que las hormonas inhibitoras (ácido abscísico y etileno) disminuyen su contenido, lo que sugiere también una posible actividad fisiológica de la melatonina en este proceso (Tanimoto *et al.*, 2005).

## 1.2. Localización subcelular de la melatonina en plantas

La localización subcelular de la melatonina parece tener lugar en diferentes organelos, como el citoplasma, los cloroplastos y el retículo endoplasmático (RE). Esta distribución obedece a la presencia en estos compartimentos tanto de las enzimas como de los intermediarios implicados en su biosíntesis (Back *et al.*, 2021). Algunos autores han descrito cuatro grandes vías que participan en la biosíntesis de la melatonina en plantas (vía del triptófano (triptófano → serotonina → melatonina, Vía de la serotonina (serotonina → melatonina), vía de los derivados de indoles (derivados de indoles → melatonina) y la vía de los compuestos fenólicos (ácido ferúlico → ácido 5-hidroxiindolacético → melatonina) siendo los cloroplastos y el citoplasma los compartimentos donde ocurren la mayoría de las reacciones (Pérez-González y Jiménez-Rodríguez, 2021).

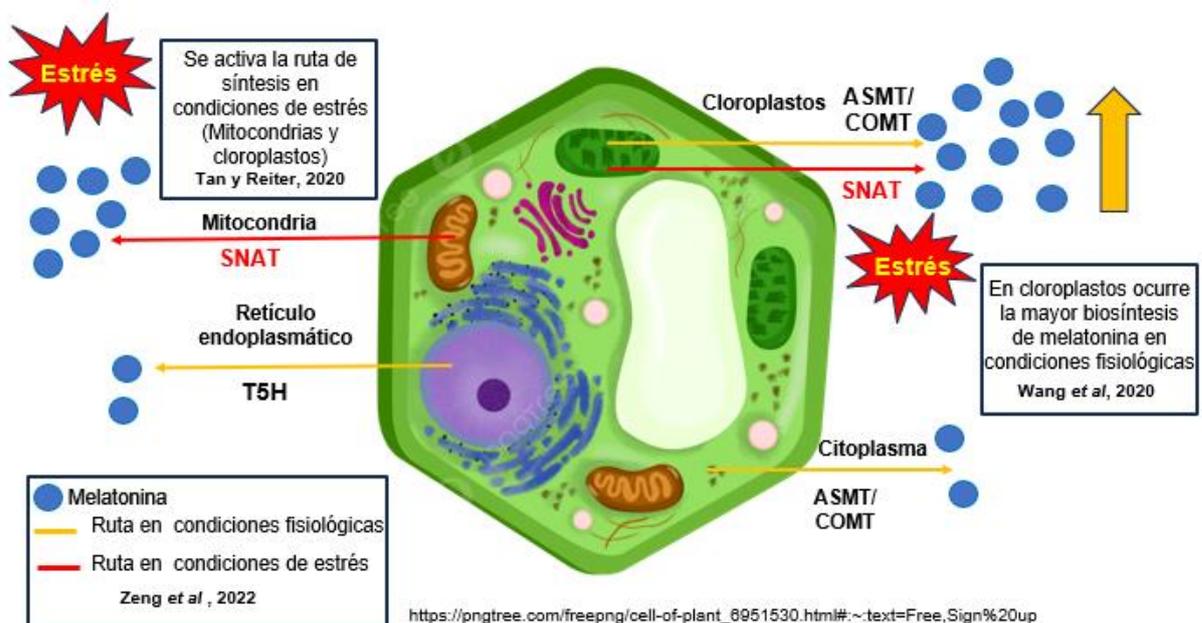
Dado que la melatonina es un pequeño compuesto anfipático, se ha planteado que puede atravesar las membranas biológicas y entrar fácilmente a la célula y organelos como el núcleo y las mitocondrias (Arnao y Hernández-Ruiz, 2007), ya que se ha detectado la enzima Serotonina N-Acetiltransferasa (SNAT) como la que cataliza la transformación de la Serotonina en N-Acetil-Serotonina, último intermediario en su biosíntesis. La relación entre la acción de la enzima Serotonina N-Acetiltransferasa (SNAT) y la capacidad de la melatonina para atravesar membranas biológicas radica en la modificación química que esta enzima realiza en la serotonina, transformándola en N-acetilserotonina, un paso previo en la biosíntesis de melatonina (Zhao *et al.*, 2019) (**Figura 1.2**).

En comparación con las células animales, las células vegetales contienen niveles mucho más altos de melatonina (Tan *et al.*, 2015). Esto plantea la cuestión de si los animales y las plantas tienen mecanismos diferentes para sintetizar este compuesto que contiene indol. El triptófano

descarboxilasa (TDC) es la primera enzima en la ruta biosintética de la melatonina que cataliza la conversión de triptófano en triptamina (Kang *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2013), y se localiza en el citoplasma (Stevens *et al.*, 1993). La triptamina 5- hidroxilasa (T5H), la cual es la segunda enzima en la ruta, se localiza en el retículo endoplásmico (RE) y cataliza la conversión de N-Acetil-triptamina en N-Acetil-Serotonina (Back *et al.*, 2016).

La última enzima en la ruta biosintética de la melatonina es la acetil serotonina metiltransferasa (ASMT) /ácido cafeico O-metiltransferasa (COMT) y se localiza en el citoplasma, en donde cataliza la conversión de N-Acetil-Serotonina en Melatonina. La SNAT también está implicada en la ruta biosintética de la melatonina y reside en los cloroplastos.

La penúltima enzima en la biosíntesis de la melatonina, la SNAT, anteriormente conocida como arilalquilamina N-acetiltransferasa (AANAT) puede tener orígenes filogenéticos diferentes en animales y plantas. Los análisis genéticos han demostrado que las secuencias del gen *snat* de las plantas está más estrechamente relacionado con el de las cianobacterias que con el de las secuencias de animales (Lei *et al.*, 2013). Las cianobacterias tienen la capacidad de sintetizar melatonina y este rasgo puede haber pasado a sus descendientes, los cloroplastos. En conjunto, se ha planteado la hipótesis de que los cloroplastos pueden ser el lugar primario para la biosíntesis de la melatonina.



**Figura 1.2.** Sitios subcelulares relacionados con la biosíntesis de melatonina en células vegetales (Imagen tomada de [https://es.pngtree.com/freepng/cell-of-plant\\_6951530.html](https://es.pngtree.com/freepng/cell-of-plant_6951530.html))

### 1.3. Niveles fisiológicos de melatonina en plantas

Hasta el momento se piensa que varios factores, como la etapa de maduración, el estrés ambiental y el régimen de luz, influyen en los niveles de melatonina en las plantas superiores (VanTassel *et al.*, 2001; Caniato *et al.*, 2003). Aún no está claro si la enorme variabilidad en el contenido de melatonina en una misma planta está relacionada con razones metodológicas, como la detección de falsos positivos o la destrucción durante los procedimientos de extracción o, simplemente, si estos valores reflejan una alta variabilidad intraespecie como la que se observó en un estudio realizado en tomates.

Un enfoque útil para aclarar esta pregunta podría ser un estudio de intercalibración con varios grupos de trabajo que miden el contenido de melatonina en las mismas muestras. La cantidad de melatonina determinada depende de tres variables, (I) la concentración real en la muestra, (II) la eficiencia de extracción, (III) y la propia detección/cuantificación.

La identidad de la melatonina se asegura mediante determinaciones paralelas con ELISA y HPLC, después de la derivatización de la melatonina (HPLC-PD). Los valores obtenidos por estos dos métodos fundamentalmente diferentes muestran una alta correlación y, por lo tanto, cumplen con los requisitos establecidos por Hardeland y Poeggeler en el 2003. Estos requisitos se centraron en garantizar que la identificación de la melatonina fuera específica, precisa y confiable, especialmente cuando se utilizaban técnicas como HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución) y ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Ambas técnicas son fundamentales en la investigación y diagnóstico en bioquímica y biotecnología, pero se utilizan para fines distintos. HPLC se usa principalmente para separar y cuantificar una amplia gama de compuestos químicos y biológicos en líquidos (Snyder, Kirkland & Dolan, 2010), mientras que ELISA está orientado hacia la detección y cuantificación específica de moléculas biológicas como proteínas, antígenos y anticuerpos, basándose en interacciones inmunológicas (Engvall & Perlmann, 1971).

La idea principal era asegurar que las mediciones de melatonina en las muestras no estuvieran contaminadas por otros compuestos con propiedades similares, y que los resultados obtenidos a través de diferentes técnicas de análisis coincidieran, lo que aumentaba la validez de los hallazgos. Un espectro de fluorescencia registrado adicionalmente del derivado de melatonina de extractos de tomate confirma aún más su identidad (Arnao y Hernández-Ruiz, 2018).

En un estudio previo realizado sobre esto se utilizó la extracción en fase sólida, por sus siglas en inglés (SPE) y la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) por sus siglas en

inglés, y demostró la presencia de concentraciones mucho más altas de melatonina en muchas plantas medicinales. Esta indolamina se ha detectado en numerosas especies a niveles que exceden los informados anteriormente. Además del hecho de que se investigaron diferentes especies, las razones de las diferencias observadas siguen sin estar claras (Chen *et al.*, 2003).

El contenido de melatonina en tomate se ha reportado en un amplio rango, desde unos pocos pg/g hasta más de 500 pg/g de peso fresco (PF). Es por tal motivo que es poco probable que la disponibilidad de precursores explique la alta variabilidad de la concentración de melatonina en el tomate, ya que se sabe que el triptófano y los indoles relacionados se encuentran en altas concentraciones y durante las ejecuciones de HPLC preparativa se observaron grandes picos con un tiempo de retención idéntico al de la triptamina (Van Tassel *et al.*, 2001).

#### **1.4. Receptor de melatonina en plantas**

Una de las limitantes más importantes de los estudios sobre la melatonina en las plantas ha sido la falta de un receptor identificado. Esto también ha sido un obstáculo para considerar a la melatonina como una hormona vegetal. No obstante, al igual que ocurre con otras hormonas vegetales, la identificación del receptor sólo se produjo después de obtener muchos datos bioquímicos y fisiológicos relevantes para la melatonina. El punto de inflexión llegó con la reciente identificación de CAND2/PMTR1, un receptor de fitomelatonina descubierto en *Arabidopsis thaliana* (Wei *et al.*, 2018). Esta proteína está localizada en la membrana plasmática, interactúa con la subunidad de la proteína G $\alpha$  (GPA1) y su expresión en diferentes tejidos es inducida por la melatonina (Urano *et al.*, 2013).

La unión fitomelatonina-receptor desencadena la disociación de la subunidad beta y alfa de la proteína G (G $\beta\gamma$  y G $\alpha$ ), lo que activa la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependiente de la NADPH oxidasa (RBOH), aumentando la afluencia de Ca<sup>2+</sup> y promoviendo el flujo de K<sup>+</sup>, lo que finalmente provoca el cierre estomático (Urano *et al.*, 2013).

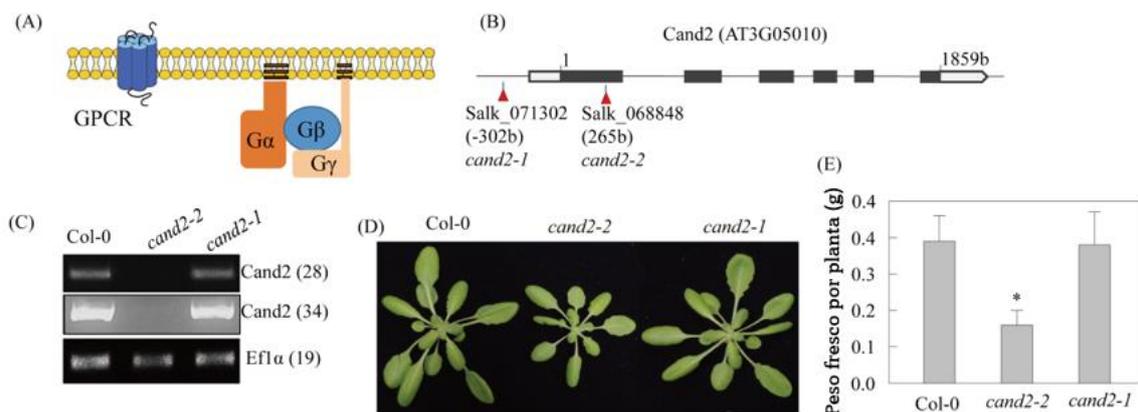
La aplicación de ácido abscísico (ABA) indujo el cierre estomático en la mutante cand2, insensible a la melatonina, lo que sugiere que el cierre estomático inducido por la melatonina involucra a un receptor que es diferente al de ABA; aunque comparte algunos componentes de la señalización (la subunidad G $\alpha$  de la proteína G, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y las señales de Ca<sup>2+</sup> (Zhang & Shi, 2020).

Con esta prueba clave, en combinación con respuestas fisiológicas, como la promoción del crecimiento vegetal, el enraizamiento, la antisenescencia y el cierre estomático, la

fitomelatonina empieza a ser considerada por los investigadores una hormona vegetal. Sin embargo, la diversidad de las acciones de la melatonina lleva a proponer que su relevancia va más allá de ser hormona vegetal (Arnao y Hernández-Ruiz, 2018).

Por el contrario, otros autores sugieren la localización de Cand2 en el citoplasma, en lugar de la membrana plasmática, a través de estudios de microscopía confocal (Khan *et al*, 2022). Al usar mutantes knockout de Cand2 de *Arabidopsis* se encontró que la activación de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) mediada por melatonina no fue abolida, ni tampoco se modificó la inducción de genes de defensa mediada por melatonina (por ejemplo, *gst1*), en relación con la del tipo silvestre Col-0 (Lee & Back., 2020).

A pesar de que este resultado contradice los anteriores, es un hecho que sigue sin estar claro cómo la activación de MAPK mediada por melatonina disminuyó ligeramente en una de estas mutantes, sin afectar la inducción de genes de defensa corriente abajo. Además, no se puede descartar la posibilidad de que Cand2 sea una proteína de unión a melatonina y que su unión provoque una disminución del nivel de melatonina libre en las plantas (Lee & Back., 2020) (Figura 1.3).

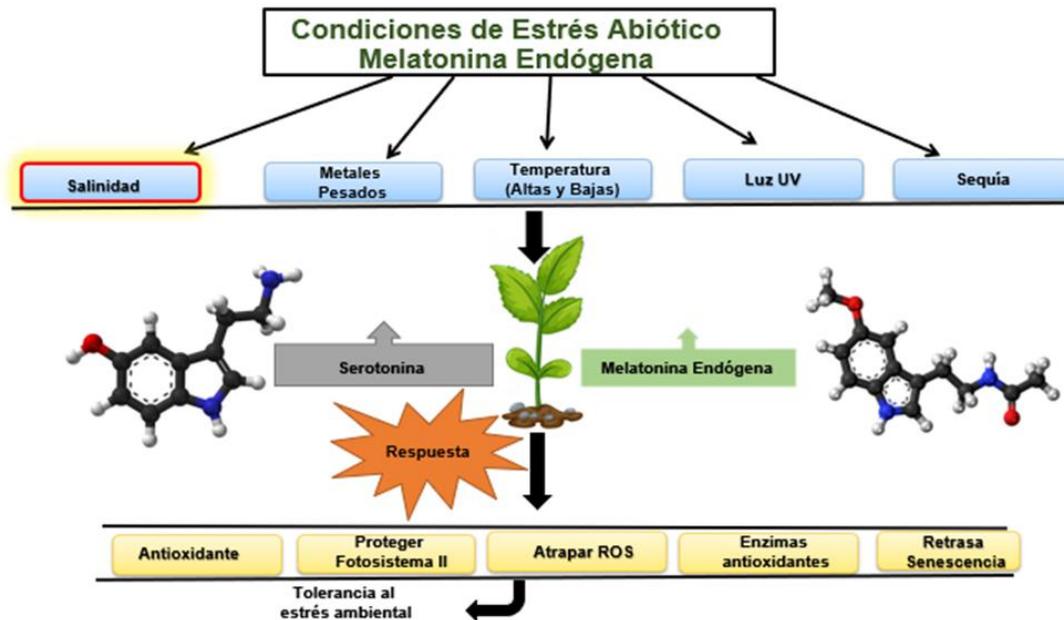


**Figura 1.3.** Diagrama esquemático de los componentes de señalización GPCR y análisis de mutantes cand2 (Lee & Back, 2020). (A) Los componentes de la vía de señalización GPCR. (B) Esquema de los sitios de inserción de ADN-T en Cand2. (C) Niveles de transcripción de Cand2 en el tipo salvaje Col-0 y dos mutantes cand2 medidos por RT-PCR. (D) Fenotipos cultivados en el suelo de Col-0 de cuatro semanas de edad y las dos líneas de eliminación de cand2 independientes, cand2-1 y cand2-2. (E) Peso de brote (PF) de plantas de la línea Col-0 y cand2 de cinco semanas de edad. Las barras muestran el peso fresco promedio de seis plantas  $\pm$  SE. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al tipo silvestre (HSD de Tukey;  $P < 0,05$ ). GPCR, receptor acoplado a proteína G.

## 1. 5. Melatonina endógena antes estresores abióticos

Un alto número de investigaciones sugieren el papel protector de la melatonina en las plantas. Sin embargo, se ha demostrado claramente que los niveles endógenos de melatonina cambian en función de las condiciones ambientales. En un estudio con *Glycyrrhiza uralensis*, las raíces multiplicaron su contenido endógeno de melatonina hasta unos 80 pmol/gPF tras una exposición a radiación UV-B, aumentando aproximadamente siete veces, en comparación con las plantas testigo (Afreem *et al.*, 2006). Estos datos sugirieron que la melatonina puede actuar como molécula protectora en respuesta a diferentes estresores abióticos ambientales, como la temperatura, la radiación UV, el ciclo luz-oscuridad, los agentes químicos, el déficit hídrico y la salinidad (**Figura 1.4**).

Otros estudios realizados en plantas de cebada y altramuz tratadas con diferentes estresores químicos como sal de zinc, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y cloruro sódico mostraron un aumento en los niveles endógenos de melatonina (Arnao *et al.*, 2009). Esta inducción de la biosíntesis de melatonina dependió del tiempo y de la concentración, siendo la sal de zinc el mejor inductor en las raíces, tanto así que este elemento multiplicó por seis los niveles de melatonina en cebada y por 12 en altramuz. En el mismo estudio, en las plantas de altramuz cultivadas a 6 °C se pudo observar un aumento en los niveles de melatonina de 2,5 veces en comparación con las plantas cultivadas a 24 °C (Arnao *et al.*, 2013). Sin detenerse en el valor cuantitativo de melatonina (del orden de pmol/g PF), las plántulas cultivadas en presencia de NaCl mostraron dos veces más contenido de esta molécula en las raíces, con respecto a aquellas no tratadas, y hasta seis veces más en los cotiledones. Los niveles de serotonina también fueron superiores en las plantas tratadas con sal. Después de un estudio inmunohistoquímico de localización se describió que las regiones diferenciadas de las raíces de las plántulas sometidas a tratamiento con NaCl presentan una mayor acumulación de serotonina y melatonina, en la zona simplástica. Estas indolamina se detectaron en las células del cuerpo oleoso de los cotiledones. Por esta razón a los cotiledones de las plántulas sometidas a condiciones de estrés salino, se le alegó la actividad enzimática de la hidroxindol- O-metiltransferasa (HIOMT), el último paso en la vía de biosíntesis de la melatonina (Arnao *et al.*, 2013).



**Figura 1.4:** Efectos de la melatonina endógena en condiciones de estrés abiótico

### 1.6. Biosíntesis de la melatonina en plantas

La biosíntesis de melatonina en el reino vegetal comienza con triptófano y consta de cuatro pasos enzimáticos, pero se conocen al menos seis enzimas, triptófano descarboxilasa (TDC), triptófano hidroxilasa TPH, triptamina 5- hidroxilasa (T5H), serotonina N-acetiltransferasa (SNAT), N-acetilserotonina metiltransferasa (ASMT) y ácido cafeico O-metiltransferasa (COMT) (Back *et al.*, 2016). Además, se conoce que existen al menos cuatro vías biosintéticas (**Figura 1.5**). Estas cuatro rutas distintas para la biosíntesis de melatonina implican necesariamente a la serotonina como un agente mediador, lo que sugiere que la serotonina es un intermediario de gran importancia para la síntesis de melatonina en plantas.

Se ha descrito que la enzima implicada en el primer paso de la síntesis de melatonina es la TDC, seguida de la T5H, debido a que en las plantas el paso de descarboxilación se superpone sobre el de hidroxilación. No obstante, en el paso inverso, es en el que se produce la hidroxilación primero, que también está presente la enzima TPH correspondiente, aunque no se ha descrito. Es por tal motivo que la combinación de estas tres enzimas, TDC, T5H y TPH, conduce a la síntesis de serotonina, la cual a partir del triptófano es muy activa, lo que significa un mayor flujo metabólico para la síntesis de melatonina a partir de serotonina; esto también requiere dos reacciones enzimáticas (Hernández-Ruiz & Arnao, 2010).

Como consecuencia de la elevada capacidad metabólica, la serotonina se acumula en grandes cantidades, hasta 565 µg/g de peso fresco (PF). Por otro lado, la melatonina se induce hasta solo 262 µg/g pf en hojas de arroz desprendidas después de la senescencia; esto comprueba que existe una diferencia de más de tres órdenes de magnitud en la capacidad metabólica entre la síntesis de la serotonina y la melatonina, al menos en plantas. Aquí se refleja una evidencia que la síntesis de melatonina aguas abajo mediada por serotonina genera una capacidad metabólica a niveles muy bajos, en comparación con la síntesis de serotonina aguas arriba (Tan, Reiter & Galano, 2014).

En el arroz, el tratamiento con el herbicida butafenacil provocó un aumento en la transcripción de tres de las enzimas que actúan en la vía de la biosíntesis de la melatonina, la T5H, la TDC y la HIOMT. También en las hojas de arroz tratadas con cadmio, el nivel de melatonina endógena aumentó seis veces por encima del nivel de las plantas de control. Esta síntesis de melatonina inducida por cadmio estuvo acompañada por la regulación al alza de TDC, T5H y HIOMT. Sin embargo, la expresión de la SNAT, el penúltimo gen en la síntesis de melatonina se reguló a la baja (Byeon *et al.*, 2015).

De forma similar, en dos especies de *Malus*, la expresión de los cuatro genes de la biosíntesis de melatonina, *tdc*, *t5h*, *snat*, y *hiomt* fue regulada al alza por las condiciones de sequía (Li *et al.*, 2015). Todos los datos disponibles hasta la fecha mostraban más evidencias de cómo los estresores abióticos inducen la biosíntesis de melatonina y su papel como señal intermedia en las respuestas al estrés abiótico.

La síntesis de serotonina es una reacción de dos pasos, pero involucra tres enzimas distintas, como son, la SNAT, la ASMT y la COMT. Se conoce que la SNAT cataliza la conversión de serotonina en N-acetilserotonina, que luego ésta es convertida en melatonina por la ASMT o la COMT. Como la SNAT presenta cierta atracción de sustrato hacia la serotonina y la 5-metoxitriptamina, la reacción catalizada por la SNAT sucede primero para producir N-acetilserotonina, que posteriormente ocurre una transformación de O-metilado a melatonina por ASMT/COMT (Xu *et al.*, 2019).

Existe cierta similitud con ASMT y COMT, ya que tienen afinidad de sustrato hacia la serotonina y N-acetilserotonina, y esto se debe a que ASMT y COMT primero metilan la serotonina a 5-metoxitriptamina, después de la reacción SNAT a la melatonina. Por todo esto se puede reafirmar que la serotonina puede ser catalizada para N-acetilserotonina y 5-metoxitriptamina mediante SNAT y ASMT/COMT, seguido de la producción de melatonina por ASMT/COMT y SNAT, respectivamente (Sharma *et al.*, 2018).

