



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

**ESTUDIO DE LA MADURACION POSTCOSECHA EN  
FRUTOS DE CHILE ANCHO ( *Capsicum annuum* L.)  
BAJO CONDICIONES DE ESTRES SALINO**

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
( Orientación Ecología de Zonas Áridas )

Presenta  
**Rogelio Ramírez Serrano**

La Paz, Baja California Sur, Diciembre de 2008

## RESUMEN

Las plantas están expuestas a diferentes estreses bióticos y abióticos, los cuales a su vez inducen estrés oxidativo. La salinidad y la sequía son los factores abióticos más severos que limitan la productividad de las plantas. La salinidad interrumpe, restringe o acelera los procesos metabólicos normales, tal como la maduración y la senescencia, y siempre en un sentido negativo o adverso. Entender el proceso de la maduración en frutos frescos cultivados bajo condiciones de salinidad es un prerrequisito para mejorar la calidad del fruto y su almacenamiento postcosecha. Por tal razón, el presente trabajo de estudio se enfocó en el estudio de la respuesta de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) en frutos de chile (*Capsicum annum L.*) cv. Caballero al someter las plantas a estrés salino moderado en etapa de cosecha y postcosecha. En la primera etapa las plantas fueron expuestas en macetas durante 90 días a cinco tratamientos: control (agua potable;  $1,3\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ ), NaCl ( $2,8$  y  $4,0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ ) y agua de mar ( $2,8$  y  $4,0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ ). Los frutos fueron cosechados en etapa de maduración y se midió pigmentación a la madurez, número, largo, ancho, peso fresco, contenido mineral ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ), proteínas, actividad de SOD y CAT, lipoperoxidación y ácido ascórbico. No hubo diferencias significativas en número de frutos, largo, ancho y peso fresco. Los tratamientos produjeron diferencias en pigmentación de los frutos en la madurez, cambiando al rojo en ambas fuentes salinas a  $4,0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ . Las proteínas solubles aumentaron en  $2,8\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ , pero disminuyeron al aumentar la C.E. en ambas fuentes salinas. Los contenidos de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  disminuyeron al incrementar la C.E., mientras  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  aumentaron en  $4,0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$  (NaCl). El ácido ascórbico aumentó ligeramente en  $2,8\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ . El estrés salino incrementó la lipoperoxidación y la actividad de SOD y CAT siendo mayores en  $4,0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ , y la respuesta en  $2,8\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$  en ambas fuentes de salinidad pareció mantener la homeostasis celular sin alterar la maduración. Se sugiere la posibilidad de utilizar las enzimas SOD y CAT como biomarcadores de maduración en frutos de chile bajo estrés salino, al mostrar una alta actividad en la maduración cuando se utilizó NaCl o agua de mar. En la etapa postcosecha el experimento se estableció en macetas bajo un diseño completamente al azar con diez repeticiones, exponiendo las plantas de chile durante 90 días a tres tratamientos salinos: 0, 12.5 y 25 mM de NaCl. Después de cosechar los frutos en la etapa de maduración, estos se almacenaron durante 0, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 días. Al momento de la cosecha, se contabilizó el número de frutos cosechados y se midieron variables morfológicas como la longitud, el diámetro y el peso fresco de frutos cosechados, así como la actividad de la SOD, la CAT, lipoperoxidación, el ácido ascórbico, las proteínas carboniladas, el contenido de clorofila *a* y *b*, el contenido de pigmentos carotinoides (violaxantina, zeaxantina y beta-caroteno). Los resultados mostraron que el número de frutos cosechados y las variables morfológicas medidas, permanecieron sin diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, pero con valores iguales o ligeramente menores que el tratamiento control. Sin embargo, el resto de las variables mostraron diferencias significativas para los tratamientos salinos aplicados, para los diferentes tiempos de almacenamiento, así como para la interacción de estos dos factores. Los resultados sugieren la posibilidad de utilizar las enzimas SOD y CAT como biomarcadores de maduración en frutos de chile bajo condiciones de estrés salino, ya que mostraron una alta actividad en la maduración de los frutos cuando se utilizó NaCl.

**Palabras clave:** biomarcadores, umbrales de salinidad, superóxido dismutasa, catalasa.

  
Dr. Juan A. Larrinaga Mayoral

Co-Director de Tesis


  
Dr. Bernardo Murillo Amador

Co-Director de Tesis

## ABSTRACT

The plants under different expositions to abiotic stress, load an oxidative stress. The drought and salinity are the main abiotic factors that affect the plant productivity. The salinity, irrupt, decreasing or limit the normal metabolic process, that us: maturation, senescence, and always in negative way. The understanding of maturity process in fresh fruit cultivate under salinity conditions, is a purpose to increase the fruit quality and improve the postharvest life conditions for a better consumption in the market respectively. A pot experiment was carried out with hot pepper (*Capsicum annuum* L.) cv. "Caballero" to investigate the response of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in fruits of this species under moderate saline conditions at harvest and postharvest stages. In the first stage the hot pepper plants were exposed during 90 days to five treatments: I) control (potable water:  $1.3 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ ), II) NaCl ( $2.8 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ ), III) NaCl ( $4.0 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ ), IV) sea water ( $2.8 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ ), and V) sea water ( $4.0 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ ). The hot pepper fruits were collected in the ripening phase and the ripening pigmentation, number of fruits, length, width, fresh weight, mineral contents ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ ), proteins, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity, lipoperoxidation and ascorbic acid were measured. The results showed that morphological variables number, length, width and fresh weight of fruits remained without statistical significant differences between treatments but stayed the same as, or slightly less than that of the control. Saline treatments caused differences in fruit ripening pigmentation, changing to red color at  $4.0 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$  when NaCl or sea water were applied. Content of soluble proteins increased from the control to  $2.0 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$  but decreased as electrical conductivity (EC) increased with NaCl or sea water. Calcium, magnesium, potassium and manganese content, decreased as CE increased, but sodium and chloride showed the contrary; being higher at  $4.0 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$  with NaCl. Ascorbic acid remained unchanged between treatments, although slightly increased at  $2.8 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$  (NaCl). Salt stress was found to increase lipoperoxidation, superoxide dismutase and catalase activities being higher at  $4.0 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$  when NaCl was used, but this enzymatic response in fruits at  $2.8 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$  in both saline sources, seemed to have maintained the cellular homeostasis, without altering its ripening. These findings suggest the possibility to use the enzymes SOD and CAT as ripening biomarkers in hot pepper fruits under saline stress, because they showed a high activity in the ripening of fruits when NaCl or sea water was used. Under postharvest stage the plants were exposed during 90 days to a three salinity treatments: 0, 12.5 and 25 mM de NaCl. The fruits were collected in the ripening phase and then were storage during 0, 15, 30, 45, 60, 75, and 90 days. At harvest time, the number of harvested fruits, length, diameter, and fresh weight of fruits, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity, lipoperoxidation, ascorbic acid content, protein carbonyls, chlorophyll *a* and *b* content, and carotenoids content (violaxantine, zeaxantine, and beta-carotene) were measured. The results showed that number of harvested fruits and morphological fruits remained without statistical differences between treatments. However, the other variables measured showed significant differences between salinity treatment, storage times and the interaction of both factors. The results suggest the possibility to use the enzymes SOD and CAT as ripening biomarkers in hot peppers fruits under saline stress, because of they showed a high activity in the ripening of fruits when NaCl was used.

**Keywords:** biomarkers, salinity, superoxide dismutase and catalase.

  
Dr. Juan A. Larrinaga Mayoral

Co-Director de Tesis

  
Dr. Bernardo Murillo Amador

Co-Director de Tesis

---

**COMITÉ TUTORIAL**

---

<b>Co-Directores de Tesis:</b>	Dr. Juan A. Larrinaga Mayoral	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste	México
	Dr. Bernardo Murillo Amador	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste	México
<b>Co-Tutores de Tesis:</b>	Dr. Norma Y. Hernández Saavedra	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste	México
	Dr. Hideyasu Fujiyama	Universidad de Tottori	Japón
	Dr. Ana Jiménez Hurtado	Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura-CSIC	España

---

**COMITÉ DE EXAMEN DE GRADO**

---

<b>Co-Directores de Tesis:</b>	Dr. Juan A. Larrinaga Mayoral	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste	México
	Dr. Bernardo Murillo Amador	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste	México
<b>Co-Tutores de Tesis:</b>	Dr. Norma Y. Hernández Saavedra	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste	México
	Dr. Ana Jiménez Hurtado	Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura-CSIC	España
<b>Suplente:</b>	Dra. Lilia Alcaraz Meléndez	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste	México

## **DEDICATORIA.**

**Quiero dedicar esta Tesis a mi princesa **Yaksha**, por toda su energía y amor  
más allá de la distancia y el tiempo...**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por permitirme continuar aquí, asombrándome cada vez más de su enorme energía.

A mis Yakshas por ser el motivo de mi felicidad.

A mis Padres y hermanos por todo su apoyo, ahora viene lo bueno.

A mi Comité Tutorial Juan Larrinaga, Bernardo Murillo, Norma Hernández, Ana Jiménez y Hideyasu Fuijyama por su gran apoyo y consejos en esta aventura científica.

A María del Carmen (Mamen), Bea, Mar, Loli, Daymi por su enorme ayuda durante mi estancia en el gran CEBAS-CSIC de Murcia, España.

A todo Mexicano quien con su esfuerzo, contribuye de manera indirecta en financiar este trabajo de Tesis Doctoral a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

A la Comunidad del CIBNOR quien con una palabra o ayuda técnica me motivaron a seguir adelante en esta aventura Científica.

A mis compañeros de Posgrado y del grupo de Estrés Oxidativo.

Al personal del Departamento de Posgrado, Dra. Thelma, Lic. Osvelia, Lic. Leticia, Lupita, Bety, Claudia, Horacio, Manuel, mil gracias por todo.

Al CONACYT por su apoyo económico a través de la beca crédito No. 144425 (Doctorado).

Al Patronato del Estudiante Sudcaliforniano, en especial al Prof. Alejandro Merino Orea, por otorgar su apoyo a los estudiantes de Baja California Sur, en tiempos de crisis.

<b>CONTENIDO:</b>	<b>Página:</b>
<b>RESUMEN</b>	
<b>INDICE DE CONTENIDO</b>	
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	
<b>INDICE DE TABLAS</b>	
<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
1.1 Revisión de literatura.	
1.1.1 El fruto de chile ( <i>Capsicum annuum</i> L.)	4
1.1.1.1 Importancia economica	5
1.1.1.2 Importancia nutricional	6
1.1.2 Agricultura de zonas áridas	7
1.1.3 Estrés salino	8
1.1.3.1 Estrés osmótico	10
1.1.3.2 Estrés iónico	10
1.1.4 Estrés oxidativo	11
1.1.5 Respuestas al estrés	12
1.1.5.1 Antioxidantes no enzimáticos	13
1.1.5.2 Antioxidantes enzimáticos	16
1.1.6 Señalización del estrés	16
1.1.7 Maduración y senescencia	18
1.1.8 Biomarcadores	18
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>19</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>28</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>29</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
5.1 Objetivo General.	31
5.2 Objetivos Específicos	31
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>32</b>
<b>Primer Artículo: Respuesta antioxidante enzimática en frutos de chile ancho (<i>Capsicum annuum</i> L.) bajo condiciones de estrés salino. (Artículo publicado).</b>	
<b>6.1 Materiales y métodos</b>	<b>33</b>
6.1.1 Material genético	33
6.1.2 Descripción del sitio de estudio	33

6.1.3	Diseño del cultivo de chile	34
6.1.4	VARIABLES MORFOLÓGICAS Y PESO DE FRUTOS	35
6.1.5	Contenido de iones	35
6.1.6	Preparación de los extractos crudos	36
6.1.7	Contenido de proteína total	37
6.1.8	Actividad súperoxido dismutasa (SOD) total	37
6.1.9	Actividad catalasa (CAT)	37
6.1.10	Contenido de ácido ascórbico-L	38
6.1.11	Nivel de peroxidación de lípidos	38
6.1.12	Análisis estadísticos	39
<b>6.2</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>40</b>
6.2.1	VARIABLES MORFOLÓGICAS Y PESO DE FRUTOS	40
6.2.2	Contenido de iones	42
6.2.3	Contenido de proteína total	43
6.2.4	Actividad súperoxido dismutasa (SOD) total	44
6.2.5	Actividad catalasa (CAT)	45
6.2.6	Contenido de ácido ascórbico-L	47
6.2.7	Nivel de peroxidación de lípidos.	47
	<b>Segundo artículo: Biomarcadores de maduración postcosecha en frutos de chile (<i>Capsicum annuum</i> L.) cultivados bajo condiciones de estrés salino. (Artículo sometido).</b>	<b>50</b>
<b>6.3</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>51</b>
6.3.1	Material genético	51
6.3.2	Descripción del sitio de estudio	51
6.3.3	Diseño del cultivo	52
6.3.4	Inducción del estrés salino	52
6.3.5	VARIABLES MORFOLÓGICAS Y PESO DE FRUTOS	52
6.3.6	Almacenamiento a 4°C	53
6.3.7	Preparación de extractos crudos	53
6.3.8	Contenido de proteínas total	54
6.3.9	Actividad súperoxido dismutasa (SOD)	54
6.3.9.1	Actividad súperoxido dismutasa (SOD) total	54
6.3.9.2	Isoenzimas súperoxido dismutasa (SOD)	54
6.3.10	Actividad catalasa (CAT)	55
6.3.11	Contenido de ácido ascórbico-L	55
6.3.12	Nivel de peroxidación de lípidos	56



6.3.13	Nivel de proteínas carboniladas	56
6.3.14	Contenido de pigmentos	57
6.3.15	Análisis estadísticos	58
<b>6.4</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>59</b>
6.4.1	Inducción del estrés salino	59
6.4.2	Variables morfológicas y peso de frutos	59
6.4.3	Almacenamiento a 4 °C	60
6.4.4	Contenido de proteína total	61
6.4.5	Actividad súperoxido dismutasa (SOD)	62
	6.4.5.1 Actividad súperoxido dismutasa (SOD) total	62
	6.4.5.2 Isoenzimas súperoxido dismutasa (SOD)	64
6.4.6	Actividad catalasa (CAT)	67
6.4.7	Contenido de ácido ascórbico-L	69
6.4.8	Nivel de peroxidación de lípidos.	71
6.4.9	Nivel de proteínas carboniladas	72
6.4.9	Contenido de pigmentos	73
	6.4.9.1 Clorofilas <i>a</i> y <i>b</i>	73
	6.4.9.2 Carotenoides	76
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>80</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>84</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>94</b>

<b>INDICE DE FIGURAS.</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Principales productores de chile en el mundo.	<b>5</b>
<b>Figura 2.</b> Ciclo ascorbato-glutatión para la eliminación de ERO's. Principal amortiguador celular Redox.	<b>15</b>
<b>Figura 3.</b> Diagrama de los componentes de una respuesta al estrés por medio de una cascada de señalización.	<b>17</b>
<b>Figura 4.</b> <b>A.</b> Sitio de estudio del cultivo de chile ancho cv. Caballero (90 días). Frutos recolectados correspondientes a los tratamientos: <b>B.</b> I: Control 1.3 dS·m <sup>-1</sup> ; <b>C.</b> II: NaCl 2.8 dS·m <sup>-1</sup> ; <b>D.</b> III: NaCl 4.0 dS·m <sup>-1</sup> ; <b>E.</b> IV: agua de mar 2.8 dS·m <sup>-1</sup> ; y <b>F.</b> V: agua de mar 4.0 dS·m <sup>-1</sup> .	<b>40</b>
<b>Figura 5.</b> <b>A)</b> Actividad superóxido dismutasa total (SOD) y <b>B)</b> Actividad de la catalasa (CAT) en frutos de chile ancho cv. Caballero. Tratamientos. I: Control 1.3 dS·m <sup>-1</sup> ; II: NaCl 2.8 dS·m <sup>-1</sup> ; III: NaCl 4.0 dS·m <sup>-1</sup> ; IV: agua de mar 2.8 dS·m <sup>-1</sup> ; y V: agua de mar 4.0 dS·m <sup>-1</sup> . Las barras en símbolos representan la media ± error estándar.	<b>46</b>
<b>Figura 6.</b> <b>A)</b> Concentración de ácido ascórbico y <b>B)</b> Nivel de peroxidación de lípidos en frutos de chile ancho cv. Caballero. Tratamientos. I: Control 1.3 dS·m <sup>-1</sup> ; II: NaCl 2.8 dS·m <sup>-1</sup> ; III: NaCl 4.0 dS·m <sup>-1</sup> ; IV: agua de mar 2.8 dS·m <sup>-1</sup> ; y V: agua de mar 4.0 dS·m <sup>-1</sup> . Las barras en símbolos representan la media ± error estándar.	<b>48</b>
<b>Figura 7.</b> Frutos de chile ancho cv. Caballero en etapa verde, recolectados a los 60 días de crecimiento. Tratamientos. <b>I:</b> Control; <b>II:</b> 12.5 mM NaCl; <b>III:</b> 25 mM NaCl.	<b>59</b>

<b>Figura 8.</b>	Contenido de proteína total en frutos de chile ancho <i>cv.</i> Caballero durante el tiempo de almacenamiento postcosecha a 4°C. Tratamientos. I: Control; II: 12.5 mM NaCl; III: 25.0 mM NaCl. Las barras en los símbolos representan la media ± error estándar.	<b>61</b>
<b>Figura 9.</b>	Actividad superóxido dismutasa total (SOD) en frutos de chile ancho <i>cv.</i> Caballero durante el tiempo de almacenamiento postcosecha a 4°C. Tratamientos. I: Control; II: 12.5 mM NaCl; III: 25.0 mM NaCl. Las barras en los símbolos representan la media ± error estándar.	<b>62</b>
<b>Figura 10.</b>	Estudio de las isoenzimas Mn-SOD, Fe-SOD y Cu,Zn SOD's durante el tiempo de almacenamiento a 4°C. Tratamientos. <b>I:</b> Control; <b>II:</b> 12.5 mM NaCl; <b>III:</b> 25 mM NaCl.	<b>65</b>
<b>Figura 11.</b>	Actividad catalasa (CAT) en frutos de chile ancho <i>cv.</i> Caballero durante el tiempo de almacenamiento postcosecha a 4°C. Tratamientos. I: Control; II: 12.5 mM NaCl; III: 25.0 mM NaCl. Las barras en los símbolos representan la media ± error estándar.	<b>68</b>
<b>Figura 12.</b>	Concentración de ácido ascórbico en frutos de chile ancho <i>cv.</i> Caballero durante el tiempo de almacenamiento postcosecha a 4°C. Tratamientos. I: Control; II: 12.5 mM NaCl; III: 25.0 mM NaCl. Las barras en los símbolos representan la media ± error estándar.	<b>70</b>