Cabe mencionar que el orden de las reacciones enzimáticas en las vías biosintéticas de la melatonina va a depender de los sitios subcelulares de intermediarios y formación de melatonina. Un ejemplo de esto son las vías I y II, que se basan en la síntesis de serotonina en el retículo endoplásmico (RE), mientras que las vías III y IV resultan en la producción citoplasmática de serotonina. En cuanto a la síntesis de melatonina que ocurre en cloroplastos, la enzima del paso final es SNAT; mientras que ASMT/COMT están inmersos en la reacción terminal en el citoplasma (Boddu *et al.*, 2017).

Dependiendo de los sitios de biosíntesis, los niveles de la serotonina y melatonina estarían altamente influenciados por la capacidad de cualquiera de los flujos anabólicos o catabólico. Por todos los estudios realizados hasta el momento se sabe que el triptófano y la serotonina se almacenan en niveles elevados en las hojas senescentes, mientras que la triptamina y la N-acetilserotonina no aumentan sustancialmente en arroz. Esto se podría explicar por la rápida conversión de triptamina a serotonina por acción de la T5H, así como una lenta conversión de serotonina en N-acetilserotonina por la SNAT (Kang *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2010). No obstante, no se logrará una significativa acumulación de serotonina cuando las enzimas se encuentren compitiendo por la misma como sustrato, dentro del mismo sitio subcelular.

Un ejemplo de esto es cuando la serotonina se metaboliza rápidamente en amidas fenilpropanoides, como la feruloil serotonina, por serotonina N-hidroxicinamoil transferasa, que se expresa en el citoplasma. La melatonina puede metabolizarse rápidamente en 2-hidroximelatonina (2-OHMeI) y 3- hidroximelatonina cíclica (3-OHMeI) por la melatonina 2-hidroxilasa (M2H) y la melatonina 3-hidroxilasa (M3H), respectivamente, cuando la melatonina está presente en los cloroplastos y citoplasma, respectivamente (Lee *et al.*, 2016). Dicho todo esto se sugiere que las múltiples vías biosintéticas con sus diferentes sitios subcelulares para la producción de melatonina juegan un papel importante en el mantenimiento de niveles estables de esta molécula, así como en la inducción de la síntesis de ésta en respuesta a diversos factores estresantes que permiten a las plantas hacer frente a los efectos adversos.

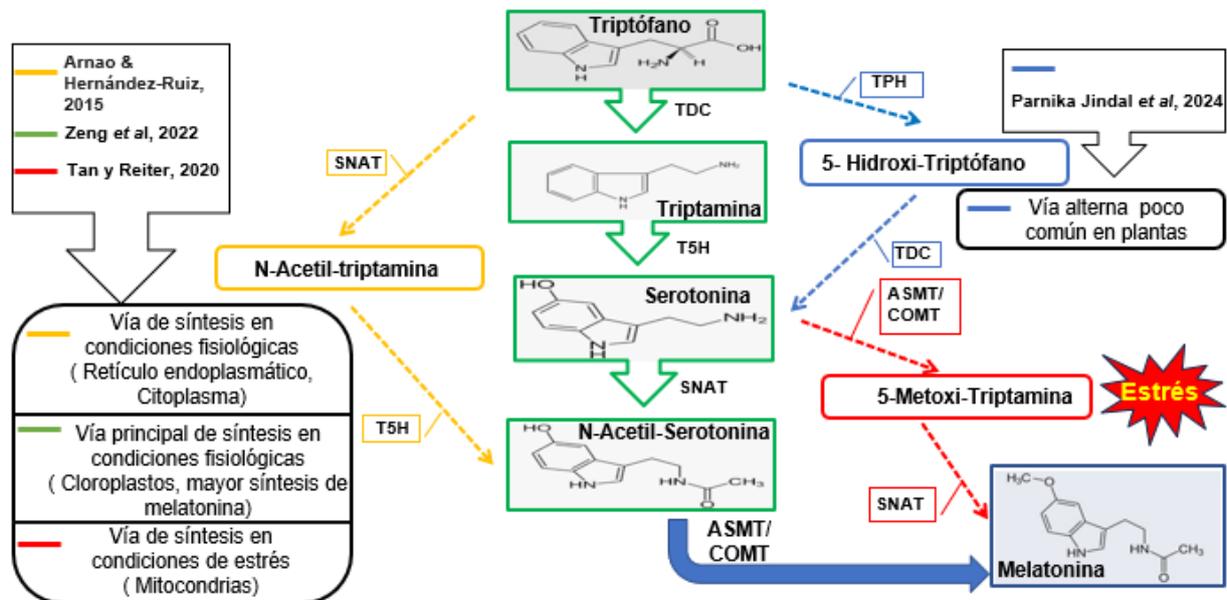


Figura 1.5. Biosíntesis de la melatonina en células vegetales

### 1.7. Regulación genética de la melatonina en plantas

El estudio progresivo de la melatonina en plantas ha ido acumulando datos sobre la bioquímica y la fisiología de esta recientemente denominada hormona vegetal. Entre sus funciones se le atribuye la de mitigadora frente a diferentes condiciones de estrés, tanto biótico como abiótico. Después de tantos estudios se estableció primero esto y fue solo a partir de técnicas genómicas que se empezó a descubrir el papel regulador de la melatonina en plantas.

Entre las investigaciones de gran relevancia en este tema fue la de Byeon y colaboradores, quienes presentaron un análisis de micromatrices de genes expresados diferencialmente en arroz transgénico rico en melatonina (*Oryza sativa*), los cuales identificaron 260 y 204 genes que estaban regulados aguas arriba o aguas abajo, respectivamente, en comparación con el tipo silvestre (Byeon *et al.*, 2013).

Otro estudio que sumó elementos de importancia fue el realizado por Weeda y colaboradores, que, utilizando la tecnología mRNA-SEQ, analizaron plantas de *Arabidopsis* bajo un tratamiento de melatonina de 16 horas a 100 pM (bajo) y 1 mM (alto). Estos perfiles de expresión fueron evaluados para identificar genes expresados diferencialmente. Cabe

mencionar que algunos de estos genes alterados por niveles bajos de melatonina (81 genes), no se vieron afectados por niveles altos de melatonina (1308 genes). Estos datos sugirieron que la melatonina puede tener diferentes funciones involucradas en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas, tanto a concentraciones bajas como altas (Weeda *et al.*, 2014).

En una investigación realizada en plántulas de pepino (*Cucumis sativus*) se demostró que la melatonina tiene efectos inhibitorios del estrés por salinidad en la germinación, principalmente al regular la biosíntesis y el catabolismo de ABA y las giberelinas (GA). Esto ocurre mediante la regulación positiva de los genes del catabolismo de ABA (*cyp70a1* y *cyp70a2*) y la regulación negativa de un gen de biosíntesis de ABA (*necd2*), teniendo como resultado una rápida disminución en el contenido de ABA durante la etapa temprana de la germinación (Zhao & Zhang, 2020).

Mediante estas investigaciones se ha comprobado que la melatonina induce la expresión de los genes de biosíntesis de GA (*GA20oxy* *GA3ox*), causando como efecto un aumento en GA4 (Zhang *et al.*, 2014; Marino & Hernández-Ruiz, 2018). Estos estudios sugirieron que la melatonina tiene un papel importante en la modulación de la expresión de una variedad de genes, lo que refleja sus funciones fisiológicas pleiotrópicas en el crecimiento y desarrollo de las plantas. A continuación, se muestran algunos de los puntos claves ya descritos sobre el papel regulador de la melatonina en plantas (**Tabla 1**).

- (I) La melatonina actúa como bioestimulador en situaciones de estrés abiótico, regulando elementos clave expresados frente a estresores como calor, frío, sequía, salinidad, alcalinidad, metales pesados (Zn, Cd, Cu, Pb, V y Al), y también boro, agentes químicos (herbicidas, tóxicos), y alta radiación solar y UV (Hernández-Ruiz & Arnao, 2018; Sharif *et al.*, 2018).
- (II) La melatonina actúa como un regulador contra los ataques de patógenos de plantas, tanto fúngicos como bacterianos, con un papel regulador clave en la respuesta a patógenos en la que generalmente están involucrados el etileno, el ABA, el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (Arnao, y Hernández-Ruiz, 2018). Aún no se han publicado estudios de una posible interacción de los virus de plantas y la melatonina (Hernández-Ruiz & Arnao, 2018) **Tabla 1**.
- (III) Se ha demostrado el papel de la melatonina como regulador de la expresión de enzimas y otros elementos relacionados con el metabolismo redox. La melatonina

regula el estrés oxidativo y las ROS en las plantas, a través de enzimas que intervienen en este proceso redox, incluidas la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la peroxidasa (POX), la ascorbato peroxidasa (APX) y la glutatión reductasa (GR), así como los metabolitos ácido ascórbico (ASC) y glutatión (GSH), de manera similar a como ocurre en las células animales (Kaya & Doganlar, 2019; Hernández-Ruiz & Arnao, 2018).

- (IV) La melatonina funciona como un agente antisenescencia que fue una de las primeras respuestas demostradas mediadas por melatonina (Arnao & Hernández-Ruiz, 2009a). La melatonina regula negativamente los genes clave de la senescencia de la hoja, como *sag12*, y enzimas del catabolismo de la clorofila, como PAO, entre otros elementos (Hernández-Ruiz & Arnao, 2018).
  
- (V) La melatonina también actúa como potenciador o protector de la fotosíntesis y la conductancia estomática, regulando a la alza muchos elementos de los fotosistemas, los transportadores de electrones y los genes de la ATPasa. Las plantas tratadas con melatonina muestran un aumento de la tasa fotosintética neta, la tasa de transpiración, la conductancia estomática, el rendimiento cuántico del fotosistema II y la tasa de transporte de electrones fotosintéticos. La melatonina también optimiza la funcionalidad de las estomas (p. ej., provoca una mayor apertura de las estomas) en condiciones adversas a través de la regulación de las proteínas del canal de aniones de las células protectoras y las deshidrinas, todo lo cual aumenta la disponibilidad del CO<sub>2</sub>.

En el ciclo de Calvin, la melatonina regula la expresión de los genes que codifican Rubisco, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasas y enzimas de la interconversión de azúcares. Además, los elementos del ciclo ASC-GSH, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y las rutas de biosíntesis de mioinositol y ácidos grasos también están regulados por la melatonina (Hernández-Ruiz & Arnao, 2018) **Tabla 1.**

- (VI) Hay muchos aspectos del metabolismo en los que parece actuar la melatonina. Las plantas tratadas con melatonina exhibieron concentraciones más altas de 54 metabolitos, en comparación con las plantas no tratadas con melatonina. Por lo tanto, los niveles más altos de prolina y carbohidratos (glucosa, maltosa, fructosa, sacarosa y trehalosa) en las plantas tratadas con melatonina proporcionaron

efectos beneficiosos en condiciones de estrés abiótico. Además, los niveles más altos de otros metabolitos, incluidos múltiples aminoácidos, ácidos orgánicos y azúcares en plantas tratadas con melatonina indican procesos fisiológicos beneficiosos durante la exposición de éstas al estrés abiótico. Un análisis transcriptómico comparativo identificó 2361 transcripciones reguladas al alza y 1572 reguladas a la baja en tratamientos con melatonina exógena (Hernández-Ruiz & Arnao, 2018).

- (VII) La melatonina también participa en el metabolismo secundario, donde induce la biosíntesis de antocianinas y flavonoides, regula este proceso en la vía de los carotenoides (Zhang *et al.*, 2016; Liang *et al.*, 2018).
  
- (VIII) La melatonina autorregula la expresión de los genes de su biosíntesis. Así, la expresión de los genes *tdc*, *snat*, *asmt* y *comt* ocurre en situaciones de estrés, produciendo un estallido en los niveles de melatonina endógena. Este estallido parece ser responsable de la expresión inducible de su propio receptor y de las respuestas mediadas por éste. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) pueden inducir la expresión de enzimas de la biosíntesis de melatonina, y la melatonina puede interactuar directa e indirectamente con ROS y/o RNS, construyendo una red redox compleja (Hernández-Ruiz & Arnao, 2018a; Wei *et al.*, 2018) **Tabla 1**.
  
- (IX) Uno de los aspectos más interesantes y controvertidos es la implicación de la melatonina como regulador de la expresión de enzimas y elementos reguladores de las hormonas vegetales. Se ha demostrado que la melatonina regula la expresión de múltiples elementos (enzimas, receptores y factores de transcripción) en la biosíntesis y catabolismo de auxinas, giberelinas, citoquininas, ABA, etileno, ácido jasmónico, SA y, como se ha descubierto recientemente, brasinoesteroides. También regula el metabolismo de las poliaminas. Por el contrario, todavía no se ha comprobado que estas diferentes hormonas vegetales puedan influir en los niveles de melatonina de las plantas (Gong *et al.*, 2017, Hernández-Ruiz & Arnao, 2018b).
  
- (I) Otras áreas en las que los datos aún son escasos es la posible participación de la melatonina en la floración y fructificación (partenocarpia) (Liu *et al.*, 2018; Hernández-Ruiz & Arnao, 2018c).

**Tabla 1.** Ejemplos de elementos regulados al alza o a la baja por la melatonina en determinadas condiciones de estrés abiótico (Modificado sobre la base de Hernández-Ruiz y Arnao, 2018 d).

Condición fisiológica	Elementos regulados	Especies de plantas	Referencias
<b>Estresores abióticos</b>			
<b>Sequía</b>	SOD/CAT/POD	pepino, uva	Zhang <i>et al.</i> , 2013; Meng <i>et al.</i> , 2014
	NCDE3/CYP707A1-A2/APX/CAT/POD TDC1/SNAT2/T5H/ASMT1	Malus	Li <i>et al.</i> , 2015
<b>Salinidad</b>	APX/CAT/POD/Na + -K+ transportadores	Malus	Li <i>et al.</i> , 2012; Li <i>et al.</i> , 2016
	TRX f/TRX m1-m4/TRX m2 PRXQ/PRX2E1-E2/2CPA/2CPB PET y proteína D1	Tomate	Zhou <i>et al.</i> , 2016
	SOD/CAT/POD NCDE2/CYP707A1-A2/GA20ox/GA3ox	Pepino	Zhang <i>et al.</i> , 2014
	APX/SOD/POD/GR/PPO MIPS/SLAC1/MYB/	Cítricos	Kostopoulou <i>et al.</i> , 2015
<b>Metales Pesados</b>	SOD/GPX/CAT/APX/GR/H + - ATPasa GSH1/PCs/MT2/ABC1/	Tomate (Cd)	Hasan <i>et al.</i> , 2015
	HPOD/SOD/APX/POD/GPX/GST Chl-sintasa/Chl-ase1/RBOH ASMT/ metionina S-metiltransferasa	Sandía (V)	Nawaz <i>et al.</i> , 2018

<b>Frío</b>	CBFs/DREBs/COR15a/CAMTA1 ZAT6/ZAT10/ZAT12	Arabidopsis	Bajwa <i>et al.</i> , 2014; Shi & Chan, 2014
	SOD/GPX/APX/GR	Pepino	Balabusta <i>et al.</i> , 2016
<b>Calor</b>	HSFA1s (HSFA1a/1b/1d/1e) HSFA2/HSA32/HSP90/HSP101	Arabidopsis	Shi <i>et al.</i> , 2015
	HSP (17,4/20/20-1/21/70/90) ATG (5/6/8f/8a/12/18c) Varios agregados de proteínas	Tomate	Xu <i>et al.</i> , 2016
<b>Frío, salinidad y sequía</b>	SOD/CAT/POD/GPX/GST Metabolismo de C y N/C2-C3- Ciclos/Prolina MAPKs/CDPKs/CIPKs/CRKs	Bermuda Grass	Shi <i>et al.</i> , 2015
	TDC (1-2- 3)/T5H/SNAT/ASMT2/M2H	Arroz	Wei <i>et al.</i> , 2016
<b>Otras condiciones fisiológicas</b>			
<b>Senescencia foliar</b>	Feofórbido a oxigenasa (PaO) Gen 12 asociado a la senescencia (SAG12) Ciclo ASA-GSH	Malus	Wang <i>et al.</i> , 2012
	IAA17/SEN4/SAG12	Arabidopsis	Shi <i>et al.</i> , 2015
	Genes relacionados con la degradación de la clorofila (SGR/RCCR1/NYC1-3) Genes inducidos por la senescencia (NAP /h69/h36/I57) 39 factores de transcripciones diferentes en el arroz	Arroz	Liang <i>et al.</i> , 2015
	SGR/NYC1/NOL/PPH/PAO/RCCR1 SAG12.1/h36/I69 Ciclo SOD/CAT/ASA-GSH	Ballico	Zhang <i>et al.</i> , 2016

<b>Fotosíntesis/captación de CO<sub>2</sub></b>	Phot-I: PsaA, PsaF, PsaG, PsaH, PsaK, PsaO Phot-II: PsbE, PsbO, PsbP, PsbQ, PsbY, PsbZ, Psb28  8 genes transportadores de electrones (ATPF1A) Ciclo de Calvin: rbcS/GAPC1/GAPCP-2 VTC4/APX4 (biosíntesis de ascorbato) Varias enzimas relacionadas con la conversión de glucosa-fructosa Varias enzimas del ciclo TCA Varias enzimas de biosíntesis de ácidos grasos	Haba de soja	Wei <i>et al.</i> , 2015
---	--	--------------	--------------------------

### 1.8. Aplicación exógena de melatonina en plantas bajo condiciones de estrés abiótico

Después del cúmulo de información de la melatonina en animales y tras su descubrimiento en plantas, se comenzaron a estudiar los posibles efectos que la aplicación exógena de esta molécula podría tener ante diferentes situaciones de estrés abiótico. Desde las investigaciones iniciales en células de cultivo de zanahoria (*Daucus carota*) se constató la disminución de melatonina endógena en plantas no tratadas de manera exógena con este compuesto, en comparación con las que sí, siendo este efecto dependiente tanto del tiempo como de la concentración (Bajawa *et al.*, 2014).

El tratamiento en *Arabidopsis* con melatonina aumentó la expresión de algunos genes de señalización en respuesta al estrés por frío: factores de transcripción en las plantas que regula la respuesta al estrés por frío (CBF) por sus siglas en inglés, que controlan la expresión de aproximadamente 100 genes, proporcionando tolerancia a la congelación a las plantas; *cor15a*, un gen sensible al frío regulado por *cbf*; *camta1*, un factor de transcripción involucrado en la tolerancia al estrés por congelación y sequía y *zat10* y *zat12*, dos activadores clave de la transcripción de genes antioxidantes relacionados con ROS (Yin & Li, 2015).

Estos datos apuntan a un papel de la melatonina en la regulación positiva de genes específicos que responden al frío, lo que respalda la hipótesis de que la melatonina desempeña un papel protector contra el estrés abiótico (Shi & Chan, 2014). Datos similares se obtuvieron en un estudio reciente con plantas de soja (*Glycine max*). El tratamiento con melatonina mejoró la tolerancia a la sal y la sequía de las plantas, lo que demuestra el importante potencial de la melatonina para mejorar los cultivos en el campo (Wei *et al.*, 2015).

El efecto de la melatonina sobre el proceso fotosintético merece una consideración especial. En el trabajo pionero de Arnao *et al.* (2009), la aplicación de melatonina retardó la senescencia inducida en las hojas de cebada y retrasó la pérdida de clorofilas en comparación con las hojas no tratadas. Este efecto se contrastó con el efecto inductor de la hormona ABA y el efecto retardante de la kinetina sobre la senescencia foliar. Más tarde, este efecto fue reproducido para otras especies, como la manzana (Wang *et al.*, 2013), *Arabidopsis* (Weeda, 2014), pepino (Zhang *et al.*, 2013), arroz (Byeon *et al.*, 2013) y cereza (Sarropoulou *et al.*, 2012). El interés se centró en cómo la melatonina fue capaz de prevenir la pérdida de clorofilas en situaciones de estrés, optimizando así el proceso fotosintético.

La melatonina exógena retrasó la senescencia inducida por la oscuridad en hojas de manzano (*Malus domestica*) a través de la mejora de algunas actividades de las enzimas depuradoras de ROS, lo que contribuyó a la eliminación del exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado en las hojas estresadas, mientras se mantenían los contenidos de ácido ascórbico y glutatión más alto que en las hojas de plantas testigo (Wang *et al.*, 2013). Además, la aplicación a largo plazo de melatonina a manzanos de 1 año en condiciones de sequía retrasó la senescencia de las hojas. El tratamiento con melatonina redujo la degradación de la clorofila, aumentó la tasa fotosintética y las actividades de las enzimas depuradoras de ROS, revirtiendo el efecto adverso del estrés hídrico (Zhang *et al.*, 2013).

Además, la aplicación de bajas concentraciones de melatonina exógena a plantas de *Prunus avium* L. x *Prunus cerasus* L. mejoró ligeramente el contenido de pigmentos fotosintéticos, la biomasa y los carbohidratos totales, al tiempo que redujo el contenido de prolina de las raíces, lo que indica un papel de la melatonina en el metabolismo de estrés de la planta (Sarropoulou *et al.*, 2012).

En plantas de soya estresadas por sal/sequía, la aplicación de melatonina exógena promovió el crecimiento de las plantas y el rendimiento de semillas, mejorando la tolerancia a estos estreses. El análisis del transcriptoma reveló que la melatonina aumentaba la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis, el metabolismo de carbohidratos/ácidos grasos y la biosíntesis de ascorbato. Más concretamente, algunos genes regulados positivamente por la melatonina incluyen dos subunidades del fotosistema I (PsaK y PsaG), dos elementos (PsbO y PsbP) relacionados con el complejo de evolución de oxígeno del fotosistema II (proteínas potenciadoras de la evolución de oxígeno), el gen de ferredoxina PetF, L-galactosa 1-P fosfatasa involucrada en la biosíntesis de ascorbato (Wei *et al.*, 2015).

### **1.8.1. Estrés Abiótico**

Los estreses ambientales, como la sequía, la salinidad, el frío y el calor, provocan efectos adversos en el crecimiento de las plantas y la productividad de los cultivos. El estrés abiótico es la causa principal de la pérdida de cultivos en todo el mundo, lo que reduce el rendimiento promedio de la mayoría de las principales plantas de cultivo en más del 50 %. Entre los factores abióticos que han dado forma y siguen dando forma a la evolución de las plantas, la disponibilidad de agua es el más importante (Mahalingam & Karthikeyan, 2017).

El estrés hídrico en su sentido más amplio abarca tanto la sequía como el estrés salino. La sequía y la salinidad se están extendiendo particularmente en muchas regiones y pueden causar una grave salinización de más del 50 % de todas las tierras cultivables para el año 2050 (Bray *et al.*, 2000). La sequía y el estrés salino, junto con las bajas temperaturas, son los principales problemas para la agricultura, porque estos factores ambientales adversos impiden a las plantas realizar todo su potencial genético.

El estrés abiótico conduce a una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan negativamente el crecimiento y la productividad de las plantas (Wang *et al.*, 2001). La sequía, la salinidad, las temperaturas extremas y el estrés oxidativo a menudo están interconectados y pueden inducir un daño celular similar. Estos estímulos tan complejos poseen muchos atributos diferentes pero relacionados, cada uno de los cuales puede proporcionar a la célula vegetal información muy diferente. Por ejemplo, las bajas temperaturas pueden provocar inmediatamente restricciones mecánicas, cambios en las actividades de las macromoléculas y una reducción del potencial osmótico en el medio celular (Xiong *et al.*, 2002).

### **1.8.2. Estrés Salino**

El estrés salino interrumpe la homeostasis osmótica en el potencial hídrico y la distribución de iones como es el caso de potasio y sodio. Esta interrupción de la homeostasis se produce tanto a nivel celular como a nivel de toda la planta. Los cambios drásticos en la homeostasis de los iones y el agua provocan daños moleculares, detención del crecimiento e incluso la muerte. Para lograr la tolerancia a la sal, son importantes tres aspectos interconectados de las actividades de la planta. En primer lugar, se debe prevenir o aliviar el daño. En segundo lugar, deben restablecerse las condiciones homeostáticas en el nuevo entorno estresante. En tercer lugar, el crecimiento debe reanudarse, aunque a un ritmo reducido (Zhu, 2001).

La mayoría de los estudios sobre la señalización del estrés hídrico se han centrado principalmente en el estrés salino porque las respuestas de las plantas a la sal y la sequía están estrechamente relacionadas y los mecanismos se superponen (Zhu, 2002). Las vacuolas de las plantas constituyen entre el 40 y 90% del volumen intracelular total de una célula vegetal madura y, junto con el citosol, generan la turgencia celular responsable del crecimiento y la rigidez de la planta (Zhu, 2002).

El potasio ( $K^+$ ) juega un papel igualmente crucial en la turgencia celular y en la respuesta de las plantas frente a condiciones de estrés como la salinidad y la sequía. La actividad de las bombas de  $H^+$  vacuolares está estrechamente vinculada al transporte de  $K^+$  en las células vegetales. La acumulación de  $K^+$  en la vacuola contribuye significativamente al mantenimiento de la presión de turgencia, ya que este ion es un soluto principal en la vacuola, y su concentración afecta directamente el balance osmótico (Marschner, 2012).

En presencia de NaCl, la planta necesita gestionar tanto la acumulación de  $Na^+$  como la de  $K^+$ , ya que un exceso de sodio puede ser tóxico. El  $K^+$  no solo ayuda a mantener la homeostasis osmótica, sino que también compensa los efectos tóxicos del  $Na^+$  al mantener una mayor proporción de  $K^+$  en la célula, lo que es esencial para el funcionamiento de procesos metabólicos clave, como la síntesis de proteínas y la actividad de las enzimas (Zhu, 2003). De hecho, la presencia de  $K^+$  en la vacuola y su implicación en el gradiente de  $H^+$  facilita el secuestro de  $Na^+$  en esta misma organela, reduciendo la toxicidad de este ion y promoviendo la tolerancia a la sal.

Por lo tanto, la regulación de los transportadores de  $K^+$ , como las bombas  $H^+-K^+$ , es crucial para la adaptación de las plantas a ambientes salinos o secos. Estas bombas permiten el intercambio de  $H^+$  y  $K^+$ , regulando el pH y el contenido de  $K^+$  en las vacuolas, lo que a su vez influye en la capacidad de la planta para mantener su turgencia y su balance hídrico (Szczerba *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que la sequía, la salinidad y el frío inducen la entrada transitoria de  $Ca^{2+}$  en el citoplasma celular derivado de la afluencia desde el espacio apoplástico o de la liberación de las reservas internas. Los canales responsables de la entrada de  $Ca^{2+}$  representan un tipo de sensor de las señales de estrés. La liberación interna de  $Ca^{2+}$  está controlada por canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a ligandos. Estos ligandos son segundos mensajeros. Una característica importante del papel del  $Ca^{2+}$  como señal es la presencia de picos transitorios de  $Ca^{2+}$  repetitivos. Estos picos transitorios pueden ser generados por

moléculas señalizadoras como el ABA, que se producen como resultado de cascadas de señales tempranas de  $\text{Ca}^{2+}$  (Kudla & Hoffman, 2010).

### **1.8.3. El papel de la melatonina en situaciones de estrés salino**

El estrés inducido por la salinidad se considera ampliamente como el principal factor limitante del desarrollo óptimo de las plantas. Los efectos positivos de la melatonina en la modulación de los estreses abióticos han llevado a que se haga referencia a esta hormona como un regulador del crecimiento dentro del reino vegetal (Arnao & Hernández-Ruiz, 2015; Al-Huqail *et al.*, 2020; Bose & Howlader, 2020; Siddiqui *et al.*, 2020). Algunos estudios han mostrado cómo la melatonina protege contra los efectos negativos del estrés salino.

En una investigación realizada en fenogreco se utilizaron como tratamientos diferentes cantidades de melatonina (30, 60 y 90  $\mu\text{M}$ ), y se indujo al estrés por salinidad aplicando 150 mM y 300 mM de NaCl (Mohamadi *et al.*, 2022). Los resultados de estos estudios mostraron que la aplicación de diferentes niveles de melatonina a las plantas de fenogreco tratadas con salinidad previno efectivamente la degradación de clorofila a, clorofila b, clorofila total y contenido de carotenoides, en comparación con el tratamiento de salinidad sin aplicación de melatonina.

Además, se le atribuye a esta molécula que aumenta la biosíntesis de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, ajustando así el contenido de especies reactivas de oxígeno, radicales libres, fuga de electrolitos y contenido de malondialdehído. En dicho estudio también se observó que la aplicación de melatonina aumentó la actividad de los canales que transportan potasio, lo que condujo al mantenimiento de la homeostasis iónica y aumentó el contenido de agua intracelular bajo estrés por salinidad.

Otra función de la melatonina antes el estrés salino es que activa las vías de señalización de defensa en la misma planta fenogreco a través de las vías dependientes del óxido nítrico, la auxina y el ABA. La melatonina, de manera similar, aumenta la expresión de genes involucrados en la vía de biosíntesis de diosgenina, una sapogenina esteroidea muy importante en las industrias médica y alimentaria (McAnuff *et al.*, 2005; Wani & Kumar, 2018).

Cuando se acoplaron estrés de salinidad de 150 mM y melatonina de 60  $\mu\text{M}$ , la concentración de diosgenina aumentó en más de cinco veces, en comparación con la condición de control. Por ello, estos autores sugirieron que la melatonina mejora la tolerancia de las plantas al estrés por salinidad a través de estimular cambios bioquímicos y fisiológicos en éstas (Mohamadi *et al.*, 2022). En conjunto, estos resultados evidencian el potencial de la

melatonina como un regulador clave de la respuesta al estrés abiótico en plantas, al inducir cambios en la producción de metabolitos secundarios que no solo mejoran la tolerancia al estrés salino, sino que también contribuyen al mantenimiento de la homeostasis celular y la integridad estructural bajo condiciones adversas

### **1.9. Efectos de la aplicación exógena de melatonina en el transporte de sodio y potasio en plantas**

El potasio es un ion esencial en las plantas, ya que regula la turgencia celular, el pH intracelular, y la activación de diversas enzimas. El transporte adecuado de  $K^+$  es especialmente importante durante el estrés salino, cuando las plantas a menudo experimentan una disminución en la absorción de potasio debido a la competencia con el sodio. La melatonina ha mostrado efectos beneficiosos sobre el transporte de  $K^+$ , ayudando a las plantas a mantener la concentración adecuada de este ion a pesar del exceso de  $Na^+$  (Zhao et al., 2020)

El sodio es un ion que, aunque no esencial para la mayoría de las plantas, puede convertirse en tóxico cuando se acumula en exceso bajo condiciones de estrés salino. La melatonina exógena ha demostrado influir en el transporte de  $Na^+$ , contribuyendo a la regulación de su acumulación y su expulsión de las células vegetales. Gong et al. (2020) informaron que la aplicación de melatonina mejora la actividad de los transportadores de sodio, como SOS1 (Sensibilidad Excesiva al Sal 1), que está involucrado en la expulsión de  $Na^+$  de las células. Este proceso es crucial para reducir los efectos tóxicos del sodio y para preservar el equilibrio iónico

En un estudio realizado por Pen-Li y colaboradores en *Limonium bicolor*, se demostró que la melatonina aplicada de manera exógena aumenta significativamente la tasa de secreción de sal de las glándulas salinas (Pen-Li et al., 2020). Estudios previos han indicado que los transportadores de iones y las proteínas de transporte vesicular están involucradas en la secreción de sal de las glándulas salinas (Ding et al., 2010).

En cuanto a los niveles de expresión de los genes relacionados con el transporte de iones, Sensibilidad Excesiva al Sal 1 (SOS1), ATPasa de  $H^+$  de la Membrana Plasmática (PMA), Transportador de Alta Afinidad para  $K^+$  1 (HKT1), e Intercambiador de Sodio/Hidrógeno 1 (NHX1), nombrados así respectivamente por sus siglas en inglés, aumentaron su expresión después de la aplicación de melatonina exógena. SOS1, HKT1 y NHX1 son importantes proteínas de transporte de iones en las plantas. La PMA puede proporcionar la energía necesaria para el funcionamiento de SOS1, y su nivel de expresión está positivamente

correlacionado con la tolerancia de las plantas al estrés salino. Un mayor nivel de expresión de la PMA está asociado con una mejor tolerancia de las plantas al estrés salino, lo que sugiere que la melatonina, al aumentar la expresión de genes relacionados con el transporte iónico (como PMA), podría mejorar la capacidad de las plantas para enfrentar el estrés salino (Gong *et al.*, 2020).

Según Chen *et al.* (2013), la melatonina exógena puede mejorar la actividad de los transportadores de potasio, como el HKT1, que es responsable del transporte de potasio a través de la membrana plasmática. En condiciones de estrés salino, la melatonina aumenta la expresión de este transportador, lo que facilita la absorción de  $K^+$  en las células y contribuye a la regulación osmótica y la homeostasis iónica.

Además, estudios realizados por Zhao *et al.* (2020) han demostrado que la melatonina puede mejorar la eficiencia del intercambio iónico entre  $Na^+$  y  $K^+$ , lo que permite a las plantas mantener una alta concentración de  $K^+$  a pesar de la alta concentración de  $Na^+$  en el entorno. Este efecto es crucial para mitigar los efectos adversos del estrés salino, ya que el  $K^+$  es vital para la función celular y la respuesta a estrés abiótico.

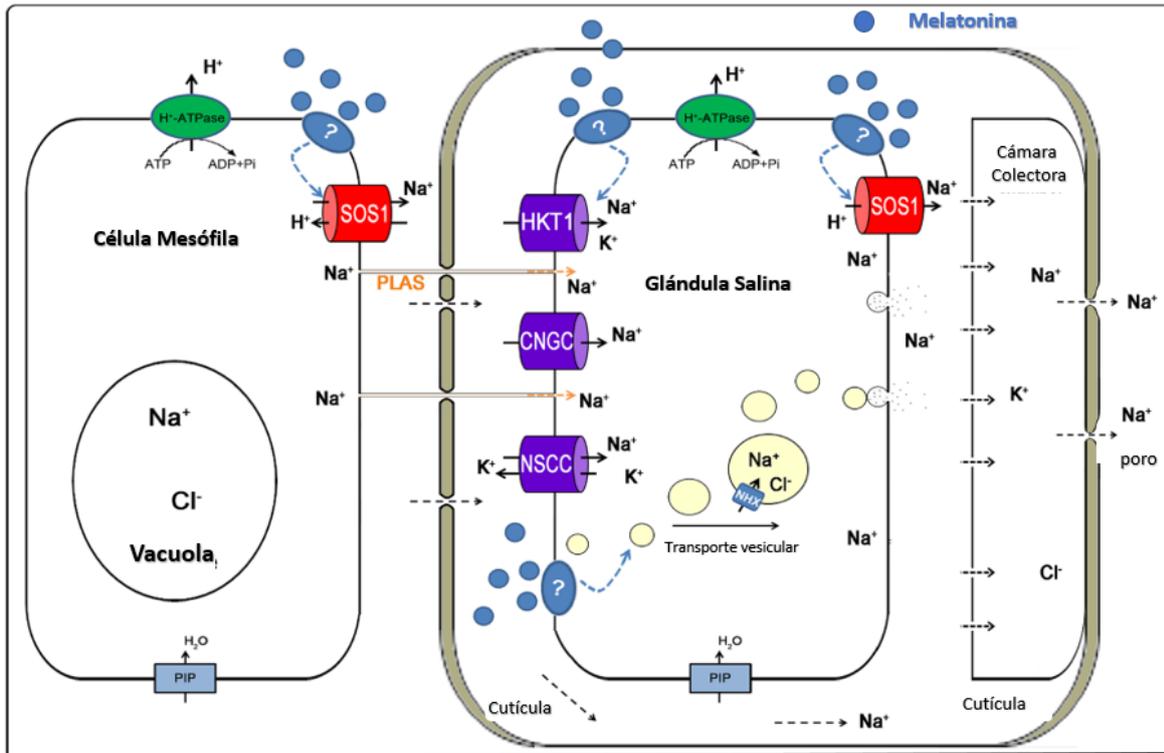
La aplicación exógena de melatonina altera la expresión de varios genes clave que regulan el transporte de iones en plantas. Algunos de estos genes incluyen SOS1, PMA, HKT1, y NHX1, que son responsables de regular los niveles de sodio y potasio dentro y fuera de las células vegetales. Estos transportadores juegan un papel crucial en la homeostasis iónica y la tolerancia al estrés salino.

Hernández-Ruiz & Arnao (2019) encontraron que la melatonina aumenta la expresión de estos genes en las plantas tratadas, lo que resulta en una mayor eficiencia en el transporte iónico y una mejor capacidad para manejar la acumulación de  $Na^+$ . La melatonina también modula la actividad de la bomba de protones vacuolar (PMA), proporcionando la energía necesaria para el funcionamiento de otros transportadores iónicos. Esta energía es crucial para mantener el equilibrio de iones y la turgencia celular, especialmente en condiciones de estrés salino.

Liu y colaboradores en el año 2015 mostraron que la melatonina exógena puede regular al alza la expresión de genes que codifican importantes transportadores de  $Na^+$  y que actúan en la desintoxicación bajo estrés salino. Recientemente, los estudios han indicado que la aplicación exógena de melatonina puede mejorar la homeostasis iónica de las plantas bajo estrés salino al aumentar la expresión de genes que codifican NHX, SOS y otros.

Estos resultados sugirieron que la melatonina puede aumentar la expresión de genes que codifican transportadores de iones y proteínas de transporte de vesículas para mejorar la secreción de sal por las glándulas salinas. Se sugiere que el mecanismo ocurre de la siguiente manera: primero un aumento en la expresión de genes que codifican transportadores de iones y proteínas de transporte de vesículas, inducida por la melatonina, posteriormente estas transportan iones hasta las glándulas, los cuales son conducidos a la cámara colectora adyacente al poro secretor a través del transporte de vesículas y transportadores y desde aquí son secretados. De esta forma se mantienen la homeostasis iónica en las células y alivian la inhibición del crecimiento inducida por NaCl (**Figura 1.6**). En este estudio, los autores establecieron que la aplicación exógena de melatonina aliviaba la inhibición del crecimiento de *Limonium bicolor*, causada por el tratamiento con 300 mM de NaCl. Este es el primer informe de este fenómeno en una halófito. Dado que incluso las halófitas no pueden tolerar grandes cantidades de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en su citoplasma, compartimentalizan el exceso de iones en vacuolas o transportan los mismos a diferentes tejidos para mantener la homeostasis iónica citoplasmática (Han *et al.*, 2019). Se planteó que *Limonium bicolor* puede secretar sales de desecho a través de sus glándulas salinas, lo que reduce su contenido de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> y aumenta el de K<sup>+</sup>, provocando así un aumento de la relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> en las hojas y una promoción en la tolerancia a la sal (Yuan *et al.*, 2016).

La tasa de secreción de sal de las hojas va a depender de la densidad y la función de las glándulas salinas. En esta investigación se demostró que la densidad de las glándulas salinas de *Limonium bicolor* aumentaba significativamente bajo el estrés salino, independientemente al tratamiento con melatonina y al tratamiento combinado de sal y melatonina (Yuan *et al.*, 2019).



**Figura 1.6. La posible ruta de la melatonina que actúa en el transporte de potasio y sodio** (Modificado sobre la base de Peng Li *et al.*, 2020)

### 1.10. Prolina

La prolina es un aminoácido útil para soportar diferentes estreses en las plantas. En plantas superiores, el glutamato a través de la actividad de la prolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS) y la ornitina a través de la Ornitina aminotransferasa (OAT) son precursores de la biosíntesis de prolina (Ruiz *et al.*, 2002; Verbruggen y Hermans, 2008). La prolina, utilizada como osmoprotector, ejerce una función de control para la estabilidad de la enzima eliminadora de ROS, la superóxido dismutasa (SOD). Además, la prolina presenta una actividad depuradora directa de ROS, que es esencial para inducir la tolerancia a Cl<sup>-</sup>, al mantener la integridad de la membrana (Aghdam y Bodbodak, 2013).

Si bien se sabe que P5CS y OAT participan en la biosíntesis de prolina, otra enzima juega un papel fundamental en la degradación de este aminoácido llamada prolina deshidrogenasa (PDH). Los estudios previos sobre el níspero (Cao *et al.*, 2012) y melocotón (Shang *et al.*, 2011) confirmaron que el metabolismo de la prolina contribuyó a la reducción del estrés por frío en las condiciones de almacenamiento. De manera similar en hallazgos más recientes en bananos, se exhibieron actividades de P5CS y OAT más altas, y actividades de PDH más bajas, conduciendo a la acumulación de prolina en este cultivo, tratado con NO (Wang *et al.*, 2013).

La OAT juega un papel importante en la síntesis de prolina en frutas bajo condiciones de estrés, mediante la regulación coordinada de las enzimas P5CS (prolin-5-carboxilato sintetasa), OAT y PDH. La expresión aumentada de PpP5CS y PpOAT, junto con la inhibición de la actividad y expresión de PpPDH, favoreció la acumulación de prolina en las frutas. Este proceso contribuye a la adaptación de las frutas al estrés, mejorando su capacidad para manejar condiciones adversas.

#### **1.10.1. Efectos de la melatonina sobre la síntesis de prolina**

En investigaciones recientes en pepino (*Cucumis sativus*) se han descrito expresiones relativas más altas de los genes CsP5CS y CsOAT (Cs es el prefijo que se utiliza para denotar genes de la planta *Cucumis sativus*) y con un menor nivel de expresión de los genes CsPDH. En duraznos almacenados en condiciones de frío, la aplicación de melatonina indujo la acumulación de prolina (Cao *et al.*, 2016).

Otro estudio realizado en pepino mostró que la melatonina indujo una cantidad significativa de tolerancia al estrés por frío a través de la coordinación de P5CS, OAT y PDH, con una acumulación de prolina. Por lo tanto, se plantea que genera una inducción de la resistencia a la lesión en el pepino de almacenamiento en frío. A partir de los resultados anteriores, el aumento de la tasa de síntesis de prolina y la reducción de la tasa de degradación se correlacionaron con un mayor contenido de prolina en la fruta tratada con melatonina, lo que podría desempeñar un papel esencial en la tolerancia al frío regulada por melatonina en la fruta de pepino por citar un ejemplo, durante el almacenamiento.

#### **1.11. Chile habanero como planta en estudio**

El chile habanero tiene denominación de origen desde 2010 como chile habanero de la península de Yucatán y pertenece a la especie *Capsicum*, del cual existen cinco especies, *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense*, *Capsicum accatum* y *Capsicum ubescens*. El chile habanero es el fruto perteneciente a la especie *Capsicum chinense* Jaq., una variedad muy aromática y que se afirma que es de los chiles más picante del mundo por todos sus derivados (Menichini *et al.*, 2009) (**Figura 1.7**).

Esta especie se puede localizar en América Central y del Sur, principalmente en climas tropicales húmedos. Es una planta herbácea que puede alcanzar un tamaño de hasta 2,5 m de altura. El arbusto tiene hasta seis frutos por axila y su forma varía de redonda a oblonga. El tamaño medio de los frutos varía de 2 a 3 cm de ancho, de 3 a 5 cm de largo, con un

espesor del pericarpio de 3 a 5 mm, y son extremadamente picantes y aromáticos (Hernández & Solís, 2015).

Las semillas son lisas, ovaladas y pequeñas (1 a 2 mm), de color marrón y su período de germinación varía entre 8 y 15 días (Cisneros-Pineda *et al.*, 2007; González Estrada *et al.*, 2018). Aunque el principal atributo de los chiles es la acritud que resulta de la presencia de capsaicinoides, también son muy apreciados como una excelente fuente de pigmentos naturales y compuestos antioxidantes (de Sá Mandes y Castello Branco de Andrade Gonçalve, 2020).

El color del chile puede variar de verde, amarillo o blanco (para el fruto inmaduro), también puede presentar un color naranja cuando está semimaduro, y se vuelve rojo, rojo oscuro, marrón y, a veces, casi negro en la etapa madura. Estos colores se originan de los carotenoides producidos en la fruta durante sus etapas de maduración. Una vez que se cosechan los frutos, no pueden madurar y ya no cambian de color, pero pueden ocurrir cambios en el aroma, el sabor y la actividad antioxidante (Giuffrida *et al.*, 2013; Manikharda *et al.*, 2018).

Por otro lado, el chile habanero tiene una vida de anaquel corta entre 10 y 20 días, por lo que existe un gran interés en su conservación por un período mayor debido a sus propiedades bien identificadas. En este punto, existen diversos métodos utilizados para su conservación, de los cuales el proceso de secado ha sido reconocido como el más utilizado. Aunque el chile se consume principalmente en forma fresca, potencialmente puede someterse a un proceso de secado y luego usarse en salsas, polvos y conservas (Pérez, 2018).



**Figura 1.7.** *Capsicum chinense* Jaq., chile habanero

### 1.11.1. Variedades de chile habanero en México

Por primera vez, seis de las ocho variedades de chile habanero desarrolladas por los expertos del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) han sido incluidas en el catálogo nacional de variedades vegetales. Estas semillas certificadas corresponden a las variedades Mayan Ba'alché, Mayan Ek, Mayan Kauil, Mayan Kisin, Mayan Chan y Mayan K'iin (**Figura 1.8**), y están diseñadas para diversos usos comerciales, como en la industria alimentaria, farmacológica, cosmética e incluso militar (CICY, 2019).

Esta iniciativa busca mejorar la calidad del chile habanero, además de posicionarlo de manera más competitiva tanto en el mercado nacional como internacional, atendiendo la creciente demanda en países como Inglaterra, Japón, Tailandia, Estados Unidos y la Unión Europea. Gracias a esta planta de alto valor tecnológico, se espera incrementar el precio del producto, lo que facilitaría una transición del sector agrícola al industrial, según indicó un funcionario local.

Se proyecta que la venta de estas semillas mejoradas genere ingresos anuales para el estado de al menos siete millones de pesos, con una tendencia creciente durante la próxima década, sin contar los ingresos derivados de la venta de residuos y del fruto fresco. Además, el impacto económico en la cadena productiva, especialmente en los eslabones secundarios, se estima en más de 650 millones de pesos anuales, provenientes tanto de ventas nacionales como internacionales (CICY, 2019).