- Figura 13.** Nivel de peroxidación de lípidos en frutos de chile ancho cv. Caballero durante el tiempo de almacenamiento postcosecha a 4°C. Tratamientos. I: Control; II: 12.5 mM NaCl; III: 25.0 mM NaCl. Las barras en los símbolos representan la media  $\pm$  error estándar. **71**
- Figura 14.** Contenidos de **A)** clorofila *a* y **B)** clorofila *b* en frutos de chile ancho cv. Caballero durante el tiempo de almacenamiento postcosecha a 4°C. Tratamientos. I: Control; II: 12.5 mM NaCl; III: 25.0 mM NaCl. Las barras en los símbolos representan la media  $\pm$  error estándar. **75**
- Figura 15.** Contenido de: **A)**  $\beta$ -caroteno **B)** zeaxantina y **C)** violaxantina en frutos de chile ancho cv. Caballero durante el tiempo de almacenamiento postcosecha a 4°C. Tratamientos. I: Control; II: 12.5 mM NaCl; III 25.0 mM NaCl. Las barras en los símbolos representan la media  $\pm$  error estándar. **78**

<b>INDICE DE TABLAS.</b>		<b>Página</b>
<b>Tabla I.</b>	Principales especies reactivas de oxígeno (ERO).	11
<b>Tabla II</b>	Principales enzimas antioxidantes.	16
<b>Tabla III.</b>	Características técnicas de los tratamientos usados como inductores de estrés salino en el cultivo de chile ancho cv. Caballero.	34
<b>Tabla IV.</b>	Número de frutos, Longitud, Diámetro, Peso fresco, Coloración y Proteína total de frutos de chile ancho cv. Caballero.	41
<b>Tabla V.</b>	Contenido de iones en base a peso seco en frutos de chile ancho cv. Caballero.	43
<b>Tabla VI.</b>	Nivel de proteínas carboniladas en frutos de chile ancho cv. Caballero durante el tiempo de almacenamiento a 4°C.	73

## 1. INTRODUCCION

El problema de la salinidad es enorme, alrededor de 800 millones ha de tierra (7%) en todo el mundo son afectadas por la sal, 397 millones ha (por salinidad) y 434 millones ha (asociadas a una condición de sodicidad). De las 230 millones ha de tierra irrigada, 45 millones ha son afectadas por la sal (20%) (FAO, 2005).

Debido a su ubicación geográfica, las regiones áridas y semiáridas de México representan alrededor del 60% de su extensión territorial, concentrándose la mayor parte en el norte y noroeste del país. (León, 1984). De acuerdo con Madrigal (1996) entre 1.8 y 4.0 millones de hectáreas de los 12 millones de hectáreas bajo riego en México presentan altas concentraciones de sales que reducen el rendimiento de los cultivos. El estado de Baja California Sur (B.C.S.), situado en el noroeste de México constituye en su mayor extensión territorial con regiones áridas, con una precipitación pluvial del orden de 110 a 175 mm anuales en todo el estado (Cervantes y Lozano, 1983).

Debido a la baja precipitación pluvial anual en todo el estado sus regiones hidrológicas se sitúan como las más secas del país (INEGI, 2006). La principal zona agrícola enfrenta serios problemas por la contaminación salina de sus suelos y del agua del subsuelo derivado de malas prácticas agrícolas en el manejo del riego y la fertilización, ya que el estrés generado por la salinidad afecta directamente al crecimiento y la productividad de los cultivos. Aunado a esto, la agricultura del estado compite por el recurso agua con la creciente urbanización, la constante preocupación ecológica hacia una mayor protección de los recursos naturales y medidas más drásticas en las regulaciones gubernamentales para la extracción de agua del subsuelo. Con base en la información previa, el agua para riego, es

entonces el factor limitante para el desarrollo de la productividad agrícola de estado. En este sentido y ante la escasez de agua de buena calidad en estas áreas es necesario optar por alternativas como el uso de aguas salinas para el riego. No sin antes estudiar las respuestas metabólicas en las plantas expuestas a estos factores ambientales, a través de parámetros bioquímicos y moleculares y su implicación directa en los sistemas de defensa antioxidante de los mecanismos de tolerancia al estrés oxidativo.

Foyer (1993) sugirió que la tolerancia al estrés es debida a un aumento en la capacidad antioxidante de las plantas. La caracterización bioquímica y su análisis molecular pueden probar esta hipótesis (Martínez, 2003). De acuerdo con el significado biológico, la respuesta al estrés no solo tiene como consecuencia la reparación de los daños ocurridos, sino que también permite la adaptación o tolerancia al estrés, y, por tanto, el establecimiento de mecanismos que previenen el daño. Desde luego, la exposición a un estrés moderado provoca un mejoramiento en la resistencia a un estrés mucho más severo (tolerancia cruzada), por lo tanto, como respuesta a una condición de estrés, la célula produce una serie de proteínas a diferentes niveles o con diferente actividad que aquellas que se sintetizaban antes de la condición de estrés (Hernández-Saavedra y Ramírez-Serrano, 2003).

El cultivo de chile ancho (*Capsicum annum* L.) es uno de los principales cultivos del estado por lo que su cadena productiva es considerada como prioritaria en B.C.S. Debido a su creciente demanda, actualmente se ocupa una superficie sembrada con más de 4000 hectáreas distribuidas en las principales zonas agrícolas. La necesidad de mejorar las condiciones de vida de anaquel, es fundamental, ya que los mercados de consumo están a más de 1000 km de distancia.

Para el estudio aquí presentado fue seleccionada la especie de chile ancho (*Capsicum annumm* L.) cv. Caballero como modelo de estudio para identificar los mecanismos de respuesta al estrés generado por salinidad en el agua de riego.

Recientemente la estrategia del gobierno del estado, para el desarrollo de la agricultura de zonas áridas, ha sido impulsar la reconversión de la agricultura tradicional a campo abierto por una agricultura intensiva en invernadero, donde el uso de aguas de baja calidad, podrían ser una alternativa a utilizar, debido a la creciente demanda de agua potable por centros urbanos en constante crecimiento. Con el uso de invernaderos, las condiciones climáticas (temperatura y luz) se modifican, de tal manera que se propicia una agricultura intensiva. Esto puede permitir encarar el reto del aprovechamiento del agua con alto contenido de sales de esta región, para la producción de cultivos que desarrollen mejores respuestas a la salinidad, generando como resultado un mayor contenido de antioxidantes de importancia nutricional.

Por tal razón, el presente estudio se oriento a la identificación de marcadores biológicos (biomarcadores) de tolerancia al estrés salino del cultivo de chile ancho (*Capsicum annumm* L.) cv. Caballero y mediante estos poder desarrollar estrategias de manejo del cultivo para diferentes niveles de estrés (moderados) que induzcan una mayor calidad poscosecha a través del estímulo del sistema de defensa antioxidante y adicionalmente poder determinar momentos óptimos de almacenamiento poscosecha.



### 1.1.1 El fruto de chile (*Capsicum annum* L.)

En México se utiliza la palabra chile del náhuatl *chilli*, para referirse a todo fruto clasificado dentro del género *Capsicum*, pero también es conocido que en otros países existen diferentes vocablos para referirse a las distintas variedades de chile.

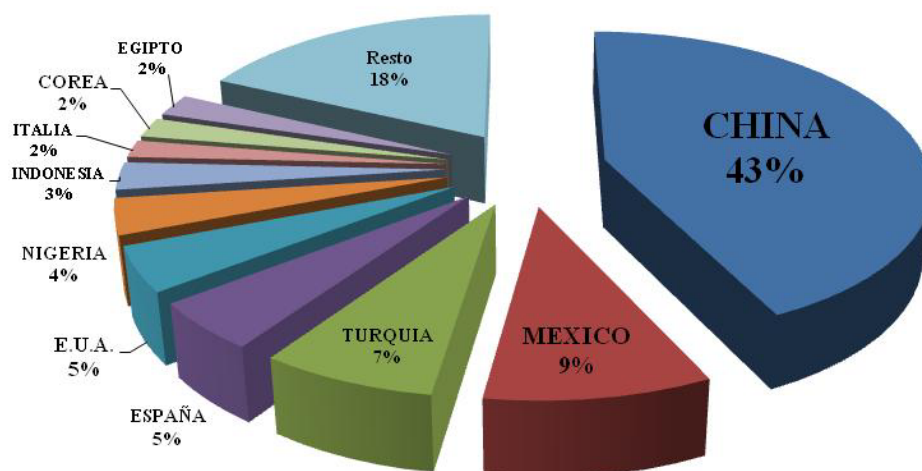
El chile es originario del sur de la selva de Bolivia nombrado en otro tiempo como el Alto Perú. Llego a México proveniente de los Andes y los antiguos mexicanos, que eran grandes agricultores, adoptaron al chile como cosa muy suya, se dedicaron a cultivarlo, perfeccionarlo y estudiarlo genéticamente y produjeron con su magnífica creatividad y con el sudor de su frente, una asombrosa variedad de chiles, todos los cuales son descendientes del primer chilecito andino o ají, como lo nombran los sudamericanos. Los chiles fueron llevados a España, por Cristóbal Colon a comienzos del siglo XVI, desde donde se dispersaron por el resto del mundo (Cabieses, 2003).