**Figura 1.8.** Variedades de chile habanero en México por el CICY (2019)

## JUSTIFICACIÓN

La salinización de los suelos es un problema cada vez más frecuente en el medio ambiente, de ahí la importancia de descubrir un mecanismo para rebatir su efecto de forma natural. Es por tal motivo que se ha planteado el uso de melatonina como una estrategia exógena para ayudar en el restablecimiento de cultivos ante el estrés salino. Este compuesto, conocido por sus propiedades antioxidantes y reguladoras, podría mejorar la tolerancia de plantas como el chile habanero (*Capsicum chinense*), un cultivo de alto valor comercial para México (Arnao & Hernández-Ruiz, 2007; Zhao *et al.*, 2019). En este contexto, se investigó si la melatonina aplicada de manera exógena facilita el restablecimiento de cultivos de chile habanero, tomando como referencia el transporte intracelular de potasio y sodio, dos iones clave involucrados en la respuesta a salinidad (Munns & Tester, 2008). Además, se evaluarán los contenidos de prolina como marcador bioquímico de estrés (Szabados & Saviouré, 2010), así como la modificación de los contenidos totales de proteínas en células de dicha planta. Los resultados que este estudio arroje servirán para enriquecer aún más el cúmulo de información ya existente sobre esta versátil molécula, con el fin de aplicar sus beneficios al mejoramiento

## HIPÓTESIS

- La melatonina exógena modifica los niveles de prolina y el contenido de potasio y sodio en plántulas de chile habanero bajo condiciones de estrés salino.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Dilucidar el efecto de la melatonina en el contenido de potasio y sodio, además de los contenidos de prolina, en células de plantas de chile habanero sometidos a diferentes concentraciones de NaCl.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar el efecto de la aplicación foliar de diferentes concentraciones de melatonina en el crecimiento de plántulas de chile habanero cultivadas en hidroponía.
2. Determinar las modificaciones en el contenido de potasio y sodio en raíces y hojas de plantas de chile habanero tratadas con melatonina, y en condiciones de estrés salino, así como las variaciones de los contenidos de prolina.
3. Determinar los niveles de algunos de los genes involucrados en el metabolismo de la prolina en presencia de NaCl.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

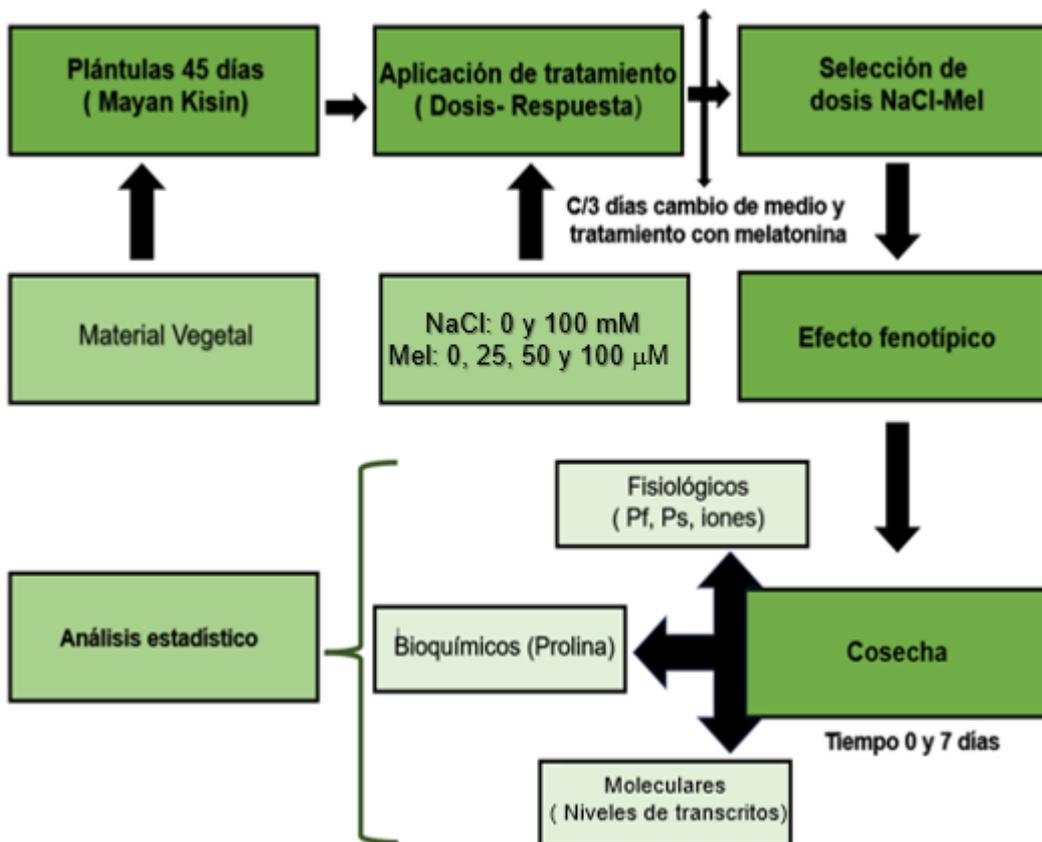


Figura 1.9. Estrategia experimental

## **CAPÍTULO II**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1. Material vegetal**

Para este estudio se utilizaron plántulas de chile habanero de la variedad Mayan Kisín, que fueron obtenidas y donadas por el CICY.

#### **2.2. Germinación y condiciones de crecimiento**

Las semillas de la variedad Kisin se agitaron con etanol al 80 % (v/v) por 5 min y se realizaron lavados repetitivos con agua estéril. Inmediatamente se incubaron con hipoclorito de sodio de la marca comercial (Cloralex, 5 % NaOCl) al 30 % (v/v) por 15 min, y nuevamente se realizaron lavados continuos. Finalmente se dejaron embebiendo con agua estéril durante 48 horas a una temperatura de 4 °C en condiciones de oscuridad. Después de un tiempo de estratificación, las semillas se incubaron en condiciones de oscuridad en cajas de Petri con papel filtro humedecido con agua estéril y se esperó hasta la aparición de la radícula.

Una vez que las semillas germinaron, estas fueron transferidas a recipientes de plástico que contenían vermiculita estéril humedecida con solución Hoagland a 1/5 (H1/5) de su fuerza iónica. Para su crecimiento, las plántulas se mantuvieron aproximadamente 45 días bajo estas condiciones y se regaron tanto con agua estéril como con la misma solución nutritiva esto a intervalos de siete días. Antes de que las plántulas fueran puestas en tratamiento con NaCl, se retiraron de la vermiculita y se lavaron con agua estéril.

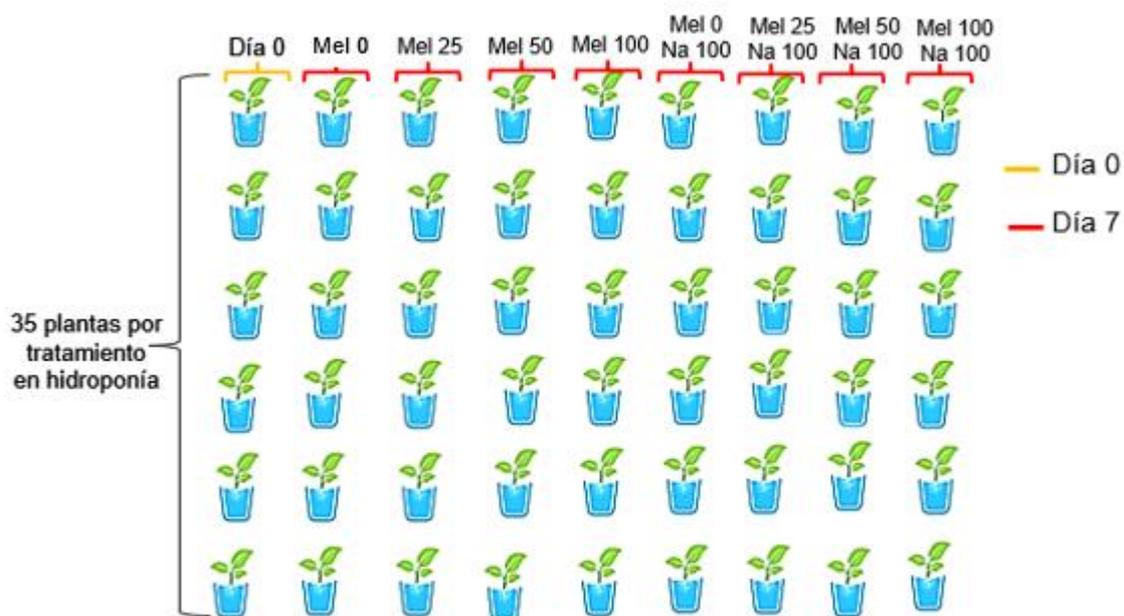
Las plántulas se mantuvieron por un periodo de 7 días en solución nutritiva para recuperarse del estrés mecánico. Las condiciones de crecimiento de las plántulas, así como los tratamientos con NaCl (100 mM) se llevaron a cabo en un cuarto de cultivo a 25 °C y un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad.

#### **2.3. Tratamientos con melatonina**

En este experimento, se evaluó el efecto de la melatonina exógena sobre plántulas de chile habanero, de la variedad mayan kisin, tratadas con NaCl (0 y 100 mM) para inducir estrés salino. Las plántulas fueron cultivadas en condiciones hidropónicas y se les aplicaron soluciones de melatonina a concentraciones de 25, 50 y 100 µM. Se utilizaron un total de 315

plántulas, distribuidas en 35 plantas por tratamiento, y se establecieron tres tiempos de evaluación: día cero, día tres y día siete, con dos cosechas en los días cero y siete.

El objetivo del experimento fue comparar las condiciones fisiológicas de las plántulas sometidas a estrés salino con y sin tratamiento de melatonina. Se observó cómo este compuesto influenció la respuesta de las plantas al estrés salino, analizando su efecto protector a lo largo del tiempo. El diseño del estudio permitió monitorear el impacto de la melatonina sobre las plantas en diferentes momentos de exposición al estrés, con el fin de determinar si esta sustancia podía mitigar los efectos negativos del NaCl en las plántulas.



**Figura 2.1.** Diseño del del tratamiento de estrés por salinidad

#### **2.4. Medición de la biomasa y parámetros de crecimiento**

Al finalizar cada periodo de evaluación, las plántulas de chile se cosecharon y se lavaron con agua estéril para eliminar el exceso de NaCl. A continuación, se determinó el peso fresco (PF) y el peso seco (PS), de la planta de raíces y hojas, así como el número de hojas.

El material cosechado para los análisis posteriores consistió en hojas y raíces de las plántulas de chile habanero, los cuales fueron conservados a -80 °C. Estos análisis incluyeron los

niveles de transcritos de genes involucrados en la síntesis y degradación de prolina y la determinación de los niveles de la misma, además de los contenidos de iones como es el caso de sodio y potasio, con el fin de evaluar los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en la respuesta al estrés salino tras la acción de la melatonina.

## **2.5. Cuantificación de sodio y potasio**

Los tejidos de hoja y raíz se pesaron y se secaron durante 72 horas en una estufa a 65 °C hasta alcanzar peso constante. Posteriormente, se tomaron 0.25 g de cada muestra, se colocaron en crisoles de porcelana y se sometieron a un proceso de calcinación, primero a 250 °C durante una hora y luego a 500 °C por tres horas adicionales.

Para la determinación del contenido de  $K^+$  y  $Na^+$  en las hojas y raíces, los tejidos fueron digeridos utilizando 5 mL de HCl al 40 % (v/v) en un crisol de porcelana sobre una placa de calentamiento. Después, se añadió 1 mL de HCl al 100 % y se llevó el volumen a 25 mL con agua desionizada. Finalmente, las concentraciones de los cationes se midieron utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica modelo 2380 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA).

## **2.6. Extracción de ARN total y síntesis de ADNc**

Se utilizaron tejidos de raíz (0.1 gr) de las plántulas de chile habanero, que se encontraban conservados a -80 °C. Para la extracción del ARN total, se utilizó la metodología del TRIZOL, se tomó 0.1 gr de tejido de raíz pulverizado en N líquido, se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se le añadió 1 ml del reactivo de TRIZOL (Invitrogen). Posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 12 000 g (10700 rpm) a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf y se le adicionó 200  $\mu$ l de cloroformo, se agitó manual y vigorosamente y se incubó por 2-3 min a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 12 000 g por 15 min a 4 °C. A la fase acuosa se le adicionó 500  $\mu$ l de isopropanol y las muestras se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Después de centrifugar a 12 000 g por 10 min a 4 °C, se lava la pastilla con 1 ml de etanol al 70 % (v/v) y se centrifugó a 7 500 g (8 500 rpm) por 5 min a 4 °C. La pastilla se dejó secar de 60 a 120 min. El ARN total se resuspendió en 30-50  $\mu$ l de agua con DEPC (dietilpirocarbonato) estéril.

Para evitar posibles contaminaciones con ADN genómico, el ARN total se trató con Turbo DNAsa (2U/  $\mu$ l) (Invitrogen) a 37 °C por 1hr y la reacción se detuvo a 65 °C por 30 min. Para la cuantificación las muestras de ARN de cada tratamiento, los extractos se leyeron a 260 nm

en el equipo NANODROP 2000 (Thermo SCIENTIFIC). La integridad del ARN se evaluó por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % (p/v), teñido con bromuro de etidio. Posteriormente, se procedió a realizar la síntesis de la primera cadena de ADNc mediante transcripción reversa. Cada reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl, el cual contenía 1 µg/ul de ARN, 1 ul de oligo dT (25 µM) y 1 ul de dNTP'S (10 mM).

La mezcla se homogenizó e incubó a 65 °C durante 5 min, colocándose posteriormente a 4 °C durante 3 min. Para la reacción se adicionaron 4 ul del amortiguador 5X de la enzima Superscrip III (Invitrogen), 2 µl de DTT (0.1M) y 1 µl de ARNsa aout (400 U/µl) (Invitrogen); seguidamente se homogenizó y se incubó a 42 °C durante 5 min. Por último, a la mezcla se le adicionó 1 ul de la enzima Superscrip III (Invitrogen) y se dejó reaccionar a 42 °C durante 50 min. Para detener la reacción, la mezcla se incubó a 70 °C durante 15 min.

## **2.7. Expresión semicuantitativa de CCP5CS, CCP5CR y CCPDH en plantas de chile habanero sometidas o no al estrés por NaCl**

Una vez obtenida la primera cadena de ADNc se procedió a evaluar los niveles de transcritos de CcP5CS, CcP5CR y CCPDH presentes en las raíces de las plantas sometidas al tratamiento con 50 y 100 mM de NaCl, a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos sintetizados previamente, los cuales fueron diseñados con base a la secuencia de ADNc de CcP5CS, CcP5CR y CCPDH.

La secuencia de los cebadores para CCP5CS es: F\_359: 5' GTCAGCGGCTTCGATATAGG 3' y R\_856: 5' ATACCCCCTCTTCCCACTCT 3' (**Tabla 2**). La mezcla de reacción contiene 2.5 µl del amortiguador de la reacción 10X; 1 µl de dNTP (10 mM); 1 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 2 ul del oligo F\_359(10 µM); 2 µl del oligo R\_856 (10 µM); 1 µl de la enzima Taq. Platinum (5 U/µl) (Invitrogen); 1 µl de ADNC.

Para CCP5CR, la secuencia de los cebadores es: F\_312: 5' CAGGTGGTTGAAGATAGTGA 3' y R 615: 5' GCATCAAACAGCTTCTCATC 3'.

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

**Tabla 2.** Posición de los cebadores para PCR sintetizados para CcP5CS, CcP5CR y CcPDH, El tamaño de los cebadores fue de 20 pb (Escalante-Magaña, 2020)

La mezcla de reacción se preparó con 2.5 µl del amortiguador de la reacción 10X; 1 µl de dNTP's (10 mM); 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 2 µl del cebador F\_312 (10 mM); 2 µl del cebador R\_615 (10 mM); 0.2 µl de la enzima Taq Platinum (5 U/µl) (Invitrogen); 1 µl de ADNC. El PCR para CCP5CS y CcP5CR se realizó de acuerdo a las las siguientes condiciones: 95 °C por 1 min., 35 ciclos de 94 °C por 1 min., 54 °C por 45 seg. y 53 °C por 1 min. para P5CS y P5CR respectivamente., 72 °C por 1 min., 72 °C por 10 min.

Para CCPDH, la secuencia de los cebadores es: F\_501: 5' GTCGAACATGCCACGGAAAA 3' y R\_1355: 5' ACTTGCTCACTTGAAATCCT 3'. La mezcla de reacción se preparó con 2.5 µl del amortiguador de la reacción 10X; 1 µl de dNTP's (10 mM); 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 2 µl del cebador F\_501 (10 mM); 2 µl del cebador R\_1355 (10 mM); 0.2 µl de la enzima Taq Platinum (5 U/µl) (Invitrogen); 1 µl de ADNC. Las condiciones de la PCR fueron las siguiente: 95 °C por 2 min., 35 ciclos de 95 °C por 45 seg., 53.5 °C por 30 seg., 72 °C por 25 seg., 72 °C por 5 min.

Todas las PCR's se desarrollaron en un termociclador My Cycler (BIO-RAD). Para visualizar los posibles fragmentos amplificados por PCR, las muestras respectivas se fraccionarán en un gel de agarosa al 1 % en 50 ml de TAE 1 X, adicionado con 1.3 µl de bromuro de etidio. Como testigo de carga, se amplificó el gen de la tubulina. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95 °C por 1.5 min., 35 ciclos de 94 °C por 30 seg., 50 °C por 30 seg., 75 °C por 30 seg., 72 °C por 10 min.

## 2.9. Determinación del contenido de Pro en raíces y hojas

Para determinar el contenido de prolina se siguió la metodología descrita por Bates *et al.* (1973) modificada (Escalante-Magaña, 2020). El material vegetal de raíz (0.2 g de peso fresco) y hoja (0.1 gr de peso fresco) se maceró y se homogenizó con 1 ml (1.5 ml para raíz) de ácido sulfosalicílico (3 %, v/v). Posteriormente los extractos se colectaron y se centrifugaron a 14,600 x g (13,000 rpm) por 10 min. En un tubo nuevo se adicionó 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., y posteriormente se colocaron 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 se agitó vigorosamente por un tiempo de 20 segundos. y se esperó hasta la separación de las fases orgánica y acuosa. En una cubeta de cuarzo se colecta la fase orgánica que contiene al cromóforo y se realiza la lectura a una absorbancia a 520 nm en el espectrofotómetro Genesis Uv 10. Se usó tolueno como blanco. La concentración de prolina se determinó a partir de una curva de concentración estándar y se calculó con base al peso fresco (usualmente expresado como µg por gramo o µmol por gramo de peso fresco, respectivamente) de donde se partió.

La fórmula descrita por Bate en 1973 para calcular la concentración de prolina a través de la absorbancia se basa en la medición de la absorbancia de una muestra a una longitud de onda específica en el espectrofotómetro. La metodología se usa en bioquímica y análisis de proteínas, donde la prolina se cuantifica usando una reacción colorimétrica.

Según Bate (1973), el cálculo de la concentración de prolina se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de prolina } (\mu\text{g/ml}) = \frac{(A_{\{\lambda\}} - A_{\{blank\}})}{(\epsilon \cdot b)}$$

Donde  $A_{\{\lambda\}}$  es la absorbancia medida de la muestra a la longitud de onda específica (generalmente 520 nm si se usa el reactivo colorimétrico de ninhidrina),  $A_{\{blank\}}$  es la absorbancia del blanco o control,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar de la prolina a esa longitud de onda, que depende del reactivo utilizado (en el caso de la ninhidrina es un valor conocido y específico para la prolina) y  $b$  es el grosor de la cubeta o celda en centímetros, en la que se mide la absorbancia (típicamente 1 cm).

## **2.10. Análisis estadístico**

Los datos correspondientes a los parámetros fisiológicos y bioquímicos se evaluaron mediante ANOVAS de una sola vía (Sigma plot, versión 14). Posteriormente, los valores medios se compararon por cada condición de tratamiento, la comparación se realizará aplicando una prueba de rango múltiple de Tukey ( $P < 0.05$ ).

## CAPÍTULO III

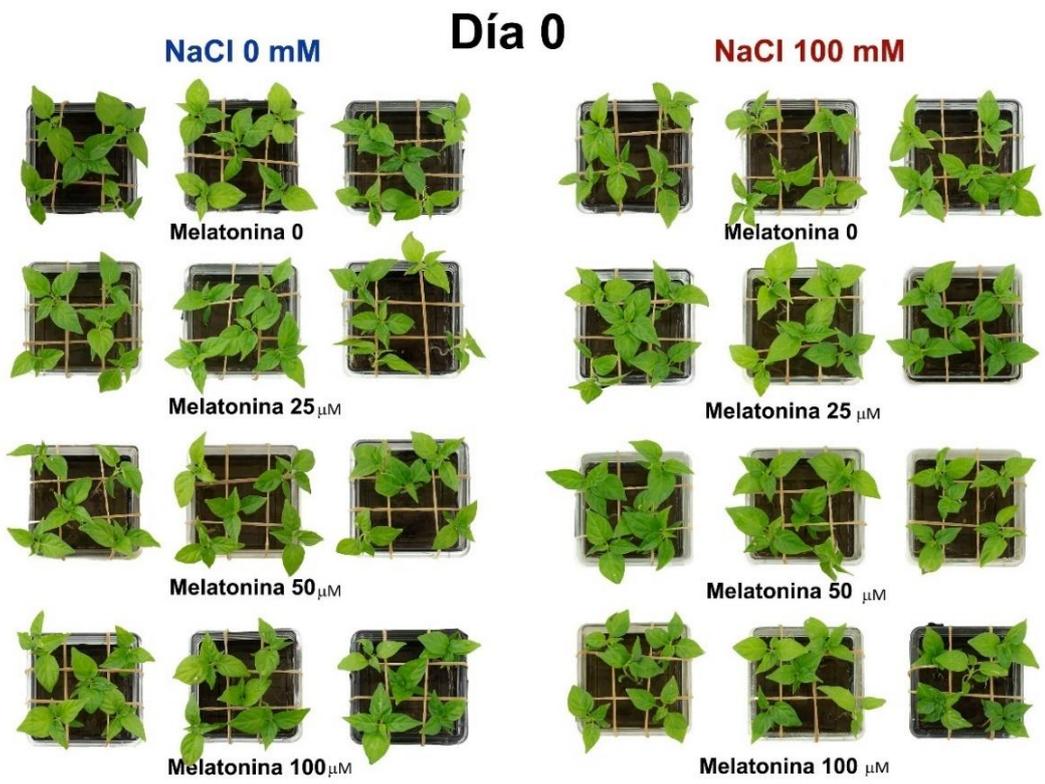
### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A través de este capítulo, se busca ofrecer un enfoque integral sobre los efectos de la melatonina en la fisiología de las plantas, con especial énfasis en su impacto en el transporte iónico, la regulación de metabolitos esenciales para la tolerancia al estrés, y la modulación de los procesos fisiológicos bajo condiciones de estrés salino. En particular, se han medido los niveles de sodio y potasio, dos iones clave involucrados en la homeostasis iónica y la respuesta al estrés salino. Asimismo, se ha evaluado el contenido de prolina, un metabolito fundamental para la protección celular bajo condiciones adversas. Finalmente, se han analizado los niveles de transcritos de genes implicados en la síntesis y degradación de prolina, con el fin de proporcionar una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares que subyacen a la acción de la melatonina en la mejora de la tolerancia al estrés salino. Estos hallazgos podrían aportar nuevas estrategias para optimizar el manejo agrícola en entornos salinos, favoreciendo el crecimiento y desarrollo de las plantas bajo condiciones desfavorables.