La planta de chile es una angiosperma dicotiledónea. Son hierbas o arbustos anuales que pueden ser perennes si las condiciones son favorables. El chile es un fruto llamado simple baya: fruto carnosos huecos en forma de capsula y llenos de aire en cuyo interior se encuentran las semillas. Cada flor produce gametos masculinos y femeninos (es hermafrodita) y tiene de cinco a ocho pétalos, entre cinco y ocho estambres y de dos a cuatro pistilos. Todos los chiles pertenecen al género *Capsicum*, el cual se incluye en la familia de las solanáceas. La clasificación de las especies de chile se basa principalmente en la forma de flores, la genética, la bioquímica y la distribución geográfica. Aunque el género *Capsicum* incluye mas de 26 especies, solo 12 especies, mas algunas variedades, son utilizadas por el hombre; y de estas, solo cinco han sido domesticadas y se cultivan (López-Riquelme, 2003)

### 1.1.1.1 Importancia Económica

Actualmente el chile después del tomate es el segundo vegetal mas consumido en el mundo, de ahí su gran importancia agronómica, económica y comercial. Se estima que una cuarta parte de la población mundial consume chile diariamente, bien sea en forma directa o por el consumo de alimentos procesados que lo contienen (Szallasi y Blumberg, 1999).

A pesar de que México es el país con la mayor diversidad genética de *Capsicum* y de que el chile es casi un sinónimo de la nacionalidad mexicana y de su cocina, no es el productor más importante. China es el principal productor mundial de chile respecto al genérico 'chiles verdes', con un 43% de la producción mundial, desplazando a los productores mexicanos al segundo lugar con apenas el 9% de la producción mundial (Fig.1) de acuerdo con los recientes informes estadísticos



**Fig.1 Principales productores de chile en el mundo.** Datos en porcentaje.

Fuente: FAO, 2005.

### 1.1.1.2 Importancia Nutricional

El chile es la principal especie hortícola alimenticia en México, y constituye junto con el maíz y el frijol la base de la alimentación de los mexicanos. Desde la época prehispánica ha sido indirectamente una fuente de nutrientes para las culturas de Mesoamérica. Ciertamente, los mexicanos no consumimos chile por su valor nutricional, su consumo involucra una característica cultural persistente (López-Riquelme, 2003).

Además del agua, el cual representa el 90% del contenido del fruto de chile fresco, fibra, pectinas, glucosa y fructosa representan los principales componentes. Esto hace que sea una hortaliza con un bajo aporte calórico y, al igual que el resto de verduras, su contenido proteico es muy bajo y apenas aporta grasas (Mateos, 2006).

El chile es una buena fuente dietética de antioxidantes como los compuestos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico, vitamina A, carotenoides que tienen actividad pro-vitamina A como el  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina y los propios capsaicinoides (Howard *et al.* 1998, Matsfujii *et al.*, 1998; Osuna-García *et al.*, 1998, Kader y Lee, 2000). Estos antioxidantes cuando se ingieren en cantidades adecuadas diarias, se ha reconocido que son benéficos para la prevención de enfermedades crónicas extendidas en el ser humano, como ciertos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Sies, 1991; Bramley, 2000, Mori *et al.*, 2006; Luqman y Rizvi, 2006).

### **1.1.2 Agricultura de zonas áridas**

Se entiende por zonas áridas, aquellas áreas cuya precipitación es menor a 350 mm anuales, que presentan una distribución de lluvias muy irregular durante el ciclo vegetativo, temperatura media anual que oscila entre los 15 y 25°C, mas de 7 meses de sequía y cuya cubierta vegetal es menor al 70%, predominando en ella los elementos xerófitos (Villa, 1981). Las principales zonas áridas del mundo se distribuyen a lo largo de dos cinturones que pasan por los trópicos de Cáncer y de Capricornio respectivamente. Comprenden una superficie del orden de 20 millones de kilómetros cuadrados, equivalente al 14% de la superficie total del planeta.

Los suelos de regiones áridas presentan graves problemas de salinidad con cloruro de sodio (NaCl), aunque lo más común es la presencia de sales básicas como los cloruros, sulfatos y bicarbonatos de sodio, magnesio y calcio. Dichos suelos tienen pH alto ( $\geq 8.5$ ), contenido alto de yeso (yermosol), cuando húmedos son pegajosos y una vez secos se endurecen formando costras. Debido a su ubicación geográfica, las regiones áridas y semiáridas de México representan alrededor del 60% de su extensión territorial, concentrándose la mayor parte en el norte y noroeste del país. (León, 1984). De acuerdo con Madrigal (1996) entre 1.8 y 4.0 millones de hectáreas de los 12 millones de hectáreas bajo riego en México presentan altas concentraciones de sales que reducen el rendimiento de los cultivos. El estado de Baja California Sur (B.C.S.), situado en el noroeste de México constituye en su mayor extensión territorial con regiones áridas, con una precipitación pluvial del orden de 110 a 175 mm anuales en todo el estado (Cervantes y Lozano, 1983). Por lo que no es de extrañar que las regiones hidrológicas del Vizcaíno (02) y la región de la Magdalena (03) localizadas en B.C.S., sean las más secas del país.

### 1.1.3 Estrés Salino

El término estrés es ampliamente utilizado en la literatura pero es raramente definido. Una definición biológica que describe el estado del organismo se refiere al estrés como un conjunto de respuestas bioquímicas o fisiológicas que definen un estado particular del organismo diferente al observado bajo un rango de condiciones óptimas (Benavides, 2002).

El estrés abiótico o ambiental es una fuerte restricción para el aumento de la productividad y de la extensión de los cultivos. Se estima que únicamente un 10% de la superficie de tierra arable se encuentra libre de estrés, 26% es afectada por estrés hídrico (sequía) y por increíble que parezca solo el 7% por estrés salino (salinidad) (Blum, 1988; Munns *et al.*, 1999; Munns, 2005). El estrés salino, hídrico y las temperaturas extremas son los factores ambientales que más limitan el crecimiento de las plantas y la producción de alimentos de origen vegetal incluso bajo condiciones de producción protegida como invernaderos y túneles (Berry y Bjorkman, 1980; Boyer, 1982; Powles, 1984).

El problema de la salinidad es enorme, alrededor de 800 millones ha de tierra (7%) durante todo el mundo son afectadas por sal, 397 millones ha (por salinidad) y 434 millones ha (asociadas a una condición de sodicidad). De las 230 millones ha de tierra irrigada, 45 millones ha son afectadas por la sal (20%) (FAO, 2005).

Desde el punto de vista agrícola se considera un suelo como salino si su conductividad eléctrica (C.E.) es igual ó superior a  $4 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ , mientras que desde el punto de vista ecológico se habla de suelos salinos si la concentración de NaCl es superior a 70 mM, ya que éste es el límite a partir del cual se observa una flora halófila (plantas

tolerantes a condiciones salinas) y no sobreviven las glicófitas (plantas sensibles a condiciones salinas).

La salinidad del suelo se ve incrementada fuertemente en regiones áridas en donde la tasa anual de evaporación del suelo supera la cantidad de agua proveniente de las precipitaciones. Otro caso en donde se acumulan las sales en el suelo ocurre cuando se utilizan riegos intensivos en suelos con drenaje deficiente.

La salinidad disminuye el contenido de agua libre ( $\Psi_w$ ) del suelo, haciendo esta menos disponible a las raíces y causando lo que es conocido como sequía fisiológica, por esta razón el estrés hídrico y salino producen efectos dañinos similares en las plantas. Las respuestas de la planta al estrés salino siempre incluyen síntomas mediados por sequía.

La salinidad puede desestabilizar la membrana celular (Hasegawa *et al.*, 2000), inhibir la maquinaria fotosintética (Munns y Termat, 1986), provocar un desbalance nutricional (Munns, 1993), y causar un daño irreversible a las células y tejidos de las plantas (Meyer y Boyer, 1981). Los límites de resistencia de las plantas al estrés salino se presentan comúnmente por una disminución o ausencia total del crecimiento y por el inicio de la muerte de los tejidos de la planta formando necrosis o secado marginal seguida por una pérdida de turgencia caída de las hojas y finalmente la muerte de la planta (Hayward y Bernstein, 1958).

Además de imponer estrés osmótico y estrés iónico, la salinidad también genera estrés secundario, particularmente, estrés oxidativo, el cual es causado por especies reactivas de oxígeno (ERO).

### 1.1.3.1 Estrés osmótico

El efecto osmótico de la salinidad contribuye principalmente a obtener una baja tasa de crecimiento. Durante el estrés osmótico, las células de la planta acumulan solutos para prevenir la pérdida de agua y para restablecer el turgor celular. Los solutos que se acumulan durante el ajuste osmótico incluye iones tal como  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Cl^-$  o solutos orgánicos que incluyen compuestos conteniendo nitrógeno, tal como prolina y otros aminoácidos, poliaminas y compuestos de amonio cuaternario como glicin-betaína (Gly-Bet) (Tamura *et al.*, 2003). Los osmolitos más comunes incluyen azúcares, polioles y aminoácidos o sus derivados, la prolina es el osmolito que más ha recibido atención recientemente y su acumulación ha sido reportada en muchas especies de plantas bajo diversas condiciones de estrés biótico y abiótico (Delauney y Verma 1993).

### 1.1.3.2 Estrés Iónico

Los efectos de toxicidad iónica modifican el color de las hojas, la tasa de maduración y el cociente entre la biomasa aérea y la biomasa de la raíz.

El mantenimiento de la homeostasis iónica es crítico para el combate de estrés salino en plantas. Los procesos importantes para la homeostasis iónica incluyen ingesta celular, secuestro, exportación y transportación a grandes distancias.

En las plantas superiores, los iones de sodio ( $Na^+$ ) son excretados desde las células o compartamentalizadas en sus vacuolas principalmente por canales  $Na^+/H^+$ .

#### 1.1.4 Estrés oxidativo.

En esencia, el estrés oxidativo se refiere a la situación de un serio desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y defensas antioxidantes (Halliwell y Gutteridge, 2000).