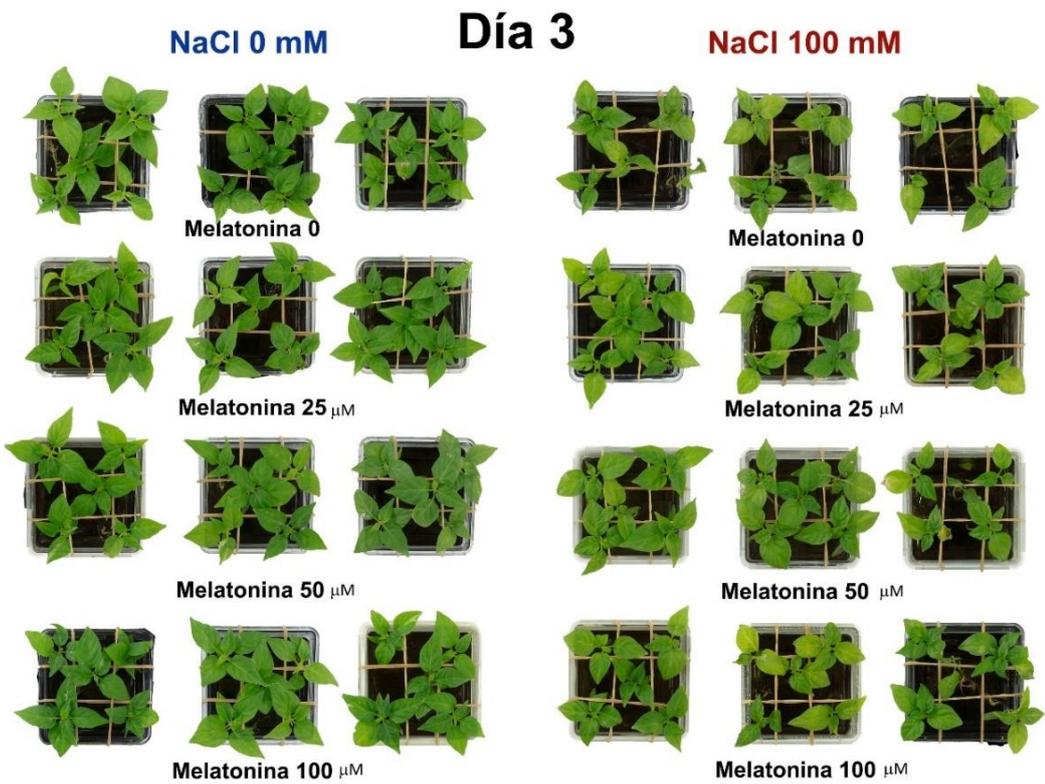
Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la melatonina podría tener un potencial interesante para mejorar la tolerancia al estrés en el chile habanero, pero se necesitan más investigaciones para determinar su eficacia en condiciones de campo y para optimizar las concentraciones y los métodos de aplicación. Como se puede observar en la **Figura 3.1**, las plántulas de chile presentan un crecimiento normal desde el día 0 hasta al día 7, mostrando un aumento en su tamaño y en el de las hojas.

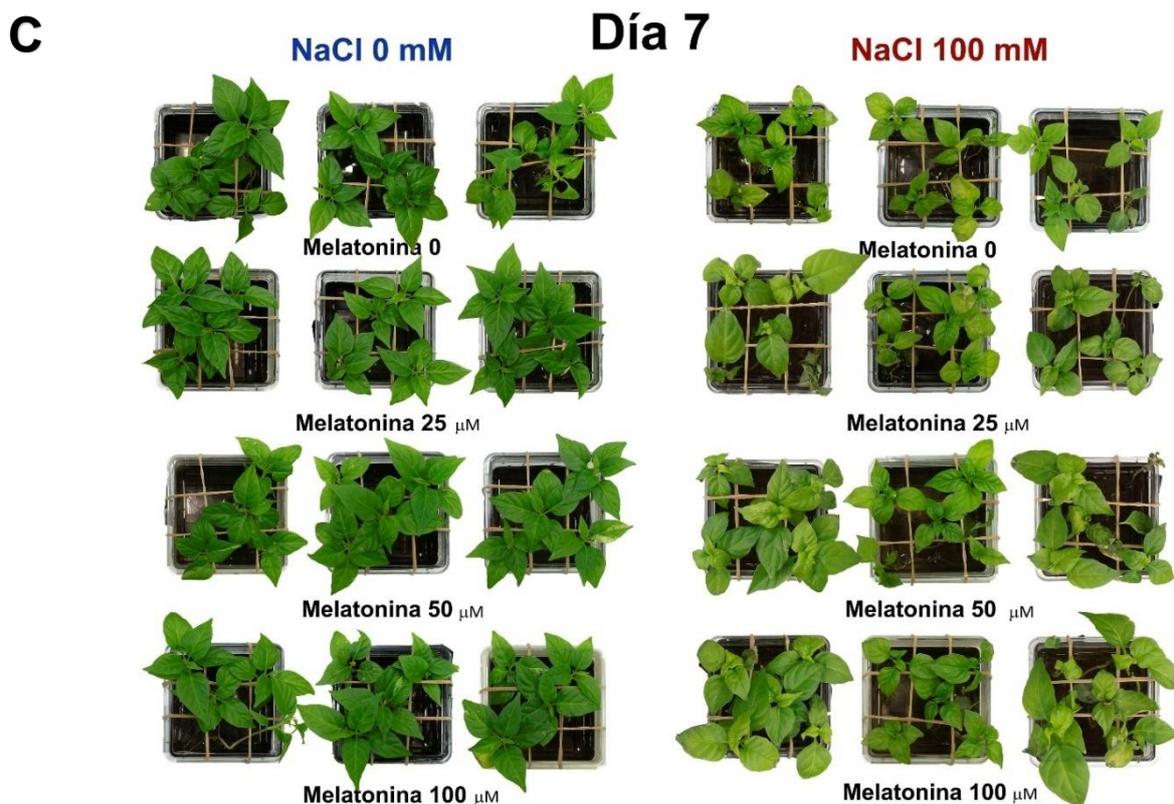
Sin embargo, en presencia de las concentraciones de melatonina, sin la aplicación de NaCl, las plantas parecen más saludables a medida que incrementa la concentración de melatonina. Por otro lado, no se logró observar a nivel fenotípico cambios drásticos con la aplicación de melatonina en la reversión de los daños causados por la salinidad, ya que la melatonina fue aplicada antes de inducir el estrés por salinidad.

**A**



**B**





**Figura 3.1.** Efecto de la melatonina (MT) a concentraciones de 0  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ , en condiciones de estrés salino (0 y 100 mM de NaCl), a los 0, 3 y 7 días de tratamiento en plántulas de chile habanero, variedad Mayan Kisin. **A.** Efecto de la MT antes de la aplicación de NaCl. **B.** Efecto de la MT después de la aplicación de NaCl al día tres. **C.** Efecto de la MT después de la aplicación de NaCl al día siete.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que las plántulas de chile habanero presentaron un crecimiento normal en condiciones controladas, lo que sugiere que la planta tiene una respuesta fisiológica adecuada en ausencia de estrés. El aumento en el tamaño y número de hojas durante los primeros siete días de observación refleja el crecimiento vegetativo típico en las plántulas de chile, lo cual es consistente con lo reportado por estudios previos sobre el desarrollo normal de plantas bajo condiciones de crecimiento óptimas (Arnao & Hernández-Ruiz, 2007). Esta observación resalta la capacidad natural de las plántulas de chile para desarrollarse sin perturbaciones ambientales en condiciones de hidroponía.

En cuanto a la aplicación de melatonina, los resultados indicaron que las plántulas parecían más saludables con concentraciones crecientes de melatonina, en ausencia de NaCl. Este hallazgo es coherente con la literatura actual que reporta que la melatonina tiene efectos positivos sobre el crecimiento y la salud de las plantas en condiciones no estresantes. Por ejemplo, Liu *et al.* (2020) encontraron que la aplicación de melatonina a concentraciones de

50  $\mu\text{M}$  favoreció el crecimiento de plantas de arroz, sugiriendo que la melatonina puede tener un efecto promotor del crecimiento bajo condiciones normales, probablemente debido a sus propiedades antioxidantes y su capacidad para modular procesos hormonales vegetales.

Sin embargo, en condiciones de estrés por salinidad, la melatonina no mostró efectos fenotípicos significativos en la prevención de los daños causados por el NaCl. Este resultado coincide con algunos estudios previos que indican que la aplicación de melatonina antes de inducir el estrés salino no siempre produce mejoras sustanciales en la tolerancia a la salinidad. Según Sezer *et al.* (2021), la melatonina aplicada de manera preventiva no pudo mitigar de forma significativa los efectos negativos de la salinidad en plantas de tomate. Esto sugiere que la melatonina puede no ser tan efectiva cuando se aplica antes de la inducción del estrés, ya que sus mecanismos de acción pueden estar más orientados a la modulación de respuestas fisiológicas durante o después de la exposición al estrés, tal como se indica en investigaciones sobre el estrés oxidativo y la regulación de iones (Zhao *et al.*, 2019).

Aunque la melatonina se ha reportado como un regulador potencial del estrés salino, el hecho de que no haya tenido un impacto notable en la prevención de los daños en este estudio sugiere que la sincronización de la aplicación de la melatonina podría ser un factor crucial para que la planta se beneficie de sus efectos. De acuerdo con Arnao y Hernández-Ruiz (2007), la melatonina actúa como un modulador de las respuestas vegetales a condiciones adversas, pero su efectividad depende de la etapa de aplicación y de la dosis utilizada, lo que puede influir en su capacidad para contrarrestar el estrés salino. Esto resalta la importancia de explorar no solo las concentraciones de melatonina, sino también el momento óptimo de su aplicación para maximizar sus efectos beneficiosos.

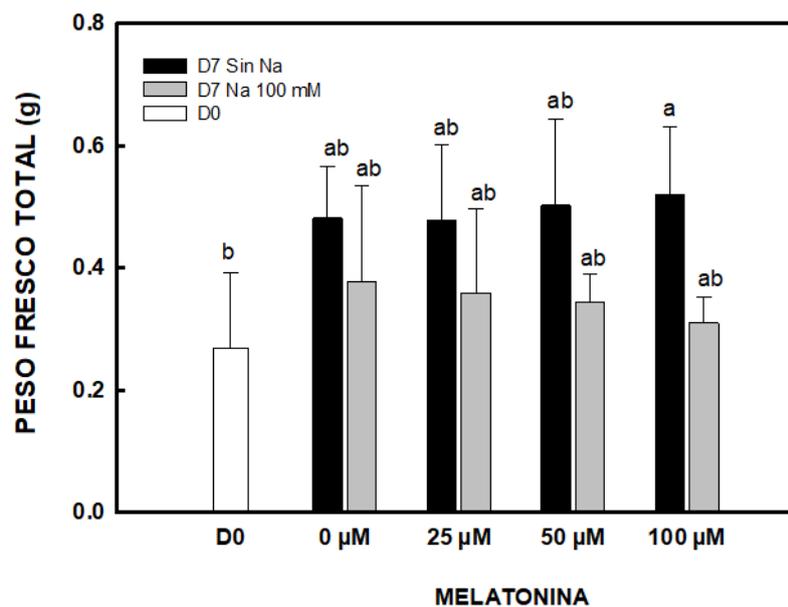
En resumen, los resultados obtenidos sugieren que la melatonina tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de las plántulas de chile habanero en condiciones normales, pero no parece ser eficaz en la mitigación de los daños inducidos por salinidad cuando se aplica preventivamente.

### **3.2. Parámetros fisiológicos**

En el experimento, se tomaron medidas de varios parámetros fisiológicos 0 y al día 7, como el peso fresco total, el número de hojas, peso fresco y peso seco de raíces y hojas. Posteriormente, se separaron los órganos en raíces, tallos y hojas para determinar su peso fresco. Además, se calculó el peso seco después de mantener las muestras durante 72 horas

en una estufa a fin de alcanzar un peso constante. Los resultados de los pesos frescos y secos se presentan en los siguientes gráficos.

En cuanto al peso fresco total, no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos y el testigo. Esto indica de manera clara que, para este parámetro, la aplicación de MT no tiene un efecto que mitigue el impacto del estrés. (Figura 3.2.1).



**Figura 3.2.1.** Peso fresco total. Efecto de la aplicación de MT a concentraciones de 0, 25, 50 y 100 μM, en condiciones de estrés salino (0 y 100 mM de NaCl), a los 0 y 7 días de tratamiento en plántulas de chile habanero variedad Mayan Kisin. Las plántulas fueron asperjadas con MT antes de la aplicación del estrés.

Estos resultados coinciden con algunos estudios previos; Sezer *et al.* (2021) observaron que la aplicación de melatonina en plantas de tomate, tanto antes como después de la exposición al estrés salino, no mostró una mejora significativa en el peso fresco total ni en otros parámetros fisiológicos bajo concentraciones de NaCl elevadas. Esto sugiere que la melatonina podría no tener un efecto inmediato sobre el crecimiento total de las plantas cuando se aplica en momentos tempranos, como en este estudio, antes de inducir el estrés salino. Esta falta de efecto podría estar relacionada con la naturaleza del estrés salino y la complejidad de las respuestas de las plantas a este tipo de estrés.

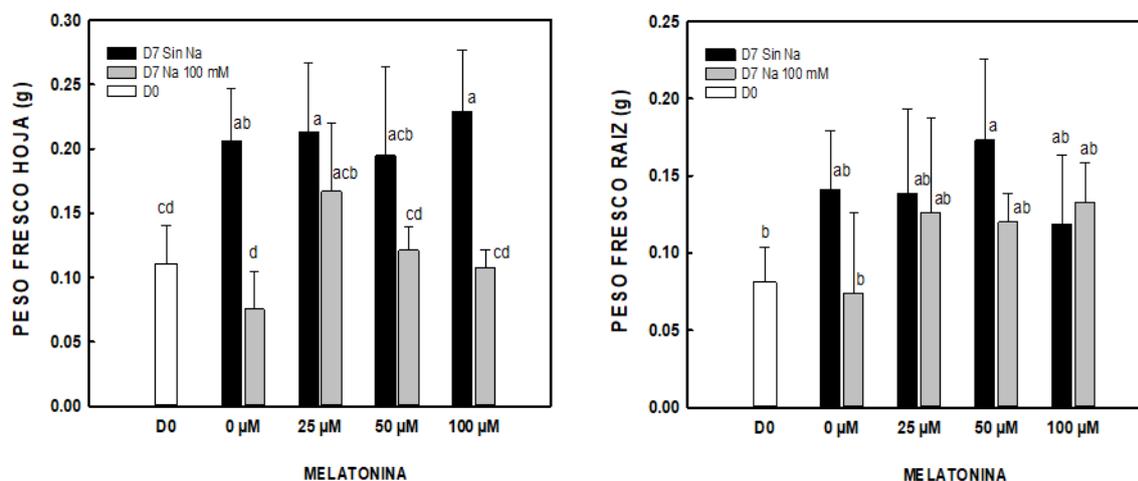
Según estudios recientes, la melatonina parece ser más eficaz cuando se administra en condiciones de estrés ya presente, ayudando a mitigar los efectos negativos del estrés salino sobre las plantas (Zhao *et al.*, 2019). Sin embargo, la aplicación previa al estrés podría no activar los mecanismos fisiológicos necesarios para una respuesta adecuada al daño inducido por salinidad.

De acuerdo con Arnao y Hernández-Ruiz (2007), la melatonina tiene propiedades antioxidantes y regula varias rutas metabólicas en plantas bajo estrés, pero su efectividad parece depender de factores como el tipo de estrés, el momento de aplicación y la dosis utilizada. Por lo tanto, el hecho de que no se observaran diferencias significativas en el peso fresco podría sugerir que la aplicación preventiva de melatonina no es el enfoque adecuado para contrarrestar los efectos del estrés salino en esta planta específica.

En este sentido, la falta de diferencias significativas en los tratamientos en las plántulas tratadas con melatonina antes de la exposición al estrés salino podría reflejar la necesidad de ajustar la metodología experimental, como la administración de melatonina en momentos específicos del ciclo de estrés. Investigaciones futuras podrían explorar el impacto de la melatonina en diferentes momentos del estrés y a concentraciones variadas para determinar su efectividad. Además, el uso de otras combinaciones de tratamientos con melatonina, como la aplicación post-estrés o la combinación con otras sustancias protectoras, podría generar respuestas más evidentes en el crecimiento y la biomasa de las plantas.

### **3.2.2. Peso fresco en raíces y hojas**

En la **Figura 3.2.3** se muestran los pesos frescos de hojas y raíces de las plantas tratadas o no, con salinidad y MT. Como se esperaba, la presencia de NaCl afectó el peso fresco de las hojas y este efecto fue revertido a 25  $\mu$ M de MT. En cuanto al peso fresco de las raíces, no se observaron diferencias significativas en dicho parámetro.



**Figura 3.2.3.** Peso fresco de hojas y raíces. Efecto de la melatonina (MT) a concentraciones de 0, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ , en condiciones de estrés salino (0 y 100 mM de NaCl), a los 0 y 7 días de tratamiento en plántulas de chile habanero variedad Mayan Kisin asperjadas antes de aplicar el estrés.

Los resultados obtenidos en este estudio reflejan el impacto de la melatonina (MT) en el crecimiento y desarrollo de las plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense*) bajo condiciones de estrés salino. Se observó que la aplicación de melatonina antes de la inducción del estrés salino mostró un efecto positivo solo en el peso fresco de las hojas a una concentración de 25  $\mu\text{M}$ , sin presentar diferencias significativas con el testigo. En investigaciones realizadas por González *et al.*, (2020), se reportó que la melatonina tiene un papel crucial en la mejora del crecimiento vegetal en presencia de salinidad al reducir el daño celular y mejorar el equilibrio iónico. Sin embargo, en el presente estudio, la concentración de 25  $\mu\text{M}$  de melatonina parece ser la única que mostró un efecto positivo en el peso fresco de las hojas, lo que puede indicar que la dosis es un factor determinante en la respuesta fisiológica de las plantas al estrés salino. Este hallazgo es consistente con lo reportado por Arnao y Hernández-Ruiz (2018), quienes sugieren que la concentración de melatonina es clave para su efectividad en las plantas.

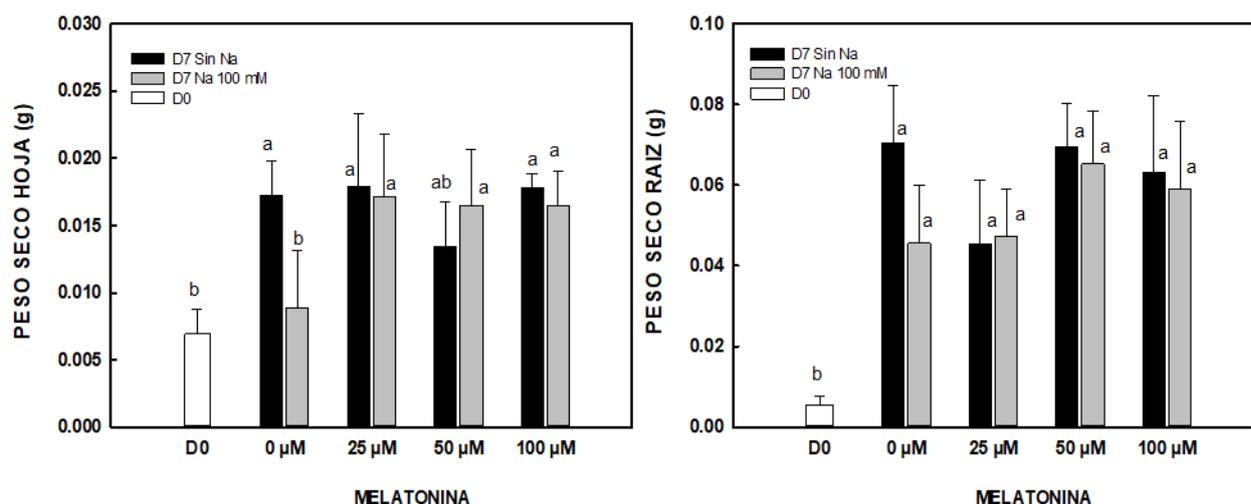
Por otro lado, los resultados obtenidos para el peso fresco de las raíces coinciden con los de estudios previos en los que se observó que la melatonina no logra contrarrestar significativamente los efectos del estrés salino cuando se aplica antes de la inducción de estrés como lo reportado por Liu *et al.* (2020), donde se observó que aunque la aplicación de melatonina antes del estrés salino mejoró algunos parámetros de crecimiento, no hubo un

efecto notable en el peso fresco de las plantas, lo cual es consistente con los resultados obtenidos en este estudio. Esto puede sugerir que el efecto de la melatonina depende de la sincronización de su aplicación, ya que en otros estudios donde la melatonina se aplicó simultáneamente o después de la inducción de estrés salino, se observó una mayor efectividad en la mitigación del daño celular y el estrés osmótico (Zhao *et al.*, 2021).

Es relevante considerar que los efectos de la melatonina en las plantas pueden depender de varios factores, como el tipo de estrés, la especie vegetal, y la dosis aplicada. Este resultado resalta la necesidad de ajustar las condiciones experimentales, como el momento y la concentración de la aplicación de melatonina, para obtener resultados más consistentes y comprensivos en futuras investigaciones.

### 3.2.4. Peso seco de hojas y raíces

En la **Figura 3.2.4**, se muestran los pesos secos de hojas y raíces de las plantas a las que se aplicó el estrés después de asperjar la melatonina (MT). Correspondiente al peso seco de las hojas, se observa que la aplicación de MT en todas sus concentraciones mejora el peso seco de hojas de las plántulas de chile habanero sometidas a 100 mM de NaCl. Estos resultados son consistentes con los reportados por Zeiser *et al.* (2021).



**Figura 3.2.4. Peso seco de hojas y raíces.** Efecto de la melatonina (MT) a concentraciones de 0, 25, 50 y 100 µM, en condiciones de estrés salino (0 y 100 mM de NaCl), a los 0 y 7 días de tratamiento en plántulas de chile habanero variedad Mayan Kisin. La melatonina (MT) se aplica antes del cambio de la solución.

Este hallazgo es particularmente relevante dado que las plántulas estaban expuestas a 100 mM de NaCl, un nivel de salinidad que normalmente causa estrés osmótico y limita el

crecimiento de las plantas. La mejora en el peso seco de las hojas sugiere que la melatonina tiene un efecto positivo en la adaptación de las plántulas de chile habanero a las condiciones de estrés salino.

Estos resultados coinciden con los reportados por Zeiser *et al.* (2021), quienes documentaron que la aplicación de melatonina en plantas sometidas a estrés salino incrementó el peso seco de las hojas en diferentes especies vegetales. Zeiser *et al.* (2021) argumentaron que la melatonina podría aliviar el daño causado por la salinidad al regular los mecanismos antioxidantes, mejorar la homeostasis iónica y promover el metabolismo celular. En nuestro estudio, este efecto positivo observado en el peso seco de las hojas podría estar relacionado con la capacidad de la melatonina para mejorar la retención de agua, mitigar los efectos tóxicos de los iones  $\text{Na}^+$  y favorecer la acumulación de metabolitos osmorreguladores como la prolina (Hernández-Ruiz *et al.*, 2019).

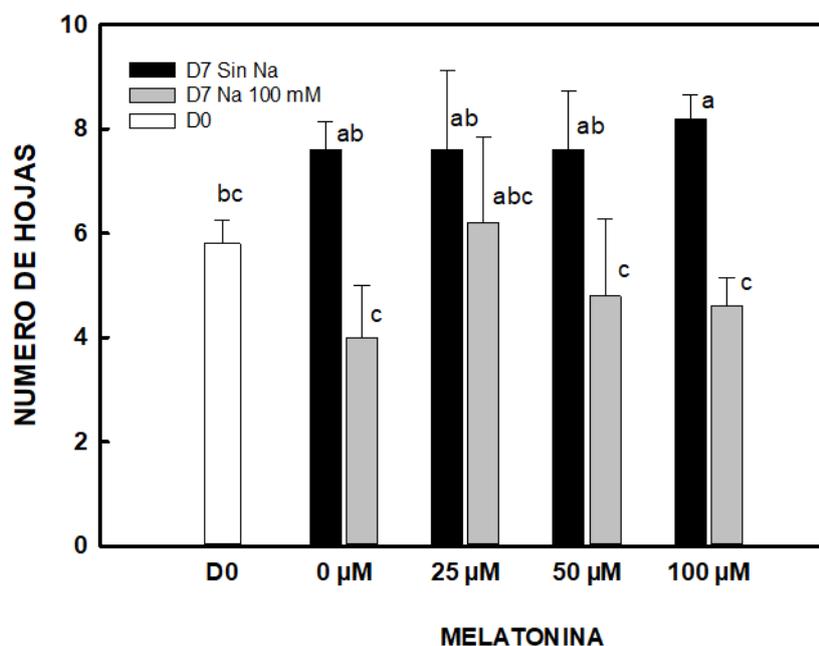
Es importante destacar que la mejora en el peso seco de las hojas en respuesta a la aplicación de melatonina en concentraciones elevadas podría indicar una interacción específica entre la melatonina y el estrés salino, donde la melatonina actúa como un regulador del estrés oxidativo generado por la alta concentración de NaCl. En este sentido, varios estudios han demostrado que la melatonina tiene propiedades antioxidantes que ayudan a las plantas a mitigar el daño causado por el estrés salino. Por ejemplo, Liu *et al.* (2020) observaron que la aplicación de melatonina mejoró la actividad de las enzimas antioxidantes, lo que permitió a las plantas manejar mejor los efectos del estrés salino, reduciendo así los daños a nivel celular y promoviendo un crecimiento más saludable. De igual manera, Arnao y Hernández-Ruiz (2018) subrayan que la melatonina puede mejorar la eficiencia fotosintética bajo condiciones de estrés, lo que podría explicar el incremento en el peso seco de las hojas observado en este estudio.

Por otro lado, es relevante mencionar que aunque la melatonina mantuvo el crecimiento solamente, el peso seco de las hojas tuvo un efecto positivo, sin embargo, el impacto en raíces no fue significativo. Esto podría indicar que la melatonina tiene un efecto más pronunciado sobre los órganos fotosintéticos, como las hojas, en lugar de las raíces. Este fenómeno también ha sido reportado en otros estudios en los que se observó que la melatonina tiende a promover el crecimiento de las partes aéreas de las plantas más que las raíces, debido a su capacidad para mejorar la fotosíntesis y la eficiencia de la absorción de nutrientes (Posmyk *et al.*, 2019).

### **3.2.3. Número de hojas**

El número de hojas de una planta es un parámetro fundamental para su desarrollo, ya que las hojas participan directamente en la fotosíntesis, proceso del cual la planta obtiene su mayor fuente de energía. Se ha documentado que, en condiciones de estrés salino, este número disminuye drásticamente como respuesta al estrés osmótico y al estrés iónico.

En relación con los resultados obtenidos para los parámetros fisiológicos de las plántulas sometidas a 100 mM de NaCl y a diferentes concentraciones de melatonina (MT), como se muestra en la **Figura 3.2.2**, en cuanto al número de hojas, se observó que, en las plántulas asperjadas antes de aplicar el estrés, no se encontraron diferencias estadísticas significativas en las plántulas en condiciones fisiológicas. Por otro lado, en las plántulas asperjadas antes de la aplicación del tratamiento de estrés, solo se detectó diferencias estadísticamente significativas en el tratamiento de 25  $\mu$ M. Estos resultados sugieren que, en el caso del chile habanero, el comportamiento de la melatonina no sigue el mismo patrón observado en estudios previos, en los cuales se ha documentado una mejora consistente en el crecimiento vegetativo, particularmente en el aumento del número de hojas, en especies como *Arabidopsis thaliana* o *Solanum lycopersicum*, donde la melatonina ha favorecido la tolerancia al estrés salino (Zhang *et al.*, 2016; Pérez *et al.*, 2018).



**Figura 3.2.2. Número de hojas.** Efecto de la melatonina (MT) a concentraciones de 0, 25, 50 y 100  $\mu$ M, en condiciones de estrés salino (0 y 100 mM de NaCl), a los 0 y 7 días de tratamiento en plántulas de chile habanero variedad Mayan Kisin aplicada antes del tratamiento con estrés.

En particular, se observó que el número de hojas no mostró diferencias significativas entre los tratamientos de melatonina aplicados antes de la inducción del estrés salino, con

excepción de la concentración de 25  $\mu\text{M}$  difiere de lo reportado por Zhao *et al.* (2019), en los cuales la melatonina aplicada en concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  a diversas especies de plantas bajo estrés salino promovió un incremento en el número de hojas y mejoró la biomasa total. Sin embargo, el presente estudio muestra que la respuesta de las plántulas de chile habanero sigue este mismo patrón, lo que podría estar relacionado con las características fisiológicas específicas de esta especie, la dosis aplicada o el momento de la aplicación de la melatonina.

La melatonina regula el estrés en las plantas al mejorar la homeostasis iónica y reducir el daño causado por especies reactivas de oxígeno (ROS) en condiciones de salinidad. Esto se logra mediante el equilibrio de iones como sodio y potasio, esenciales para el funcionamiento celular, y la neutralización de ROS, que minimiza el daño celular. Como resultado, las plantas mantienen un crecimiento vegetativo más saludable, reflejado en un mayor número de hojas, lo que indica una mejor adaptación al estrés salino (Tan *et al.*, 2015). Sin embargo, la falta de un efecto generalizado en el número de hojas, excepto en el tratamiento de 25  $\mu\text{M}$ , podría sugerir que la melatonina tiene un impacto más pronunciado a concentraciones específicas o en determinados momentos del ciclo de crecimiento. Por ejemplo, la investigación de Liang *et al.* (2018) demostró que la aplicación de melatonina después de la inducción de estrés salino fue más efectiva que la aplicación preventiva, lo que sugiere que la respuesta de las plantas podría depender del momento preciso de la aplicación.

Es importante señalar que la dosis de melatonina podría influir significativamente en su efectividad, como lo sugieren los resultados de este estudio. La concentración de 25  $\mu\text{M}$  parece ser un umbral óptimo para inducir una respuesta fisiológica positiva en las plántulas de chile habanero en comparación con concentraciones más altas o más bajas, lo que es consistente con algunos estudios que indican que las concentraciones de melatonina deben ser cuidadosamente ajustadas para obtener los mejores resultados (Liu *et al.*, 2020). Las dosis más altas de melatonina pueden inducir efectos adversos debido a la toxicidad o a un exceso de regulación, lo que podría explicar la falta de respuesta en los otros tratamientos.

Además, el hecho de que las plántulas asperjadas con melatonina antes del estrés no muestren efectos claros, con excepción de la concentración de 25  $\mu\text{M}$ , sugiere que la melatonina podría no ser tan eficaz cuando se aplica de manera preventiva, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Xu *et al.*, (2019), los cuales demostraron que la melatonina tiene un impacto más notorio cuando se aplica después de la exposición al estrés, posiblemente debido a su capacidad para activar respuestas de defensa en las plantas después de la inducción del estrés salino.

### **3.3. Contenidos de sodio y potasio en raíces y hojas**

En el estudio de la nutrición vegetal, los contenidos de sodio (Na) y potasio (K) en las raíces y hojas son parámetros clave que reflejan la capacidad de la planta para absorber y almacenar estos elementos esenciales. El sodio, aunque no es un nutriente esencial para la mayoría de las plantas, puede influir en el metabolismo celular, especialmente en condiciones de salinidad. Por otro lado, el potasio es un macronutriente esencial involucrado en varios procesos fisiológicos, como la regulación del equilibrio hídrico, la síntesis de proteínas y la activación de enzimas.

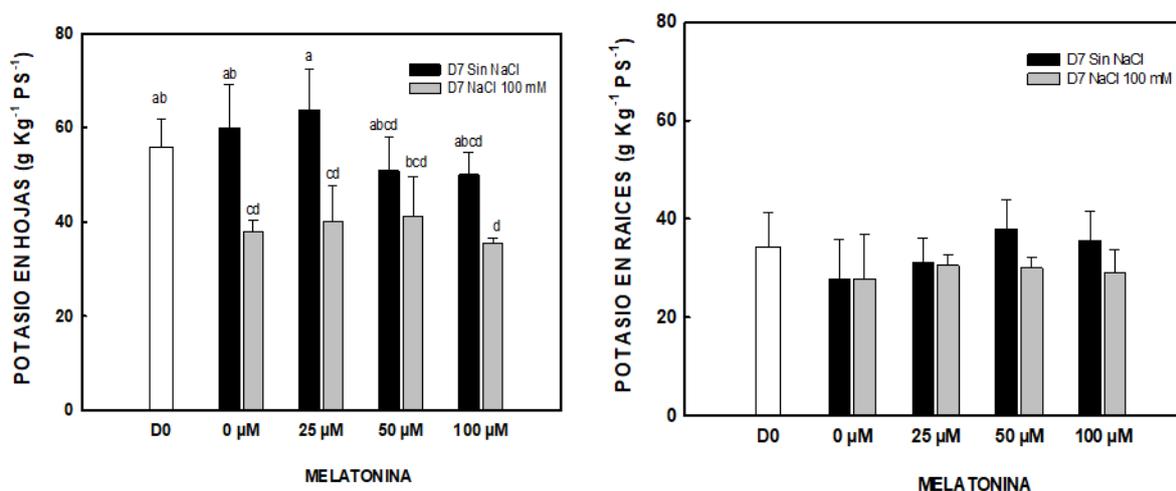
#### **3.3.1. Contenidos de potasio en raíces y hojas**

El potasio (K) es el mineral más abundante en las plantas, con concentraciones citosólicas que pueden alcanzar cerca de 150 mM. Este ion es esencial para una serie de funciones celulares, como la activación de enzimas, la síntesis de proteínas, el equilibrio de cargas de aniones orgánicos e inorgánicos, y la estabilización de macromoléculas cargadas negativamente, como proteínas y ácidos nucleicos. La absorción de  $K^+$  en las células vegetales se lleva a cabo principalmente de manera pasiva a través de canales iónicos que siguen su gradiente electroquímico, impulsada por el potencial negativo de la membrana generado por las ATPasas de la membrana plasmática. Cuando las concentraciones de  $K^+$  son bajas (por debajo de 500  $\mu\text{M}$ ), la absorción también puede ocurrir de forma activa mediante transportadores específicos (Pantoja, 2021).

El estrés salino, especialmente el causado por la acumulación de NaCl, afecta negativamente diversos procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares en las plantas. Entre los procesos más críticos se encuentran el transporte y acumulación de iones como el sodio ( $\text{Na}^+$ ) y el cloro ( $\text{Cl}^-$ ), así como la retención y fuga del potasio ( $\text{K}^+$ ), fundamentales para la homeostasis celular. El exceso de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el interior de las células vegetales altera el equilibrio iónico y osmótico, generando un estrés adicional que interfiere con la funcionalidad de las membranas celulares, los sistemas de transporte iónico y la actividad de diversas enzimas clave en el metabolismo vegetal. Esta acumulación excesiva de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  puede provocar un daño significativo en los tejidos vegetales, limitando el crecimiento y reduciendo la eficiencia de procesos como la fotosíntesis y la transpiración. Además, la fuga de  $\text{K}^+$ , esencial para la regulación osmótica y la activación de muchas enzimas, exacerba aún más los efectos perjudiciales del estrés salino. Este desajuste en la homeostasis iónica no solo compromete la integridad celular, sino que también incrementa el estrés oxidativo, afectando los

mecanismos de defensa antioxidante y favoreciendo la inducción de la muerte celular programada (Rodríguez-Coca *et al.*, 2023).

En la **Figura 3.3.1**, se muestran los contenidos de potasio en hojas y raíces de plántulas tratadas con 100 mM de NaCl y asperjadas con MT a tres concentraciones diferentes. Los resultados no revelaron diferencias estadísticas significativas en la retención de  $K^+$  en las plantas tratadas con MT, tanto en las hojas como en las raíces. A pesar de que se esperaba que la aplicación de melatonina incrementara la retención de potasio mediante la modulación de transportadores iónicos, la reducción de la actividad de canales de fuga o la acumulación en vacuolas, los datos obtenidos no confirmaron este efecto, sugiriendo que otros factores fisiológicos o condiciones experimentales podrían haber influido en la ausencia de este resultado.



**Figura 3.3.1.** Contenido de potasio (K) en hojas y raíces de plántulas de chile habanero variedad Mayan Kisin. Se muestra el efecto de la MT a concentraciones de 0, 25, 50 y 100  $\mu$ M, en combinación con condiciones de estrés salino de 0 y 100 mM de NaCl, evaluado a los 0 y 7 días de tratamiento.

La falta de efectos significativos de la aplicación de melatonina (MT) en la retención de potasio ( $K^+$ ) en plántulas de chile habanero sometidas a estrés salino resalta un hallazgo interesante que podría estar relacionado con diversos factores. Aunque el estrés salino suele inducir una disminución en el contenido de  $K^+$  en las plantas, la aplicación foliar de melatonina no logró revertir la fuga ni la reducción del contenido de  $K^+$  en las hojas. Sin embargo, en las raíces, el estrés salino no parece disminuir el contenido de  $K^+$ , e incluso podría mejorar su acumulación. Estos resultados sugieren que, mientras que la melatonina podría no ser eficaz en la regulación de la retención de potasio en las hojas bajo condiciones de estrés salino, en las raíces su impacto podría ser diferente, lo que podría implicar una mayor complejidad en la dinámica del transporte iónico en respuesta a esta aplicación.

Estos resultados coinciden parcialmente con otros estudios previos que han documentado efectos limitados o inconsistentes de la melatonina sobre la homeostasis iónica bajo condiciones de estrés salino. Es posible que el tiempo de cosecha, en este caso al séptimo día, no haya sido el más adecuado para evaluar plenamente los efectos de la melatonina, ya que su acción podría requerir un período más largo para manifestarse de manera efectiva en la regulación iónica. La melatonina, como regulador del estrés, podría tener un impacto más pronunciado a mediano o largo plazo, lo que indica que el diseño temporal del experimento podría influir en los resultados observados. Por ejemplo, Liu *et al.* (2020) observaron que la aplicación de melatonina en especies como *Arabidopsis thaliana* y *Glycine max* no siempre aumentaba la retención de potasio en las raíces cuando las plantas estaban sometidas a salinidad. Según estos autores, la respuesta a la melatonina puede depender de la especie vegetal, la concentración de la molécula y la duración del tratamiento, lo que sugiere que la melatonina podría tener efectos específicos que no necesariamente se traducen en una mejora directa en la retención de cationes esenciales como el potasio.

Sin embargo, otros estudios han encontrado que la melatonina podría mejorar la retención de potasio en especies como *Zea mays* y *Oryza sativa* bajo condiciones de estrés salino, lo cual indica que su efectividad podría variar entre especies. Zeiser *et al.* (2021) reportaron que, en plantas de maíz y arroz, la aplicación de melatonina incrementó la retención de potasio y contribuyó a mejorar la resistencia al estrés salino mediante la regulación de los mecanismos de transporte iónico en las membranas celulares.

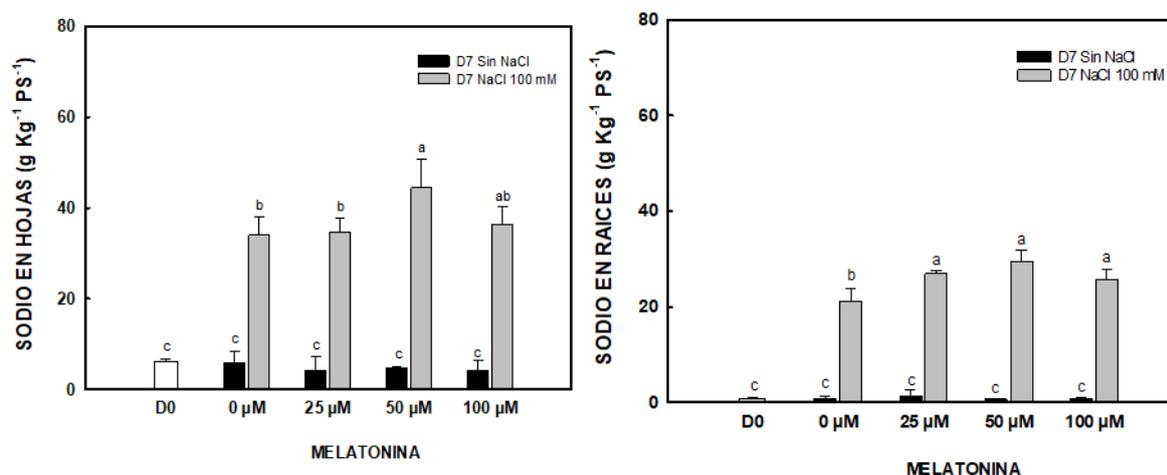
El hecho de que en este estudio no se haya observado un efecto positivo de la melatonina sobre la retención de  $K^+$  podría ser atribuido a varios factores. En primer lugar, podría existir una limitación en la capacidad de las plantas de chile habanero para responder a la melatonina en condiciones de estrés salino, ya que cada especie tiene diferentes mecanismos fisiológicos para manejar la salinidad. En segundo lugar, la concentración de melatonina utilizada en este estudio podría no haber sido la óptima para inducir los efectos deseados, ya que se ha demostrado que concentraciones más altas o más bajas pueden tener resultados contradictorios dependiendo de las condiciones experimentales como lo reportado por Zhang *et al.* (2019).

Además, es posible que la aplicación de melatonina antes de la inducción del estrés salino no haya sido el momento más adecuado para obtener beneficios en la homeostasis iónica de las plantas. Según Shabala *et al.* (2020), la aplicación de melatonina durante el estrés o después de la exposición al estrés salino podría ser más efectiva, ya que en este periodo las

plantas necesitan mayor regulación en la absorción y retención de nutrientes, como el potasio, para hacer frente al daño causado por el exceso de sal.

### 3.3.2. Contenidos de sodio en raíces y hojas

En relación con los contenidos de Na (**Fig. 3.3.2**), los resultados obtenidos fueron inesperados y contrarios a lo previsto. Se esperaba que la aplicación de melatonina (MT) ayudara a reducir la acumulación de sodio ( $\text{Na}^+$ ) en las plantas bajo estrés salino, promoviendo una mejor regulación iónica y evitando el daño celular asociado con la toxicidad de este ion. En las hojas, se observó un aumento en los niveles de Na a las concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{M}$  de MT. Por otro lado, en las raíces, todas las concentraciones de MT indujeron un incremento en el Na intracelular, lo que podría afectar de manera significativa la relación K/Na.



**Figura 3.3.2. Contenido de sodio (Na) en hojas y raíces de plántulas de chile habanero variedad Mayan Kisin, bajo el efecto de la MT a concentraciones de 0, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ , en condiciones de estrés salino con 0 y 100 mM de NaCl, evaluado a los 0 y 7 días de tratamiento.**

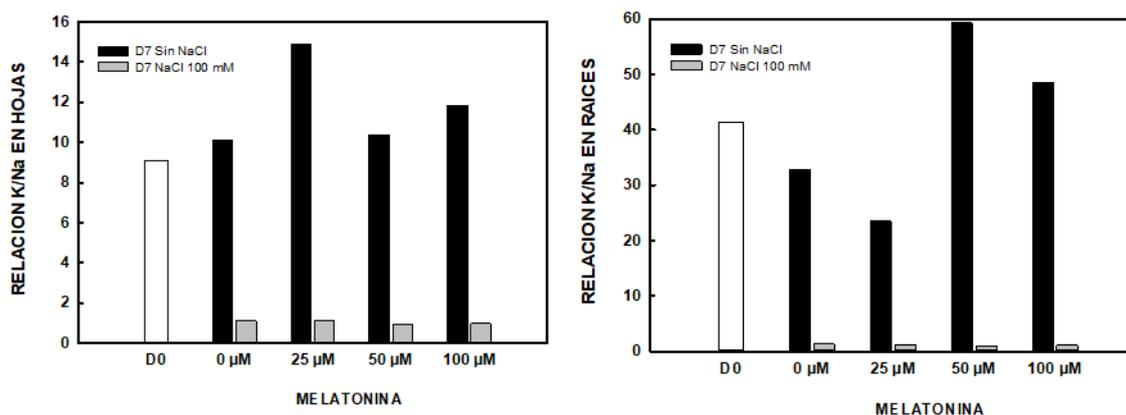
Se ha documentado que la melatonina puede tener efectos diversos sobre el transporte iónico en las plantas, con algunos estudios que sugieren que su aplicación ayuda a reducir la acumulación de  $\text{Na}^+$  en las células vegetales, al promover la exclusión de este ión a través de las membranas celulares (Zhang *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020). Estos autores encontraron que la melatonina, en concentraciones adecuadas, podía mejorar la capacidad de las plantas para regular los niveles de  $\text{Na}^+$ , protegiendo así la relación iónica esencial para la función celular. Sin embargo, los resultados de este estudio sugieren que la melatonina, en concentraciones más altas como 50 y 100  $\mu\text{M}$ , podría tener un efecto contrario al esperado, incrementando la acumulación de  $\text{Na}^+$ , tanto en hojas como en raíces.

Un posible mecanismo detrás de este aumento en los niveles de  $\text{Na}^+$  podría ser la interacción de la melatonina con las rutas de transporte iónico en las membranas celulares. Si bien lo reportado por Pattanayak *et al.* (2020) donde plantean que la melatonina actúa sobre las bombas iónicas, como la  $\text{H}^+$ -ATPasa y el  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, alterando la distribución de los iones entre los compartimentos celulares, concentraciones altas de melatonina podrían inducir una sobrecarga iónica que dificulte la correcta regulación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en las células vegetales. En este sentido, las concentraciones elevadas de melatonina podrían haber favorecido una mayor absorción de  $\text{Na}^+$ , lo cual afectaría negativamente la relación  $\text{K}/\text{Na}$ , un parámetro crucial para el equilibrio osmótico y la resistencia a la salinidad.

De hecho, en algunas especies, la aplicación de melatonina en altas concentraciones ha mostrado efectos adversos, tales como el aumento en la acumulación de iones no deseados como el  $\text{Na}^+$ , lo que indica que el mecanismo de acción de la melatonina podría ser complejo y específico de cada especie (Shabala *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022).

### 3.3.3. Relación de potasio-sodio en raíces y hojas

En cuanto a los resultados, se observa que, en las hojas, a concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{M}$  de MT, la relación  $\text{K}/\text{Na}$  es ligeramente superior a 1, lo que sugiere que los contenidos de  $\text{Na}$  son ligeramente mayores que los de  $\text{K}$ . En las raíces, por otro lado, ninguno de los tratamientos con MT muestra una relación superior a 1.



**Figura 3.3.3. Relación K/Na en hojas y raíces de plántulas de chile habanero variedad Mayan Kisin, bajo el efecto de la MT a concentraciones de 0, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ , y en condiciones de estrés salino con 0 y 100 mM de NaCl, evaluada a los 0 y 7 días de tratamiento.**

Este parámetro es crucial para evaluar la capacidad de las plantas para manejar la salinidad, ya que una relación  $\text{K}/\text{Na}$  superior a 1 indica que la planta está favoreciendo la acumulación de potasio o impidiendo la acumulación de sodio, un ion esencial para varios procesos metabólicos. Por el contrario, una relación  $\text{K}/\text{Na}$  inferior a 1 podría indicar que la planta está

acumulando más sodio (Na) que potasio (K), lo que podría alterar la homeostasis iónica y los procesos celulares dependientes de  $K^+$  (Hoseini *et al.*, 2024).