El oxígeno es necesario para las plantas. La reducción de  $O_2$  a  $H_2O$  provee la energía que permite la impresionante complejidad de los organismos superiores, pero esta reducción es una mezcla de sorprendentes reacciones. El ión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) es esencial para la vida en la tierra. En su estado normal es poco reactivo, sin embargo, a lo largo del metabolismo normal y como consecuencia de perturbaciones ambientales y contaminantes (como radiaciones, sequía, contaminantes del aire, estrés térmico, herbicidas, etc.) el oxígeno da origen a diversos intermediarios letales o altamente tóxicos. Estos intermediarios, que son las especies biológicas de oxígeno más importantes, reciben el nombre genérico de especies reactivas de oxígeno (ERO) y radicales libres (Strain *et al.*, 1991) y se enlistan a continuación en la Tabla I.

**Tabla I. Principales especies reactivas de oxígeno (ERO)**

Radicales		No radicales	
Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Peróxido de Hidrogeno	$H_2O_2$
Hidroxilo	$\cdot OH$	Acido Hipocloroso	$HOCl$
Peroxilo	$RO_2^{\cdot}$	Ozono	$O_3$
Alcoxilo	$RO^{\cdot}$	Oxígeno singlete	$^1O_2$
Hidroperoxilo	$HO_2^{\cdot}$	Peroxinitrito	$ONOO^{\cdot-}$



Se han detectado un gran número de sitios de producción de ERO a nivel subcelular. Los principales orgánulos vegetales productores del radical superóxido son los cloroplastos (Asada y Takahashi, 1987; Alscher et al., 2002; del Río, 2006), las mitocondrias (Dat et al., 2000; Moller et al., 2001), los peroxisomas (Corpas et al., 2001; del Río et al., 2003), la pared celular (Polle, 2001), la membrana plasmática (Foreman et al., 2003) y apoplasto (Kawano et al., 2002).

En las plantas existen distintos sistemas celulares de generación de peróxido de hidrogeno, el cual se origina por una desproporción espontanea de los radicales superóxido o vía enzimática por la superóxido dismutasa (SOD) (Halliwell y Gutteridge, 2000). Además, la reducción de los radicales superóxido por ascorbato, tioles, ferredoxina o iones  $Mn^{2+}$ , lleva también consigo la producción de  $H_2O_2$  (Asada y Takahashi, 1987; Miller et al., 1990). La producción de  $H_2O_2$  en las plantas ocurre en los peroxisomas (Grant y Loake, 2000, Corpas et al., 2001; del Río et al., 2003, 2006), las mitocondrias y los cloroplastos (del Río, 2006) y apoplasto (Allan y Fluhr, 1997; Dat et al., 2000).

La toxicidad principal de las especies reactivas de oxígeno (ERO) reside en su capacidad por iniciar reacciones en cascada que resultan en la producción del radical hidroxilo y otras especies destructivas, tal como peróxidos de lípidos.

### **1.1.5 Respuesta al estrés**

Las plantas expuestas al estrés salino exhiben un amplio rango de respuestas a niveles moleculares, celulares y de la planta entera (Greenway y Munns 1980; Zhu *et al.*, 1997; Yeo 1998; Bohnert *et al.*, 1999; Hasegawa *et al.*, 2000). La función de los mecanismos de respuesta a estrés, es la protección de la integridad celular y la reparación

de cualquier daño molecular promovido por efectos adversos de los factores estresantes, por lo tanto, la respuesta al estrés permite el ajuste de transporte de iones, ajuste del metabolismo, cambios morfológicos y de desarrollo.

Para prevenir el daño por estrés oxidativo las células y los organismos utilizan tres estrategias de defensa. La primera consiste en el uso de mecanismos no enzimáticos en los que se utilizan antioxidantes de bajo peso molecular como el  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol (Meyers, 1995; Warner, 1995; Goodsell, 1996). La segunda estrategia comprende la reparación de daños macromoleculares causados por las ERO en ácidos nucleicos, lípidos y proteínas a través de enzimas reparadoras de ADN, proteasas, lipasas, etc. (Medina, 1996). Finalmente, el tercer mecanismo es la transformación de las ERO's a través de enzimas que son capaces de remover, neutralizar o depurar radicales libres o intermediarios del oxígeno.

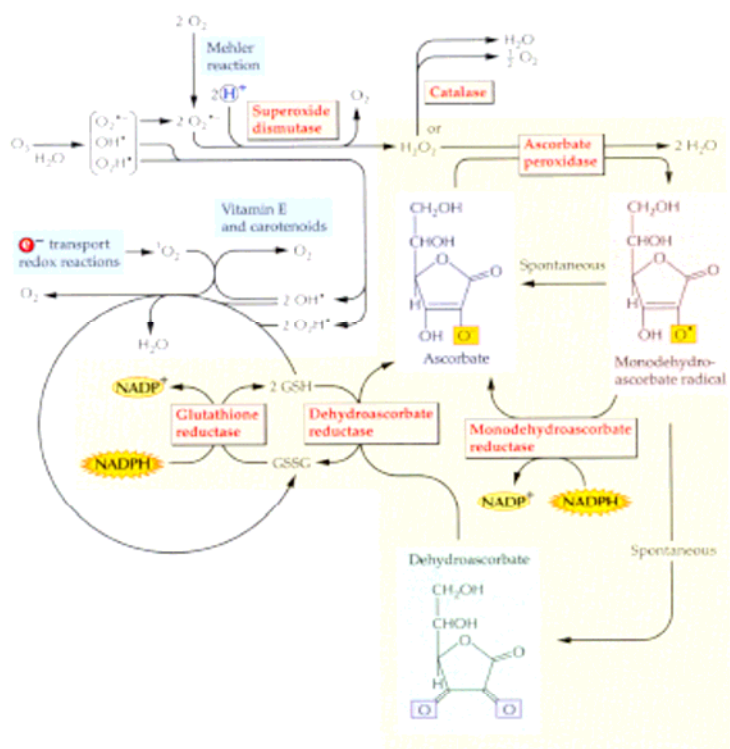
#### **1.1.5.1 Antioxidantes no enzimáticos**

Las plantas son protegidas contra las condiciones que generan altos niveles de ERO's por un sistema antioxidante complejo el cual incluye dos clases generales de antioxidantes no enzimáticos: 1) antioxidantes asociados a la membrana lipo-solubles (p. ej.  $\alpha$ -tocoferol y carotenoides) y 2) reductantes solubles en agua (p.ej. glutatión y ascorbato). Existen otros antioxidantes que ocurren naturalmente en las plantas, como los isoflavonoides, fenoles, poliaminas y aminoácidos específicos, particularmente cisteína y metionina (Larson, 1988; Levine et al., 1996).

La principal función del  $\alpha$ -tocoferol en todas las membranas biológicas es como un altamente eficiente, reciclable, terminador de reacción en cadena de la remoción de radicales de ácidos grasos poli insaturados generados durante la peroxidación de lípidos.

Si bien el principal papel reconocido de los carotenoides es actuar como pigmentos de antena fotoreceptivos para la fotosíntesis, recolectando longitudes de onda de luz que no son absorbidas por la clorofila, también se ha reconocido que ellos o al menos el  $\beta$ -caroteno, también tiene una función protectora contra el daño oxidativo. Los carotenoides son secuestradores muy poderosos de ERO's y a una relativamente baja concentración de  $\beta$ -caroteno pueden efectivamente proteger los lípidos de membrana de una oxidación (Larson, 1988).

El glutatión juega un papel importante en la tolerancia al estrés y ha sido implicado en la adaptación de las plantas a estreses ambientales tal como sequía, contaminación atmosférica y temperaturas extremas, por lo que su síntesis es inducida por estos factores. Glutatión existe en forma reducida (GSH) y oxidada (GSSG) en los tejidos de las plantas. La forma reducida del glutatión reacciona con ERO's para prevenir la oxidación de grupos tiol en enzimas, jugando así un papel importante como antioxidante en la estabilización de muchas enzimas. Una vez oxidado, el glutatión puede ser regenerado por la enzima glutatión reductasa, la enzima clave en el ciclo ascorbato glutatión.



**Figura 2. Ciclo asorbato-glutatión para la eliminaci3n de ERO's. Principal amortiguador celular Redox. Tomado de Mittova et al., 2004.**

El acido asc3rbico o asorbato juega un papel principal en la prevenci3n del da1o peroxidativo secuestrando EROS's y como una consecuencia, produciendo su propio radical libre, monodehidrasorbato, este es una radical relativamente estable y reacciona preferentemente con el mismo, previniendo as3 la propagaci3n de radicales libres (Noctor y Foyer, 1988). El acido asc3rbico tambi3n actúa contra los ERO's en armon3a con otros antioxidantes tal como glutatión en el ciclo asorbato-glutatión y este ciclo puede tambi3n interactuar con  $\alpha$ -tocoferol. Este ciclo asorbato-glutatión (Fig. 2) es encontrado en los cloroplastos para protegerlos contra los ERO's generados por la fotos3ntesis, pero tambi3n es encontrado en mitocondria (Jim3nez et al., 1997) y el citoplasma (Mullineax et al., 1996).

### 1.1.5.2 Antioxidantes enzimáticos

Como ejemplo de defensas enzimáticas metabolizantes (Tabla II) se pueden mencionar: 1) superóxido dismutasa (SOD) que elimina los radicales superóxido, 2) catalasa (CAT), 3) peroxidasa (POx) y 4) glutatión peroxidasa que remueven el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células; 5) ascorbato peroxidasa y 6) glutatión reductasa (que eliminan el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cloroplastos y mitocondrias).

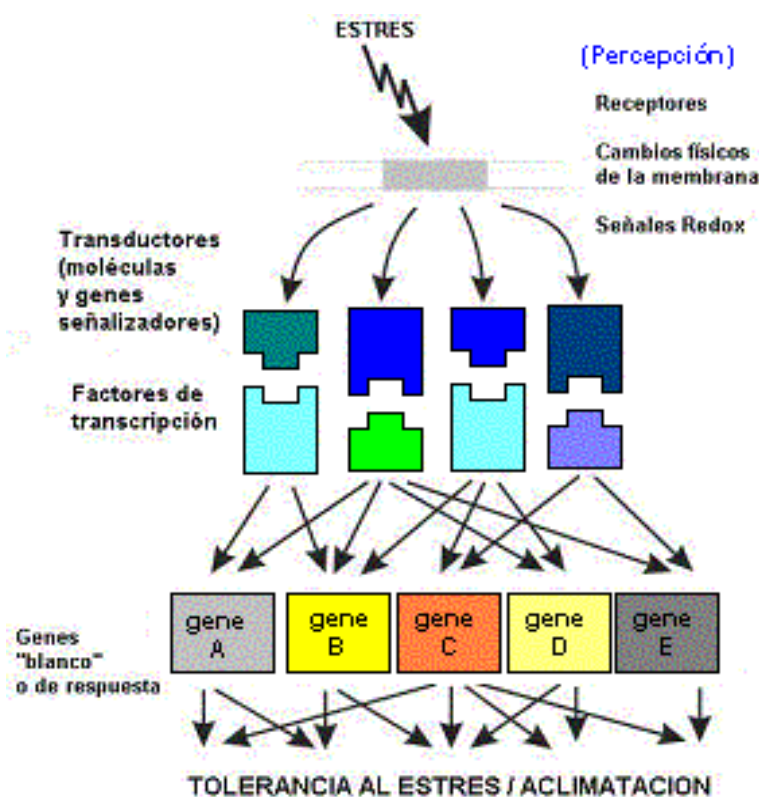
**Tabla II. Principales enzimas antioxidantes**

<b>Enzima</b>	<b>E.C.</b>	<b>Reacción</b>
Superóxido dismutasa (SOD)	1.15.1.1	$2\text{O}_2^{\bullet} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
Catalasa (CAT)	1.11.1.6	$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
Ascorbato peroxidasa (APX)	1.11.1.11	ascorbato + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> → 2H <sub>2</sub> O + DHA
Glutatión peroxidasa (GPX)	1.11.1.9	$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$
Glutatión reductasa (GR)	1.6.4.2	$\text{GSSG} + \text{NADPH} \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$
Glutatión S-transferasa (GST)	2.5.1.18	$\text{RX} + \text{GSH} \rightarrow \text{RSG} + \text{HX}$

### 1.1.6 Señalización

La señalización celular es la liberación por parte de una célula de una sustancia o sustancias que transmiten información a otras células. La señalización es la base de la transducción de señales, el proceso por medio del cual las plantas perciben las señales de diversos factores ambientales y las transmiten a la maquinaria celular para activar respuestas de modulación, adaptación y defensa. Las señales ambientales son percibidas por receptores específicos los cuales, después de activarse, inician (o suprimen) una cascada

para transmitir la señal intracelularmente y, en muchos casos, activar factores de transcripción nucleares induciendo la expresión de conjuntos específicos de genes (Fig. 3). La fosforilación de proteínas acopladas a un receptor es una forma común de iniciar la señalización. Aunque ninguno de los receptores para frío, sequía, salinidad o para el ABA ha sido determinado con certeza, los datos indican que los receptores análogos a quinasas proteicas, las quinasas histídicas bi-componentes así como receptores asociados a proteínas-G pueden ser sensores potenciales para esas señales ambientales (Benavides, 2002).



**Figura 3. Diagrama de los componentes de una respuesta al estrés por medio de una cascada de señalización (De Pastori y Foyer, 2002).**

### **1.1.7 Maduración y Senescencia**

La vida de las frutas y hortalizas puede dividirse en tres etapas fisiológicas fundamentales, subsiguientes a la germinación: el crecimiento, la maduración y la senescencia, sin embargo no es fácil establecer una clara distinción entre ellas. El tránsito del desarrollo a la senescencia es relativamente fácil de determinar. Durante el crecimiento, las hojas verdes acumulan nutrientes. La maduración suele describirse como el periodo que separa estas dos fases, sin que tenga una definición clara, en términos bioquímicos o fisiológicos (Wills *et al.*, 1999). En las hortalizas no se tiene bien definido el proceso de maduración organoléptica (ripening) y es, por consiguiente, mucho más difícil delimitar el tránsito de la maduración a la senescencia. Las hortalizas se recolectan en muy diversos estadios fisiológicos, a veces en periodos muy anteriores al comienzo de la madurez y en otras al inicio de la senescencia (Wills *et al.*, 1999). La maduración organoléptica es caracterizada por un número de cambios, incluyendo la degradación de clorofila, un incremento en la deformabilidad del fruto, un incremento en el volumen, el catabolismo de ácidos orgánicos, el desarrollo del color de la piel, niveles de vitaminas y varios antioxidantes y la formación de compuestos importantes para el sabor y aroma (Davies y Robinson, 2000).

El principal propósito de la senescencia es la movilización y reciclaje de estos nutrientes para el desarrollo de semillas y preparar así la siguiente generación. Durante la senescencia, los constituyentes celulares son desmantelados en una progresión ordenada.

### **1.1.8 Biomarcadores**

Los marcadores biológicos o biomarcadores son los cambios medibles, ya sean estos bioquímicos, fisiológicos o morfológicos, que se asocian a la exposición a un tóxico.

## 2. ANTECEDENTES

El estudio de *Capsicum* recientemente ha sido motivo de diversas investigaciones, entre las áreas de mayor estudio destacan nutrición y fisiología (DialogWeb, 2006)

La idea de utilizar aguas salinas para irrigación en cultivos de *Capsicum* no es reciente, ha sido propuesta anteriormente por diferentes grupos de investigación (Maas y Hoffman 1977; Fernández *et al.*, 1977; Walker *et al.*, 1979; Larrinaga *et al.*, 2001; Maggio *et al.*, 2003; Martínez-Ballesta *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2003, 2006) quienes han realizado estudios sobre los efectos de NaCl en chiles de diferentes cultivares. Sin embargo, a pesar de estudios detallados sobre los efectos de NaCl en el desarrollo vegetativo, existe poca información sobre los efectos del estrés salino en el metabolismo y composición de los frutos de chile ancho durante su maduración.

Maas y Hoffman (1977) categorizaron algunas especies de cultivos en base a su tolerancia a la salinidad y determinaron cuatro grupos: 1) tolerantes, 2) moderadamente tolerantes, 3) moderadamente sensibles y 4) sensibles. El género *Capsicum*, se ubica en el grupo de especies moderadamente sensibles, donde el nivel de umbral de salinidad es inferior a  $2.0 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$  de conductividad eléctrica del extracto de pasta de saturación del suelo. El chile por instancia, es muy sensible a estrés por sequía y es moderadamente sensible a estrés por salinidad (Ayers y Westcot, 1989; Meiri y Shalhevet, 1973; Rhoaded *et al.*, 1992).

Larrinaga, (2001) estudio el efecto de NaCl a diferentes concentraciones (0, 25, 50, y 100 mM) en la producción de plantas de chile morrón (*Capsicum annuum* L.) de nueve cultivares. Los resultados de la evaluación de los frutos obtenidos, mostraron que la



salinidad afectó los rendimientos de frutos de chile, y que el daño principal estuvo dado en el tamaño de los frutos y no en el número de frutos como consecuencia directa en la disminución del rendimiento del cultivo.

Maggio *et al.* (2003) llevaron a cabo una investigación con riegos de agua de mar artificial en cultivos de chile (*Capsicum annuum* L.) cv. “Laser”, para reproducir de forma precisa el problema de la contaminación del agua del subsuelo con agua de mar (infiltración salina) que siempre ocurre en las áreas costeras del sur de Italia. La hipótesis de su trabajo desde una perspectiva agronómica menciona que los riegos con agua moderadamente salina son recomendables, comparado con el hecho fatal de no irrigar, obteniendo un rendimiento comerciable en el ambiente específico considerado. Evaluaron dos tratamientos de agua de mar artificial (SW1 y SW2) que correspondieron a C.E.= 4.4 dS•m<sup>-1</sup> y C.E.= 8.5 dS•m<sup>-1</sup> respectivamente, los resultados obtenidos mostraron que el número de frutos por planta no fue afectado por los tratamientos con sal, pero si disminuyó en promedio el peso del fruto, lo que condujo a una disminución significativa del rendimiento comercial, las concentraciones de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> se incrementaron significativamente en los frutos con el tratamiento SW2. Además sugiere, que el tratamiento SW1 (C.E.= 4.4 dS•m<sup>-1</sup>) el cual causó 46% de reducciones en el peso seco de las plantas (hojas y tallo) y 25% de rendimiento comerciable, puede ser considerado económicamente aceptable en ciertas áreas del mediterráneo.

Una investigación reciente de Navarro *et al.* (2006) analizó la respuesta del chile (*Capsicum annuum* L.) cv. Orlando, un chile tipo “California” a diferentes niveles de salinidad (0, 15 y 30 mM de NaCl), también como los cambios en los compuestos antioxidantes que tomaron lugar durante las diferentes etapas de madurez (verde,

intermedio y rojo). Los resultados sugirieron que la actividad antioxidante y el contenido de carotenoides se incremento con la maduración de los frutos, y sus niveles mas altos fueron en frutos rojos, mientras que la salinidad disminuyo el contenido de acido ascórbico. Concluyendo que el uso de agua moderadamente salina fue benéfica cuando los chiles fueron cosechados en el estado de maduración rojo.