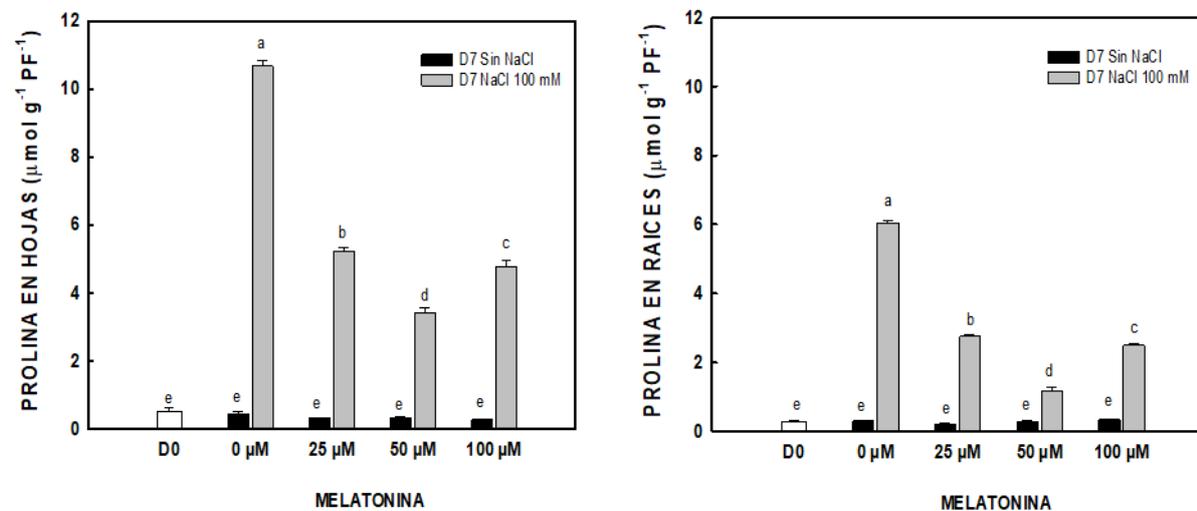
En los resultados obtenidos, se observó que, en las hojas de las plántulas tratadas con concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{M}$  de melatonina, la relación K/Na fue ligeramente inferior a 1, lo que sugiere que los niveles de sodio en estas plantas fueron ligeramente mayores que los de potasio. En las plantas sin estrés los contenidos de potasio fueron muy superiores a 1. Este hallazgo es interesante, ya que sugiere que la aplicación de melatonina en concentraciones elevadas no logró favorecer la exclusión de sodio ni la retención de potasio de la manera esperada. Este resultado podría indicar que, en ciertas concentraciones, la melatonina no fue lo suficientemente eficaz para regular la acumulación de  $\text{Na}^+$ , como lo reportado por Zhang *et al.* (2020), en los que la aplicación de melatonina, en dosis elevadas, aumentó la acumulación de  $\text{Na}^+$  en las células vegetales.

Por otro lado, en las raíces de las plántulas tratadas con las diferentes concentraciones de melatonina, la relación Na/K no superó el valor de 1 en ninguno de los tratamientos, lo que sugiere que, en este caso, la melatonina no provocó un desajuste significativo en la acumulación de Na y K. Este resultado es consistente con estudios previos que han documentado una mayor eficiencia en la regulación de los iones Na y K en las raíces de plantas tratadas con melatonina bajo condiciones de estrés salino (Liu *et al.*, 2020; Shabala *et al.*, 2019). La capacidad de las raíces para mantener un equilibrio iónico adecuado podría ser crucial para mitigar los efectos tóxicos del  $\text{Na}^+$  en el sistema vegetal y facilitar la absorción de nutrientes esenciales.

Mientras que algunas investigaciones han mostrado que la melatonina tiene un efecto positivo en la regulación de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  al mejorar la actividad de las bombas iónicas como es el caso de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa. Otras investigaciones sugieren que en concentraciones más altas la melatonina puede inducir efectos adversos, como el aumento de la acumulación de  $\text{Na}^+$  en las células (Zhang *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020). Estos resultados resaltan la importancia de optimizar las concentraciones de melatonina en función del tipo de estrés y la especie vegetal, así como de considerar los posibles efectos negativos de una aplicación excesiva.

#### **3.4. Contenido de prolina en raíces y hojas**

El comportamiento de la prolina bajo condiciones de estrés salino y la aplicación de melatonina es uno de los objetivos principales de este proyecto. En la **figura 3.4** se muestran los contenidos de prolina en hojas y raíces, donde se evidencia que en todas las concentraciones se observó disminución de prolina.



**Figura 3.4. Contenido de prolina en hojas y raíces de plántulas de chile habanero variedad Mayan Kisin, bajo el efecto de la MT a concentraciones de 0, 25, 50 y 100 μM, y en condiciones de estrés salino con 0 y 100 mM de NaCl, evaluado a los 0 (D0) y 7 días de tratamiento.**

La prolina es un aminoácido clave en la respuesta de las plantas a estrés abiótico, como salinidad, sequía y temperaturas extremas. Su acumulación en las células vegetales actúa como un osmoprotector, antioxidante y estabilizador de estructuras celulares, ayudando a mantener la integridad de las membranas y protegiendo las proteínas del daño inducido por las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hayat *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2013; Adejumo *et al.*, 2021). Además, la prolina regula el balance hídrico y la homeostasis iónica, activando rutas metabólicas que favorecen la protección celular frente a los daños oxidativos (Hayat *et al.*, 2012; Nahar *et al.*, 2022). De hecho, la aplicación exógena de prolina ha demostrado mejorar la tolerancia de las plantas al estrés abiótico, lo que resalta su importancia en la adaptación de las plantas a condiciones ambientales adversas (Sharma *et al.*, 2011; Spormann *et al.*, 2023).

Investigaciones recientes han sugerido que la melatonina y la prolina podrían interactuar sinérgicamente para mejorar la tolerancia al estrés abiótico, ya que la melatonina podría inducir la biosíntesis de prolina al activar los genes responsables de su acumulación (Zhao *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022). Este efecto combinado podría mejorar no solo la estabilidad osmótica y estructural de las células vegetales, sino también la capacidad antioxidante, facilitando la respuesta frente al estrés oxidativo (Shan *et al.*, 2022).

En contraste con estos antecedentes, nuestros resultados muestran una interacción diferente entre la melatonina y la prolina bajo condiciones de estrés salino. En todas las concentraciones de melatonina evaluadas (25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ), se observó una disminución de los niveles de prolina, tanto en raíces como en hojas, en comparación con el control, donde los niveles de prolina fueron más altos. Este hallazgo contradice estudios previos que sugieren que la melatonina podría inducir la biosíntesis de prolina y mejorar su acumulación en las plantas bajo estrés salino (Zhao *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022). En lugar de un aumento, nuestra investigación encontró que la melatonina no promovió la acumulación de prolina, y de hecho, en las plantas tratadas con melatonina los niveles de prolina fueron más bajos que en las plantas control.

Este resultado sugiere que, en nuestro caso, la aplicación de melatonina no tiene el efecto esperado sobre la acumulación de prolina, lo que podría estar relacionado con varios factores. En primer lugar, podría existir una dosis dependiente de la respuesta a la melatonina, ya que algunas concentraciones más altas de esta hormona podrían alterar el metabolismo de la prolina, inhibiendo su síntesis o favoreciendo su degradación. Este fenómeno ha sido reportado en estudios previos, donde concentraciones elevadas de melatonina pueden tener efectos negativos en ciertos procesos metabólicos y en la acumulación de compuestos como la prolina (Zhao *et al.*, 2021; Kaya y Shabala, 2024). En nuestro caso, aunque se usaron concentraciones de melatonina relativamente moderadas (25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ), la falta de respuesta positiva en la acumulación de prolina podría estar relacionada con una interacción compleja entre la melatonina y otros componentes metabólicos, o bien con una posible interferencia con las rutas metabólicas involucradas en la biosíntesis de prolina.

Además, es posible que el estrés salino en sí mismo haya alterado los mecanismos de regulación osmótica y antioxidante de las plantas, de tal manera que la melatonina no haya sido lo suficientemente eficaz para inducir una respuesta favorable en la acumulación de prolina. La interacción entre melatonina, estrés salino y otros compuestos osmoprotectores, como la prolina, podría depender de factores adicionales como la duración y la intensidad del estrés, así como la capacidad de la planta para regular sus rutas metabólicas en condiciones extremas.

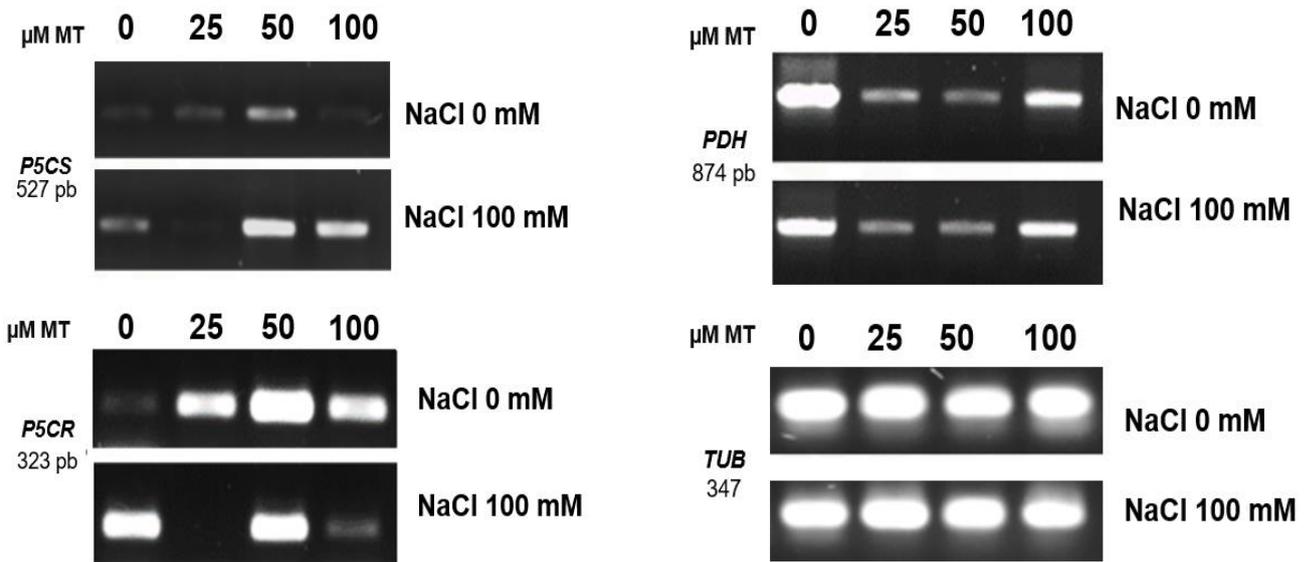
### **3.5. Perfiles de expresión de transcritos en raíces de los genes CCP5CS, CCP5CR y CCPDH en las dos variedades contrastantes al estrés por NaCl tras aplicación de melatonina**

La regulación del metabolismo de prolina es un factor determinante en la capacidad de las plantas para tolerar condiciones de estrés. La acumulación de prolina protege las células

vegetales del daño osmótico y estrés oxidativo, estabilizando proteínas y membranas celulares. En este sentido, la manipulación genética de los genes involucrados en la síntesis de prolina, como **P5CS** y **P5CR**, ha mostrado resultados prometedores en la mejora de la tolerancia de las plantas a condiciones de estrés.

Además, la expresión de genes como **PDH**, que regula la degradación de prolina, también tiene implicaciones en la homeostasis del aminoácido y la eficiencia energética de la planta. En estudios recientes, la disminución de la expresión de genes de degradación, como **PDH**, ha mostrado un aumento en los niveles de prolina, lo que sugiere una mayor capacidad de la planta para enfrentar situaciones de estrés.

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos revelan patrones interesantes en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de la prolina bajo condiciones de estrés salino y tratamiento con melatonina (MT). De acuerdo con la Figura 3.5, se observa de forma general que los niveles de expresión de los genes de síntesis de prolina, como P5CS y P5CR, son más altos en las plantas tratadas con MT, tanto en condiciones normales como de estrés salino. Este hallazgo está en línea con estudios previos que han documentado que la aplicación exógena de melatonina puede inducir la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de prolina, mejorando la capacidad de las plantas para enfrentar el estrés abiótico (Shan *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2023). Específicamente, a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  de MT, se observó un aumento en la expresión de los genes P5CS y P5CR, lo que correlaciona con mayores niveles de prolina, tanto en condiciones normales como bajo estrés salino. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Liu *et al.* (2022), quienes demostraron que la melatonina activa rutas metabólicas que favorecen la acumulación de prolina en condiciones adversas.



**Figura. 3.5. Expresión de algunos genes del metabolismo de prolina en raíces en presencia de MT exógena en condiciones normales y de salinidad.** P5CS, pirrolina 5 carboxilato sintetasa; P5CR, pirrolina 5 carboxilato reductasa; PDH, prolina deshidrogenasa; TUB, tubulina

Por otro lado, a concentraciones de 25  $\mu\text{M}$  de MT, se observó una expresión mínima o nula de los genes de síntesis (P5CS y P5CR), lo cual está en concordancia con la disminución de los niveles de prolina en las plantas tratadas con esta concentración. Este patrón también ha sido reportado por otros investigadores, quienes sugieren que una dosis baja de melatonina podría no ser suficiente para inducir la expresión de los genes de síntesis de prolina, lo que resulta en una acumulación reducida de este aminoácido en las plantas (Kaya y Shabala, 2024). La expresión del gen que codifica la enzima involucrada en la degradación de este aminoácido, PDH, también fue considerablemente menor en plantas tratadas con MT, lo que sugiere que la aplicación de melatonina podría estar modulando negativamente la actividad de la vía de degradación de prolina, favoreciendo su acumulación en las células vegetales.

Un aspecto importante observado en nuestros resultados es la relación entre la expresión génica en las raíces y los contenidos de prolina. En las raíces, tanto las bajas como altas expresiones de los genes de síntesis (P5CS, P5CR) y la expresión de PDH resultaron en menores contenidos de prolina en comparación con el testigo tratado solo con NaCl. Este hallazgo podría estar relacionado con un mecanismo de regulación diferencial en las raíces frente al estrés salino, donde la aplicación de melatonina no parece tener el mismo efecto positivo en las raíces que en las hojas. La literatura sugiere que la respuesta a melatonina puede variar entre los diferentes órganos de la planta, y en las raíces, la interacción entre el estrés salino y los compuestos exógenos podría estar modulada por factores específicos del

ambiente local, como la disponibilidad de agua y nutrientes (Posmyk *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021).

Además, la disminución en los niveles de prolina en las raíces a pesar de una mayor expresión de los genes de síntesis podría sugerir que otros factores, como la actividad de las enzimas antioxidantes o los cambios en la estructura de las membranas celulares, también están involucrados en la respuesta de las raíces al tratamiento con melatonina. Esto sugiere que la melatonina está modulando otros mecanismos protectores en la planta, como la actividad antioxidante y la protección de las membranas celulares, que podrían estar reduciendo la necesidad de acumulación de prolina. Al mejorar la protección antioxidante y la estabilidad de las membranas, la melatonina podría estar disminuyendo el estrés celular asociado con el estrés salino, lo que reduce la necesidad de la planta de sintetizar y acumular prolina como una medida de defensa. Se ha demostrado que la melatonina regula no solo la biosíntesis de prolina, sino también la actividad de enzimas antioxidantes y otros mecanismos celulares que ayudan a las plantas a manejar el estrés abiótico (Han *et al.*, 2017). Es posible que, en las raíces, el estrés salino y la melatonina modulen otros aspectos del metabolismo que compensan la acumulación de prolina, lo que resulta en menores niveles en comparación con las plantas tratadas solo con NaCl.

## CAPÍTULO IV

### Discusión general

La melatonina es una hormona crucial en las plantas que regula diversos procesos fisiológicos, como el crecimiento, la fotosíntesis, y la respuesta al estrés abiótico. En condiciones de estrés, como la salinidad, la melatonina mejora la eficiencia fotosintética, protege los pigmentos fotosintéticos y promueve el crecimiento de las raíces y las hojas (Zhang *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2023). Además, tiene un papel destacado en la homeostasis redox, lo que refuerza su efecto positivo en las plantas expuestas a condiciones adversas (Zhao *et al.*, 2021). En este estudio, se analizaron los efectos de la aplicación exógena de melatonina en plantas de chile habanero sometidas a estrés salino, especialmente en relación con el metabolismo de prolina, un aminoácido clave en la tolerancia al estrés.

La melatonina ha demostrado efectos positivos en la fotosíntesis, el crecimiento del área foliar y la biomasa de las plántulas (Zhang *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2023). En el caso de la cebada, la aplicación de melatonina incrementó el contenido de clorofila, mejorando la eficiencia fotosintética (Li *et al.*, 2023). En el presente estudio, se observó que la aplicación de melatonina en concentraciones bajas (25  $\mu\text{M}$ ) promovió un aumento significativo en la biomasa de las plántulas, lo que coincide con los hallazgos previos que sugieren que la melatonina a bajas concentraciones es un regulador eficaz del crecimiento vegetal (Wang *et al.*, 2013). Esto resalta la importancia de la melatonina no solo en la fotosíntesis, sino también en la promoción del crecimiento radicular y el desarrollo de la planta en general (Park & Spack, 2012).

Específicamente, en las plántulas tratadas con 25  $\mu\text{M}$  de melatonina, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de hojas en comparación con los controles, lo que indica una posible respuesta positiva a esta concentración de melatonina en condiciones de estrés salino. Sin embargo, este efecto no se extendió a otras concentraciones de melatonina ni a las plántulas que fueron asperjadas después de la aplicación del estrés, lo que sugiere que la respuesta de las plántulas de chile habanero a la melatonina podría ser dosis-dependiente y depende del momento en que se aplique el tratamiento (Khan *et al.*, 2023; Sharma *et al.*, 2024).

En cuanto al peso fresco de las raíces, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Liu *et al.* (2020), quienes reportaron que la aplicación de melatonina antes del estrés salino no tuvo un efecto significativo en este parámetro. Este patrón sugiere que la aplicación de

melatonina antes de la inducción del estrés salino puede no ser suficiente para contrarrestar los efectos adversos sobre el crecimiento radicular. De hecho, estudios recientes han demostrado que la sincronización en la aplicación de melatonina es crucial para obtener beneficios óptimos. Zhao *et al.* (2021) observaron que la aplicación de melatonina simultáneamente o después de la inducción de estrés salino mostró una mayor efectividad en la mitigación del daño celular y en la mejora de la tolerancia al estrés osmótico.

La mejora en el peso seco de las hojas observada en este estudio también puede explicarse por las propiedades antioxidantes de la melatonina. Varios estudios recientes han documentado que la melatonina actúa como un potente antioxidante que protege a las plantas del daño inducido por el estrés abiótico (Liu *et al.*, 2020). En este sentido, la melatonina puede incrementar la actividad de las enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa y la peroxidasa, que neutralizan las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por el estrés salino (Zhao *et al.*, 2021). Esta actividad antioxidante no solo reduce el daño celular, sino que también mejora la eficiencia fotosintética, lo que resulta en un mejor crecimiento de los órganos fotosintéticos, como las hojas, lo que podría explicar el incremento en el peso seco observado en este estudio (Arnao y Hernández-Ruiz, 2018).

La salinidad es un factor de estrés abiótico que afecta negativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas, alterando la homeostasis iónica y metabólica (Kumar *et al.*, 2023). La melatonina ha sido reconocida por su capacidad para mejorar la tolerancia de las plantas al estrés salino, principalmente a través de la regulación de la homeostasis de iones como el potasio ( $K^+$ ) y el sodio ( $Na^+$ ) (Li *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2021). En estudios previos, la aplicación de melatonina mejoró la retención de  $K^+$  en condiciones salinas, lo que está correlacionado con una mayor tolerancia a la sal (Li *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2022). Sin embargo, en el presente estudio no se observó un aumento significativo en la retención de  $K^+$  en las plantas tratadas con melatonina, lo que difiere de lo reportado por Liu *et al.* (2020), donde la aplicación de 20  $\mu M$  de melatonina aumentó la retención de  $K^+$  bajo estrés salino.

Además, los resultados obtenidos en este estudio mostraron un aumento inesperado en los niveles de  $Na^+$  en las hojas de las plantas tratadas con concentraciones más altas de melatonina (50 y 100  $\mu M$ ). Este comportamiento es opuesto a lo reportado por Sezer *et al.* (2021), quienes encontraron una disminución en la entrada de  $Na^+$  en plantas de lechuga tratadas con melatonina bajo estrés salino. Este contraste sugiere que la respuesta de las plantas a la melatonina puede depender de factores como las concentraciones de melatonina y las especies vegetales utilizadas.

La prolina es un aminoácido que desempeña un papel fundamental en la adaptación de las plantas a condiciones de estrés al actuar como osmoprotector y antioxidante (Hasan *et al.*, 2022, Zhang *et al.*, 2023). La melatonina, además de sus efectos sobre la fotosíntesis y el crecimiento vegetal, también influye en la biosíntesis de prolina, activando los genes responsables de su acumulación (Zhao *et al.*, 2021). En este estudio, se observó que la aplicación de melatonina a 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  disminuyó significativamente los niveles de prolina tanto en raíces como en hojas de plantas expuestas a 100 mM de NaCl, lo que sugiere que la melatonina puede inducir a la disminución de los contenidos de prolina bajo condiciones de estrés salino, tal como se ha reportado previamente (Kaya y Shabala, 2024; Khan *et al.*, 2024).

Sin embargo, a concentraciones de 50  $\mu\text{M}$ , se observó una mayor disminución en los contenidos de prolina en comparación con el testigo y los demás tratamientos, e incluso en algunos casos los niveles de prolina fueron menores o no presentaron cambios significativos en comparación con el control. Este resultado resalta la importancia de la concentración de melatonina en la respuesta de las plantas al estrés salino. La interacción entre melatonina y prolina podría ser dependiente de la concentración de melatonina utilizada, con efectos positivos observados principalmente a concentraciones bajas (Zhao *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022).

Un aspecto relevante que se observó en nuestro estudio es la diferencia en la respuesta de los genes en las raíces. A pesar de que las raíces presentaron una mayor expresión de los genes de síntesis de prolina (P5CS, P5CR) y del gen de degradación (PDH), los niveles de prolina en las raíces fueron menores en comparación con las plantas tratadas solo con NaCl. Este patrón sugiere una regulación diferencial entre órganos, algo que ha sido documentado previamente en diversas especies vegetales. En las raíces, la interacción entre el estrés salino y los compuestos exógenos como la melatonina puede verse afectada por factores locales específicos, como la disponibilidad de agua, la salinidad del sustrato y los nutrientes (Ahmed *et al.*, 2022). La literatura también destaca que las raíces tienen un comportamiento fisiológico distinto al de las hojas en respuesta a la melatonina, lo que podría estar relacionado con las diferencias en el metabolismo redox y la actividad enzimática en estos órganos (Wang *et al.*, 2021).

Además, el hecho de que los niveles de prolina en las raíces fueran menores a pesar de una mayor expresión de los genes de síntesis sugiere que otros factores metabólicos pueden estar influyendo en la respuesta de las raíces al tratamiento con melatonina. Es posible que la melatonina esté modulando otros mecanismos antioxidantes y la integridad de las

membranas celulares en las raíces, lo que puede compensar la acumulación de prolina. Estudios recientes han demostrado que la melatonina puede regular no solo la biosíntesis de prolina, sino también la actividad de enzimas antioxidantes, lo que proporciona una protección adicional contra el estrés abiótico (Han *et al.*, 2017; Shibata *et al.*, 2023). Estos mecanismos podrían ser más prominentes en las raíces debido a la diferente exposición al estrés salino, lo que explicaría la menor acumulación de prolina observada en este órgano.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES GENERALES

- La aplicación de melatonina a concentraciones bajas (25  $\mu\text{M}$ ) demostró ser un regulador eficaz del crecimiento vegetal en condiciones de estrés salino, promoviendo un aumento significativo en la biomasa, el número de hojas y el peso seco de las hojas.
- En todas las concentraciones de melatonina, se observó una disminución significativa en los niveles de prolina en las raíces y hojas de las plántulas tratadas con NaCl en comparación con el testigo, resaltando el tratamiento de 50  $\mu\text{M}$ .
- No se evidenció un incremento significativo en la retención de potasio en las plantas tratadas con melatonina y sí una tendencia hacia la acumulación de sodio ( $\text{Na}^+$ ) en las hojas de las plantas tratadas con las concentraciones más altas de melatonina (50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ ) bajo condiciones de estrés salino.
- Los niveles de prolina fueron menores en las raíces de las plántulas tratadas con melatonina.
- La melatonina reguló positivamente los niveles de transcritos de los genes que codifican a las enzimas del metabolismo de prolina, como es el caso de P5CS, P5CR y PDH, efecto que fue dependiente de la dosis y la presencia de NaCl.