Diversas investigaciones han mostrado que la concentración de antioxidantes de una planta la protege del estrés oxidativo desencadenado por eventos extremos de estrés hídrico, temperaturas bajas y salinidad (Kranner *et al.*, 2002; Bohnert & Shevelva 1998; Mittova *et al.*, 2002) conduciendo a un incremento de la tolerancia a estrés abiótico. Dicha respuesta parece ser general para aquellos eventos ambientales adversos en donde ocurre un incremento dramático en la cantidad de especies reactivas de oxígeno.

El ácido abscisico es central en la respuesta al estrés por sequía fisiológica porque este estimula el cierre de estomas, reduciendo con esto la perdida de agua. Este proceso también reduce la disponibilidad de CO<sub>2</sub> para fotosíntesis, lo cual puede conducir a la formación de especies reactivas de oxígeno a partir de la perdida de electrones en el fotosistema. Por lo tanto, los mecanismos que reducen estrés oxidativo pueden jugar un papel importante en la tolerancia a la sequía fisiológica (Srivastava, *et al.*, 2002).

Larrinaga *et al.*, (2001) estudio la actividad de la enzima peroxidasa en hojas de chile morron (*Capsicum annuum* L.) de nueve cultivares, encontrando que esta fue marcadamente estimulada en condiciones de salinidad. Se observaron diferencias entre los cultivares, siendo el cultivar “Ace”, el que mantuvo una actividad similar bajo concentraciones de salinidad de 0 a 50 mM de NaCl, pero que a 100 mM su actividad fue la mayor entre los cultivares ensayados, sugiriendo que este cultivar presento una mayor

tolerancia al estrés hasta estos niveles, manteniendo constante la actividad de la enzima peroxidasa. De acuerdo con estos estudios y otros similares, sugiere que la actividad de isoenzimas peroxidadas y súperóxido dismutasas pueden servir como una herramienta poderosa al ser utilizados como marcadores moleculares en el análisis de funciones de genes y reguladores metabólicos, incluyendo las características de la tolerancia al NaCl

Jiménez et al., (2002) investigaron los cambios de los sistemas antioxidantes en mitocondrias de frutos de chile tipo California (*Capsicum annuum* L.) c.v. Wonders, en dos etapas de la maduración organoléptica.

Actualmente dos aproximaciones están siendo usadas en chiles para estudiar la regulación y la importancia de un metabolito en particular en la tolerancia al estrés. La primera es la aproximación génica que usa el análisis mutacional, eliminación de la función génica y marcaje de genes con un segmento TADN. La otra aproximación es la de identificar las enzimas clave implicadas y evaluar su contribución en la regulación de vías específicas asociadas con el incremento de tolerancia al estrés (Frenette *et al.*, 2002).

Uno estudio reciente demuestra que los genes de catalasa son expresados diferencialmente durante el desarrollo de la planta y también responden diferencialmente a la aplicación de los ácidos abscísico y salicílico (Kwon y Sun, 2001; Acevedo *et al.*, 2001). Otras investigaciones (Prasad, 1997) sugieren un papel dual para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, durante la aclimatación, los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pudieran funcionar como una señal que induce enzimas antioxidantes, tales como la catalasa, la cual subsecuentemente protege a la planta de la producción en exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la exposición a bajas temperaturas.

Aunque las isoenzimas de catalasa están implicadas en la degradación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular, en forma individual están correlacionadas con procesos metabólicos

específicos. Un hallazgo interesante relacionado con enzimas antioxidantes en respuesta al estrés ambiental en Chile (*Capsicum annuum* L.), fue que estas enzimas antioxidantes muestran un patrón de expresión gen-específico durante el desarrollo del fruto. El nivel de expresión del gen *Ca-Cat1* es más alto en estados tempranos que en estados tardíos, sin embargo los niveles de las enzimas superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa (APX1) son más altos en estados intermedios o tardíos del desarrollo del fruto.

Estos resultados pueden explicarse por la hipótesis de que el gen *Ca-Cat1* realiza una función importante en la protección contra estrés oxidativo producido por la vía del metabolismo activo en ovario. Otras enzimas antioxidantes tales como SOD y APX1 participan en estados intermedios o tardíos del desarrollo para hacer frente a cambios en el medio tales como tamaño celular y contenido de azúcar, efecto de hormonas, y cambio de coloración de verde a rojo (Kwon y Sun-An, 2001).

El ADNc *Ca-Cat1* de *C. annuum* posee 1837 pares de bases (pb) con un marco de lectura abierto de 1479 pb y en las regiones no traducidas -5' y 3' contiene 45 pb y 313 pb respectivamente. La secuencia de aminoácidos mostró un 95 y 78% de identidad con *Cat1* de *Nicotiana tabacum* y *Nicotiana plumbaginifolia*, respectivamente. La hibridación Northern mostró que los transcritos de *Ca-Cat1* son más abundantes en los tallos que en las hojas y raíces, y en estados tempranos más que en estados maduros del desarrollo del fruto. Un patrón similar fue observado para Mn-SOD mitocondrial del Chile. Estos resultados indican que el tallo del Chile puede sufrir un incremento de estrés oxidativo, probablemente debido a una elevada tasa de respiración por el transporte de diversos metabolitos así como también agua y minerales. En las raíces sus transcritos son inducidos en respuesta a aluminio y cloruro de sodio. En el extremo C-terminal de *Ca-Cat1*, se encontró un

tripeptido Pro-Thr-Met que corresponde a una señal blanco para su translocación a peroxisoma. La presencia de Pro-Thr-Met/Asn-Met-Ile y el contexto de residuos adyacentes son esenciales para dirigir proteínas al peroxisoma. Estos resultados indican que la clona ADNc de la catalasa codifica para una catalasa peroxisomal funcional en Chile (Kwon y Sun-An, 2001).

Lee y Hwang (2003) estudiaron el grupo de genes relacionados con la resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) en Chile (*Capsicum annuum* L. cv. Hanbyul) logrando la identificación del gen CASAR82A como marcador molecular por la infección de patógenos, elicitores abióticos y estrés ambiental en *C. annuum*. La resistencia sistémica adquirida es una resistencia de amplio espectro que puede ser disparada por una predisposición a infección con patógenos necrotizantes y por el tratamiento con ciertos químicos (Ryals et al. 1996; Malamy y Klessig 1992). Además, la SAR está asociada con la expresión coordinada de un grupo de genes también llamados SAR (Ward et al. 1991). Estos genes SAR incluyen genes que codifican para proteínas relacionadas con patogénesis (PR, por sus siglas en inglés) e incluyen enzimas que modifican la pared celular (quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa) y tienen actividad antimicrobiana (grupo taumatina) (Schroder et al., 1992; Woloshuk et al. 1991) y grupos de proteínas relacionadas con la defensa celular como tióninas, defensinas y SAR8.2 (Bohlmann y Apel 1987; Bohlmann 1994; Broekaert et al., 1995; Ward et al. 1991). El grupo de genes SAR8.2 comprende una pequeña familia de genes que es inducida por todos los estímulos inductores de resistencia. La expresión de CASAR82A fue examinada en tejidos de hoja de Chile, después de 18 h de tratamiento con etileno a varias concentraciones, encontrando que el etileno indujo la acumulación de ARNm CASAR82A de manera dosis y tiempo dependiente. Para examinar los efectos del

estrés por alta salinidad, sequía y frío sobre la inducción del gen CASAR82A, las plantas de Chile fueron sujetas a tratamientos con NaCl, deshidratación y bajas temperaturas.

El tratamiento con NaCl, la deshidratación y las bajas temperaturas indujeron fuertemente la transcripción de CASAR82A en tejidos de hojas y tallos de Chile. En particular, el estrés salino inducido por tratamiento de NaCl fue efectivo al activar CASAR82A en las plantas de Chile. Los transcritos de CASAR82A gradualmente se incrementaron en el tejido de la hoja, cuando la concentración de NaCl llegó a ser más alta. Interesantemente, la transcripción del gen CASAR82A fue rápidamente disparada por estrés de alta salinidad, sequía o baja temperatura, pero no por daño mecánico. Estos resultados sugieren que los genes SAR8.2 de Chile pueden ser valorados como marcadores moleculares por la detección de elicitores abióticos y estreses ambientales.

Aunque no existe suficiente conocimiento sobre los puntos específicos de la tolerancia a la sal en cada especie de planta, hay numerosas opciones para la modificación genética de las plantas y hacerlas más tolerantes al estrés salino. Diversos autores han reportado la transformación genética de plantas con el objetivo de aumentar su capacidad de resistir el estrés oxidativo (McKersie *et al.* 2000; Arisi *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1999).

Algunos progresos se han hecho con plantas de tomate, y ciertos transgenes han sido exitosamente insertados dentro de su genoma. Plantas de tomate fueron recientemente transformadas para protegerlas del exceso de sodio en sus hojas mientras se mantenía la fruta con el mismo sabor (Allen *et al.*, 1994).