## **PERSPECTIVAS**

1. Realizar estudios más detallados sobre la forma de aplicación de la melatonina en las plantas de Chile, ya sea por aspersión foliar o en el medio nutritivo.
2. Realizar una curva dosis-respuesta, utilizando dosis inferiores a 25  $\mu\text{M}$  de melatonina, ya que a esta concentración se observaron efectos positivos. Además, en otros cultivos, se ha documentado que la melatonina ejerce efectos beneficiosos a dosis más bajas.
3. Evaluar el papel de la melatonina sobre el transporte de K y Na, así como la regulación a nivel transcripcional de este compuesto sobre algunos de los genes involucrados en el transporte de estos iones.
4. Evaluar la acumulación y localización del Na inducida por melatonina, para dilucidar su rol en la acumulación de este elemento en condiciones de estrés salino-
5. Estudiar los posibles mecanismos de acción de la melatonina sobre la respuesta al estrés salino, por ejemplo, evaluar el efecto antioxidante de la misma.

## REFERENCIAS

- Adejumo, S. A., Oniosun, B., Akpoilih, O. A., Adeseke, A., y Arowo, D. O. (2021). Anatomical changes, osmolytes accumulation and distribution in the native plants growing on Pb-contaminated sites. *Environmental Geochemistry and Health*, 43(4), 1537-1549. <https://doi.org/10.1007/s10653-020-00649-5>
- Agathokleous, E., Zhou, B., Xu, J., Ioannou, A., Feng, Z., Saitanis, C., Frei, M., Calabrese, E., y Fotopoulos, V. (2024). Melatonin: A versatile tool for sustaining agricultural productivity and improving food security. *Authorea Preprints*. <https://essopenarchive.org/doi/full/10.22541/au.170664777.73495098>
- Ahmad, J., Hayat, F., Khan, U., Ahmed, N., Li, J., Ercisli, S., Iqbal, S., Javed, H. U., Alyas, T., y Tu, P. (2024). Melatonin: A promising approach to enhance abiotic stress tolerance in horticultural plants. *South African Journal of Botany*, 164, 66-76.
- Ali, M. A. A., Nasser, M. A., Abdelhamid, A. N., Ali, I. A. A., Saady, H. S., y Hassan, K. M. (2024). Melatonin as a Key Factor for Regulating and Relieving Abiotic Stresses in Harmony with Phytohormones in Horticultural Plants—A Review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 24(1), 54-73. <https://doi.org/10.1007/s42729-023-01586-9>
- Arnao, M. B., y Hernández-Ruiz, J. (2017). Growth activity, rooting capacity, and tropism: Three auxinic precepts fulfilled by melatonin. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(6), 127. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2428-3>
- Arnao, M. B., y Hernández - Ruiz, J. (2009a). Assessment of different sample processing procedures applied to the determination of melatonin in plants. *Phytochemical Analysis*, 20(1), 14-18. <https://doi.org/10.1002/pca.1083>
- Arnao, M. B., y Hernández - Ruiz, J. (2009b). Chemical stress by different agents affects the melatonin content of barley roots. *Journal of Pineal Research*, 46(3), 295-299. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00660.x>
- Arnao, M. B., y Hernández-Ruiz, J. (2013). Growth conditions influence the melatonin content of tomato plants. *Food chemistry*, 138(2-3), 1212-1214.
- Arnao, M. B., y Hernández-Ruiz, J. (2014). Melatonin: Possible role as light-protector in plants. *UV radiation: Properties, effects, and applications*, 79-92.
- Arnao, M. B., y Hernández-Ruiz, J. (2017). Growth activity, rooting capacity, and tropism: Three auxinic precepts fulfilled by melatonin. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(6), 127. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2428-3>
- B. Arnao, M., y Hernández-Ruiz, J. (2007). Melatonin in Plants: More Studies are Necessary. *Plant Signaling & Behavior*, 2(5), 381-382. <https://doi.org/10.4161/psb.2.5.4260>

- Back, K. (2021). Melatonin metabolism, signaling and possible roles in plants. *The Plant Journal*, 105(2), 376-391. <https://doi.org/10.1111/tpj.14915>
- Back, K., Tan, D., y Reiter, R. J. (2016). Melatonin biosynthesis in plants: Multiple pathways catalyze tryptophan to melatonin in the cytoplasm or chloroplasts. *Journal of Pineal Research*, 61(4), 426-437. <https://doi.org/10.1111/jpi.12364>
- Bajwa, V. S., Shukla, M. R., Sherif, S. M., Murch, S. J., y Saxena, P. K. (2014). Role of melatonin in alleviating cold stress in *A. rabidopsis thaliana*. *Journal of Pineal Research*, 56(3), 238-245. <https://doi.org/10.1111/jpi.12115>
- Blask, D. E., Dauchy, R. T., Sauer, L. A., y Krause, J. A. (2004). Melatonin uptake and growth prevention in rat hepatoma 7288CTC in response to dietary melatonin: Melatonin receptor-mediated inhibition of tumor linoleic acid metabolism to the growth signaling molecule 13-hydroxyoctadecadienoic acid and the potential role of phytemelatonin. *Carcinogenesis*, 25(6), 951-960.
- Byeon, Y., Choi, G.-H., Lee, H. Y., y Back, K. (2015). Melatonin biosynthesis requires N-acetylserotonin methyltransferase activity of caffeic acid O-methyltransferase in rice. *Journal of experimental botany*, 66(21), 6917-6925.
- Caniato, R., Filippini, R., Piovan, A., Puricelli, L., Borsarini, A., y Cappelletti, E. M. (2003). Melatonin in Plants. En G. Allegri, C. V. L. Costa, E. Ragazzi, H. Steinhart, y L. Varesio (Eds.), *Developments in Tryptophan and Serotonin Metabolism* (Vol. 527, pp. 593-597). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0135-0\\_68](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0135-0_68)
- Cao, S., Shrestha, S., Li, J., Yu, X., Chen, J., Yan, F., Ying, G., Gu, C., Wang, L., y Chen, G. (2017). Melatonin-mediated mitophagy protects against early brain injury after subarachnoid hemorrhage through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Scientific Reports*, 7(1), 2417.
- Chakraborty, K., Bhaduri, D., Meena, H. N., y Kalariya, K. (2016). External potassium (K<sup>+</sup>) application improves salinity tolerance by promoting Na<sup>+</sup>-exclusion, K<sup>+</sup>-accumulation and osmotic adjustment in contrasting peanut cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 103, 143-153.
- Chen, G., Huo, Y., Tan, D.-X., Liang, Z., Zhang, W., y Zhang, Y. (2003). Melatonin in Chinese medicinal herbs. *Life sciences*, 73(1), 19-26.
- Chen, L., Song, Y., Li, S., Zhang, L., Zou, C., y Yu, D. (2012). The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 120-128.
- Derpsch, R., Kassam, A., Reicosky, D., Friedrich, T., Calegari, A., Basch, G., Gonzalez-Sanchez, E., y dos Santos, D. R. (2024). Nature's laws of declining soil productivity and Conservation Agriculture. *Soil Security*, 14, 100127.

- Dubbels, R., Reiter, R. J., Klenke, E., Goebel, A., Schnakenberg, E., Ehlers, C., Schiwara, H. W., y Schloot, W. (1995). Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography - mass spectrometry. *Journal of Pineal Research*, 18(1), 28-31. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1995.tb00136.x>
- Erland, L. A. E., y Saxena, P. K. (2018). Melatonin in plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 54(1), 3-24. <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9879-5>
- Esmaeili, S., Sharifi, M., Ghanati, F., Soltani, B. M., Samari, E., y Sagharyan, M. (2023). Exogenous melatonin induces phenolic compounds production in *Linum album* cells by altering nitric oxide and salicylic acid. *Scientific Reports*, 13(1), 4158.
- Fan, J., Xie, Y., Zhang, Z., y Chen, L. (2018). Melatonin: A multifunctional factor in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1528.
- Ferreira, L. J., Azevedo, V., Maroco, J., Oliveira, M. M., y Santos, A. P. (2015). Salt tolerant and sensitive rice varieties display differential methylome flexibility under salt stress. *PLoS One*, 10(5), e0124060.
- Fortes, A. M., y Gallusci, P. (2017). Plant stress responses and phenotypic plasticity in the epigenomics era: Perspectives on the grapevine scenario, a model for perennial crop plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 82.
- Galano, A. (2011). On the direct scavenging activity of melatonin towards hydroxyl and a series of peroxy radicals. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(15), 7178-7188.
- Gong, X., Shi, S., Dou, F., Song, Y., y Ma, F. (2017). Exogenous melatonin alleviates alkaline stress in *Malus hupehensis* Rehd. By regulating the biosynthesis of polyamines. *Molecules*, 22(9), 1542.
- Han, Q.-H., Huang, B., Ding, C.-B., Zhang, Z.-W., Chen, Y.-E., Hu, C., Zhou, L.-J., Huang, Y., Liao, J.-Q., y Yuan, S. (2017). Effects of melatonin on anti-oxidative systems and photosystem II in cold-stressed rice seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 8, 785.
- Hardeland, R. (2016). Melatonin in plants—diversity of levels and multiplicity of functions. *Frontiers in Plant Science*, 7, 198.
- Hardeland, R., Pandi-Perumal, S. R., y Cardinali, D. P. (2006). Melatonin. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(3), 313-316.
- Hardeland, R., y Poeggeler, B. (2003). Non - vertebrate melatonin. *Journal of Pineal Research*, 34(4), 233-241. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2003.00040.x>
- Hayat, I., Malik, M. S., Ali, M. W., Husnain, M., Sharif, M., y Haleem, A. (2023). The Role of

Islamic Environmental Ethics in the Alleviation of Climate Challenges and the Preservation of Ecosystem. *Russian Law Journal*, 11(11S), 395-404.

Hernandez-Ruiz, J., Cano, A., y Arnao, M. B. (2004). Melatonin: A growth-stimulating compound present in lupin tissues. *Planta*, 220(1), 140-144. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1317-3>

Hernández-Ruiz, J., y Arnao, M. B. (2008). Melatonin stimulates the expansion of etiolated lupin cotyledons. *Plant Growth Regulation*, 55(1), 29-34. <https://doi.org/10.1007/s10725-008-9254-y>

Hernández-Ruiz, J., y Arnao, M. B. (2018). Relationship of melatonin and salicylic acid in biotic/abiotic plant stress responses. *Agronomy*, 8(4), 33.

Hu, S., Yin, S., Jiang, X., Huang, D., y Shen, G. (2009). Melatonin protects against alcoholic liver injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis. *European journal of pharmacology*, 616(1-3), 287-292.

*In Response to Abiotic Stress, DNA Methylation Confers EpiGenetic Changes in Plants.* (s. f.). Recuperado 13 de enero de 2025, de <https://www.mdpi.com/2223-7747/10/6/1096>

Itoh, M. T., Hattori, A., Nomura, T., Sumi, Y., y Suzuki, T. (1995). Melatonin and arylalkylamine N-acetyltransferase activity in the silkworm, *Bombyx mori*. *Molecular and cellular endocrinology*, 115(1), 59-64.

Jiang, C., Cui, Q., Feng, K., Xu, D., Li, C., y Zheng, Q. (2016). Melatonin improves antioxidant capacity and ion homeostasis and enhances salt tolerance in maize seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(4), 82. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2101-2>

Kang, S. W., Thayananuphat, A., Bakken, T., y El Halawani, M. E. (2007). Dopamine-melatonin neurons in the avian hypothalamus controlling seasonal reproduction. *Neuroscience*, 150(1), 223-233.

Kaya, A., y Doganlar, Z. B. (2019). Melatonin improves the multiple stress tolerance in pepper (*Capsicum annum*). *Scientia Horticulturae*, 256, 108509.

Ke, Q., Ye, J., Wang, B., Ren, J., Yin, L., Deng, X., y Wang, S. (2018). Melatonin mitigates salt stress in wheat seedlings by modulating polyamine metabolism. *Frontiers in plant science*, 9, 914.

Kebbeh, M., Dong, J.-X., Chen, H., Yan, L. I. U., y Zheng, X.-L. (2023). Melatonin treatment alleviates chilling injury in mango fruit 'Keitt' by modulating proline metabolism under chilling stress. *Journal of Integrative Agriculture*, 22(3), 935-944.

Khan, M., Ali, S., Manghwar, H., Saqib, S., Ullah, F., Ayaz, A., y Zaman, W. (2022). Melatonin function and crosstalk with other phytohormones under normal and stressful conditions. *Genes*, 13(10), 1699.

- Kolář, J., Johnson, C. H., y Macháčková, I. (2003). Exogenously applied melatonin ( *N* - acetyl - 5 - methoxytryptamine) affects flowering of the short - day plant *Chenopodium rubrum*. *Physiologia Plantarum*, 118(4), 605-612. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00114.x>
- Kolář, J., Macháčková, I., Eder, J., Prinsen, E., Van Dongen, W., Van Onckelen, H., y Illnerová, H. (1997). Melatonin: Occurrence and daily rhythm in *Chenopodium rubrum*. *Phytochemistry*, 44(8), 1407-1413.
- Kumari, Y., Rani, S., Tsutsui, K., y Kumar, V. (2015). Duration of melatonin regulates seasonal plasticity in subtropical Indian weaver bird, *Ploceus philippinus*. *General and Comparative Endocrinology*, 220, 46-54.
- Lee, H. Y., y Back, K. (2020). The phytomelatonin receptor (PMRT1) *Arabidopsis* Cand2 is not a bona fide G protein–coupled melatonin receptor. *Melatonin Research*, 3(2), 177-186.
- Lei, X., Zhu, R., Zhang, G., y Dai, Y. (2004). Attenuation of cold - induced apoptosis by exogenous melatonin in carrot suspension cells: The possible involvement of polyamines. *Journal of Pineal Research*, 36(2), 126-131. <https://doi.org/10.1046/j.1600-079X.2003.00106.x>
- Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, T. H., y Mori, W. (1958). ISOLATION OF MELATONIN, THE PINEAL GLAND FACTOR THAT LIGHTENS MELANOCYTES<sup>1</sup>. *Journal of the American Chemical Society*, 80(10), 2587-2587. <https://doi.org/10.1021/ja01543a060>
- Liang, D., Shen, Y., Ni, Z., Wang, Q., Lei, Z., Xu, N., Deng, Q., Lin, L., Wang, J., y Lv, X. (2018). Exogenous melatonin application delays senescence of kiwifruit leaves by regulating the antioxidant capacity and biosynthesis of flavonoids. *Frontiers in plant science*, 9, 426.
- Ma, F., y Yuan, X. (2023). When Will the Unprecedented 2022 Summer Heat Waves in Yangtze River Basin Become Normal in a Warming Climate? *Geophysical Research Letters*, 50(4), e2022GL101946. <https://doi.org/10.1029/2022GL101946>
- Melatonin, sleep disturbance and cancer risk—ScienceDirect*. (s. f.). Recuperado 8 de enero de 2025, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1087079208000786>
- Melatonina en los trastornos de sueño | Neurología*. (s. f.). Recuperado 8 de enero de 2025, de <https://www.elsevier.es/es-revista-neurologia-295-avance-resumen-melatonina-los-trastornos-sueno-S0213485318302007>
- Menichini, F., Tundis, R., Bonesi, M., Loizzo, M. R., Conforti, F., Statti, G., De Cindio, B.,

- Houghton, P. J., y Menichini, F. (2009). The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. Cv Habanero. *Food Chemistry*, 114(2), 553-560.
- Miryeganeh, M. (2021). Plants' epigenetic mechanisms and abiotic stress. *Genes*, 12(8), 1106.
- Nawaz, M. A., Huang, Y., Bie, Z., Ahmed, W., Reiter, R. J., Niu, M., y Hameed, S. (2016). Melatonin: Current status and future perspectives in plant science. *Frontiers in plant science*, 6, 1230.
- Oloumi, H., Zamani, A., Ghotbzadeh, S., y Mozaffari, H. (2024). Zinc and copper toxicity in basil (*Ocimum basilicum* L.) seedlings: Role of melatonin in mitigating stress. *Plant Stress*, 11, 100365.
- Pape, C., y Lüning, K. (2006). Quantification of melatonin in phototrophic organisms. *Journal of Pineal Research*, 41(2), 157-165. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00348.x>
- Pita, R., Marco-Contelles, J., Ramos, E., Pino, J. D., y Romero, A. (2014). Melatonin as potential candidate to prevent the toxicity induced by chemical warfare agents. *Archives of Toxicology*, 88(1), 3-4. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1111-8>
- Rai, N., Rai, S. P., y Sarma, B. K. (2021). Prospects for abiotic stress tolerance in crops utilizing phyto-and bio-stimulants. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 754853.
- Reiter, R. J., Tan, D.-X., y Galano, A. (2014). Melatonin reduces lipid peroxidation and membrane viscosity. En *Frontiers in physiology* (Vol. 5, p. 377). Frontiers Media SA. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2014.00377/full>
- Sarropoulou, V., Dimassi-Theriou, K., Therios, I., y Koukourikou-Petridou, M. (2012). Melatonin enhances root regeneration, photosynthetic pigments, biomass, total carbohydrates and proline content in the cherry rootstock PHL-C (*Prunus avium*\times *Prunus cerasus*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 61, 162-168.
- Sezer, İ., Kiremit, M. S., Öztürk, E., Subrata, B. A. G., Osman, H. M., Akay, H., y Arslan, H. (2021). Role of melatonin in improving leaf mineral content and growth of sweet corn seedlings under different soil salinity levels. *Scientia Horticulturae*, 288, 110376.
- Shafi, A., Singh, A. K., y Zahoor, I. (2021). Melatonin: Role in Abiotic Stress Resistance and Tolerance. En T. Aftab y K. R. Hakeem (Eds.), *Plant Growth Regulators* (pp. 239-273). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-61153-8\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-030-61153-8_12)
- Shan, L., Xu, Y., Wu, D., Hu, J., Yu, T., Dang, C., Fang, Y., Zhang, X., Tian, Q., y Xue, D. (2024). Effects of salicylic acid on growth, physiology, and gene expression in rice seedlings under salt and drought stress. *Plant Stress*, 11, 100413.
- Sharif, R., Xie, C., Zhang, H., Arnao, M. B., Ali, M., Ali, Q., Muhammad, I., Shalmani, A.,

- Nawaz, M. A., y Chen, P. (2018). Melatonin and its effects on plant systems. *Molecules*, 23(9), 2352.
- Sharma, S., Villamor, J. G., y Verslues, P. E. (2011). Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant physiology*, 157(1), 292-304.
- Shi, H., Chen, K., Wei, Y., y He, C. (2016). Fundamental issues of melatonin-mediated stress signaling in plants. *Frontiers in plant science*, 7, 1124.
- Shi, H., Tan, D., Reiter, R. J., Ye, T., Yang, F., y Chan, Z. (2015). Melatonin induces class A1 heat - shock factors (HSFA 1s) and their possible involvement of thermotolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Pineal Research*, 58(3), 335-342. <https://doi.org/10.1111/jpi.12219>
- Shi, H., y Chan, Z. (2014). The cysteine<sup>2</sup>/histidine<sup>2</sup> - type transcription factor *ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA 6* -activated *C - REPEAT - BINDING FACTOR* pathway is essential for melatonin - mediated freezing stress resistance in *Arabidopsis*. *Journal of Pineal Research*, 57(2), 185-191. <https://doi.org/10.1111/jpi.12155>
- Spormann, S., Nadais, P., Sousa, F., Pinto, M., Martins, M., Sousa, B., Fidalgo, F., y Soares, C. (2023). Accumulation of proline in plants under contaminated soils—Are we on the same page? *Antioxidants*, 12(3), 666.
- Stevens, R. G. (1993). Breast cancer and electric power. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 47(10), 435-438.
- Tan, D., Hardeland, R., Manchester, L. C., Poeggeler, B., Lopez - Burillo, S., Mayo, J. C., Sainz, R. M., y Reiter, R. J. (2003). Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *Journal of Pineal Research*, 34(4), 249-259. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2003.00037.x>
- Tan, D.-X. (2015). Melatonin and plants. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 625-626.
- Tanimoto, E. (2005). Regulation of Root Growth by Plant Hormones—Roles for Auxin and Gibberellin. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(4), 249-265. <https://doi.org/10.1080/07352680500196108>
- Urano, D., y Jones, A. M. (2013). “Round up the usual suspects”: A comment on nonexistent plant G protein-coupled receptors. *Plant physiology*, 161(3), 1097-1102.
- Van Tassel, D. L., Roberts, N., Lewy, A., y O'Neill, S. D. (2001). Melatonin in plant organs. *Journal of Pineal Research*, 31(1), 8-15. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2001.310102.x>

- Weeda, S., Zhang, N., Zhao, X., Ndip, G., Guo, Y., Buck, G. A., Fu, C., y Ren, S. (2014). Arabidopsis transcriptome analysis reveals key roles of melatonin in plant defense systems. *PLoS one*, 9(3), e93462.
- Wei, W., Li, Q.-T., Chu, Y.-N., Reiter, R. J., Yu, X.-M., Zhu, D.-H., Zhang, W.-K., Ma, B., Lin, Q., y Zhang, J.-S. (2015). Melatonin enhances plant growth and abiotic stress tolerance in soybean plants. *Journal of experimental botany*, 66(3), 695-707.
- Wolf, K., Kolář, J., Witters, E., van Dongen, W., van Onckelen, H., y Macháčková, I. (2001). Daily profile of melatonin levels in *Chenopodium rubrum* L. depends on photoperiod. *Journal of Plant Physiology*, 158(11), 1491-1493.
- Xu, S.-C., He, M.-D., Zhong, M., Zhang, Y.-W., Wang, Y., Yang, L., Yang, J., Yu, Z.-P., y Zhou, Z. (2010). Melatonin protects against Nickel-induced neurotoxicity in vitro by reducing oxidative stress and maintaining mitochondrial function: Melatonin protects against nickel-induced neurotoxicity. *Journal of Pineal Research*, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00770.x>
- Ye, J., Wang, S., Deng, X., Yin, L., Xiong, B., y Wang, X. (2016). Melatonin increased maize (*Zea mays* L.) seedling drought tolerance by alleviating drought-induced photosynthetic inhibition and oxidative damage. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(2), 48. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-2045-y>
- Yu, L., Liang, H., Dong, X., Zhao, G., Jin, Z., Zhai, M., Yang, Y., Chen, W., Liu, J., Yi, W., Yang, J., Yi, D., Duan, W., y Yu, S. (2015). Reduced silent information regulator 1 signaling exacerbates myocardial ischemia–reperfusion injury in type 2 diabetic rats and the protective effect of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 59(3), 376-390. <https://doi.org/10.1111/jpi.12269>
- Zhang, N., Sun, Q., Li, H., Li, X., Cao, Y., Zhang, H., Li, S., Zhang, L., Qi, Y., y Ren, S. (2016). Melatonin improved anthocyanin accumulation by regulating gene expressions and resulted in high reactive oxygen species scavenging capacity in cabbage. *Frontiers in Plant Science*, 7, 197.
- Zhang, T., Shi, Z., Zhang, X., Zheng, S., Wang, J., y Mo, J. (2020). Alleviating effects of exogenous melatonin on salt stress in cucumber. *Scientia Horticulturae*, 262, 109070.
- Zhao, C., Guo, H., Wang, J., Wang, Y., y Zhang, R. (2021). Melatonin enhances drought tolerance by regulating leaf stomatal behavior, carbon and nitrogen metabolism, and related gene expression in maize plants. *Frontiers in Plant Science*, 12, 779382.