Existe información acerca de los cambios en los niveles de ARNm que ocurren durante la maduración organoléptica conducida por etileno en frutos climatéricos, particularmente tomate. Un análisis de las librerías de ADNc a partir de frutos de tomate mutantes y silvestres ha permitido la identificación de un gran número de ADNc asociado con el proceso de maduración (Gray et al., 1992; Picton et al., 1993). Esto ha conducido a un aumento del entendimiento de la maduración de tomate y ha permitido el desarrollo de plantas transgénicas con características de maduración organoléptica alteradas

Investigaciones in vitro con plántulas de arroz colocadas en medios artificiales con niveles de salinidad incrementados gradualmente, mostraron la aparición de nuevas isoformas de peroxidasa, además del aumento de la actividad de estas, especialmente en las especies sensibles a salinidad, en el cultivar más sensible se encontraron seis enzimas en la raíz, así como en las hojas (Mittal y Dubey, 1991). Cultivos de Maíz tolerante e intolerante a la sequía, fueron analizados por Malan *et al.*, 1999 encontrando una resistencia correlacionada con las actividades de Cu,Zn SOD y glutatión reductasa, sin embargo altos niveles de una enzima sola aparentemente no confieren tolerancia a estrés por sequía fisiológica.

Sairam *et al.* (1997,1998) mostró que los sistemas secuestradores de  $H_2O_2$  representados por las enzimas ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa son más importantes en impartir tolerancia contra estrés oxidativo inducido por sequía fisiológica, que la enzima súperóxido dismutasa sola. La relativa tolerancia de un genotipo al estrés por sequía fisiológica es reflejado comparativamente por su baja peroxidación de lípidos y alto índice de estabilidad de membrana, clorofila y contenidos de carotenoides fue cercanamente asociada con sus sistema enzimático antioxidante (SOD, APO, GR, CAT).

Investigaciones realizadas en frutos de manzana por Masia (1998) sugieren que la estricta correlación entre el surgimiento de etileno ( $C_2H_4$ ) y el incremento en las actividades de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), es probablemente relacionada por la rápida producción de oxidantes celulares al inicio de la maduración organoléptica, lo que resulta en un incremento en la peroxidación de lípidos y una reducción de los niveles de poliamina que previenen la peroxidación de lípidos actuando como secuestradores de radicales libres.

Muchos estudios han sido realizados en levaduras por la facilidad con la cual son estudiadas, y hay muchas similitudes a nivel celular entre fungi, plantas y animales (Yeo, 1998). La exposición de células de levaduras a altas concentraciones de NaCl provoca, además de una respuesta osmorregulatoria, una respuesta de estrés inducida específicamente por iones  $Na^+$ , como lo es la elevación de la expresión del gen ENA1 que codifica la bomba de sodio y probablemente la estimulación de otros procesos de transporte de iones. Estos mecanismos de transporte están normalmente involucrados en la homeostasis de los iones y/o en la generación de gradientes que resultan en el proceso de transporte activo.



### 3. HIPÓTESIS

Considerando, que en condiciones de estrés oxidativo generado por la salinidad, los frutos de chile ancho (*Capsicum. annuum* L.) responden mediante la inducción de los sistemas antioxidantes. Seleccionando biomarcadores del metabolismo de estrés oxidativo durante la etapa de maduración postcosecha, podemos evaluar la intensidad del estrés aplicado y el periodo óptimo de almacenamiento postcosecha a 4 °C.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Durante el último periodo en que la población mundial se duplico, la producción de alimentos aumento en paralelo. Ello fue posible por la optimización de las técnicas de cultivo, el uso de variedades mejoradas genéticamente y diversas innovaciones en los sistemas de riego y recolección. También se introdujeron plaguicidas mas eficaces y biodegradables, así como nuevos fertilizantes sintéticos y orgánicos para reponer los nutrientes del suelo (Chrispeels y Sadava, 2004). Sin embargo a pesar de todos estos esfuerzos, el problema de alimentar a tantos habitantes se ve agravado por la distribución desigual del suelo agrícola, los crecientes problemas de salinidad y sequía en las zonas agrícolas, y mas preocupante aún la demanda constante de agua en todas las áreas de desarrollo y producción del ser humano.

En el estado de B.C.S. no existen estudios recientes acerca de la calidad del agua en todos los Distritos de Riego. En este sentido, ante la demanda de agua de buena calidad por centros urbanos en constante crecimiento, los altos costos de las tecnologías actuales de desalinización de agua de mar, se hace necesario optar por alternativas como el uso de aguas con contenidos altos de sales, para cubrir el riego de cultivos de las cadenas productivas prioritarias.

Se conoce bien que todos los chiles verdes son cultivados en el campo y para consumo de mercado fresco son manualmente cosechados en múltiples ocasiones durante la temporada de cosecha. El tiempo de cosecha es determinado por su tamaño, color y textura (madurez comercial), una vez iniciada la etapa de maduración, el fruto no aumentara significativamente en tamaño si este permanece en la planta para madurar (Sargent, 2000). Tradicionalmente, los agricultores comerciales han fijado el mercado de chile verde,

cosechando la fruta hasta alcanzar la madurez comercial, cuando la pared del pericarpio llega a ser gruesa y la fruta alcanza el tamaño típico (USDA, 1989). No obstante, estimar la madurez del chile en la etapa verde puede ser difícil casi para frutos con atributos físicos similares (Tadesse *et al.*, 2002); bajo ciertas condiciones los chiles verdes pueden empezar a madurar durante el transporte, reduciendo su valor comercial ya que el chile parcialmente maduro, tiene valores de mercado mas bajos que en la etapa de color sólido (Fox *et al.*, 2005). En el 2003 los precios en los mercados al por mayor en E.U.A. fueron típicamente de 50% a 70% mas alto para chiles maduros que para chiles verdes. Sin embargo, para los agricultores es más costoso producir chiles maduros que verdes, debido a la extensión de tiempo de maduración en el campo y el riesgo de ser dañados por insectos o enfermedades. Los chiles maduros son también más susceptibles a daño físico durante el transporte y tienen una vida poscosecha mas reducida que aquellos cosechados en la etapa verde.

Aunque en México el chile es un producto culturalmente importante, existe poca investigación sobre esta especie. El aprovechamiento adecuado de este recurso requiere ampliar nuestro conocimiento de la diversidad genética de las variedades de chile con las que México cuenta.

El propósito fundamental de esta investigación es seleccionar biomarcadores de tolerancia al estrés salino del cultivo de chile ancho (*Capsicum annumm* L.) c.v. Caballero y mediante estos poder desarrollar estrategias de manejo del cultivo para diferentes niveles de estrés (moderados) que induzcan una mayor calidad poscosecha a través del estímulo del contenido de antioxidantes y así poder establecer momentos óptimos de cosecha y calidad poscosecha.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL.**

Estudiar la respuesta antioxidante inducida por condiciones de estrés salino, durante la etapa de maduración postcosecha en frutos de chile ancho (*C. annuum* L.), para obtener biomarcadores de calidad postcosecha y de esta forma establecer periodos de almacenamiento a 4°C.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- a) Estudiar la respuesta antioxidante en frutos de chile ancho (*Capsicum annuum* L.) cv. Caballero, a partir de dos fuentes de salinidad (NaCl y agua de mar diluida).
  
- b) Determinar la aplicación de biomarcadores de maduración postcosecha del sistema antioxidante enzimático en frutos de chile ancho (*Capsicum annuum* L.) cv. Caballero, sometidos a estrés salino, durante la etapa de maduración postcosecha a 4°C.

## **6. RESULTADOS**

### **Primer artículo:**

**Respuesta antioxidante enzimática en frutos de  
chile ancho (*Capsicum annuum* L.) bajo  
condiciones de estrés salino**

**(Artículo publicado)**

## **6.1 Materiales y métodos**

### **6.1.1 Material genético**

Se utilizaron semillas del híbrido de chile ancho (*Capsicum annuum* L.) cv. Caballero (Sakata, SPP 7502), debido a las características genéticas que posee este cultivar. Presenta frutos grandes de 12-14 cm de longitud, un color verde intenso, de maduración en color rojo escarlata, paredes gruesas y con un 75 % de frutos lisos de 2 venas (lóculos), siendo el restante de tres lóculos, plantas vigorosas con entrenudos largos y pedúnculo fuerte. Su maduración es verde oscuro brillante para su cosecha en fresco y rojo escarlata para deshidratado. El tiempo relativo para su madurez es de 80 a 88 días. Su contenido de capscicina es media, de 500 a 2000 unidades Scoville, dándole el picor característico de este tipo de chile. Por lo que tiene una elevada aceptación en el mercado nacional como de exportación.

### **6.1.2 Descripción del sitio de estudio**

El estudio se realizó bajo una estructura tipo invernadero con malla sombra en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), ubicado en los terrenos costeros de El Comitán, y localizado en la porción meridional de la península de Baja California, a 24° 08' latitud norte y 110° 24' longitud oeste, 17 km al oeste del puerto de La Paz, Baja California Sur, México. La península de Baja California, se ubica en la franja limitada por los paralelos 19° y 31° norte, donde se localizan los principales desiertos y zonas de mayor aridez en el mundo (Aguilera y Martínez, 1996, Nieto-Garibay et al., 2002).

### 6.1.3 Diseño del cultivo de chile

El cultivo de chile ancho se estableció bajo un diseño completamente al azar, basado en un arreglo bifactorial (fuentes de salinidad y concentraciones) considerando al agua salobre (NaCl y agua de mar diluida) empleada como factor ‘A’ y a las concentraciones como factor ‘B,’ con diez repeticiones por tratamiento. El agua de pozo, misma que contenía cantidades mínimas de sales disueltas, especialmente NaCl y con una conductividad eléctrica (CE) de  $1.3 \text{ mS m}^{-1}$ , se utilizó para la preparación y dilución de las soluciones salinas tanto de NaCl como de agua de mar, además, se consideró a ésta como el control, siendo designada como tratamiento I. Los tratamientos salinos cuya fuente utilizada fue NaCl (Sigma Chemical Co.) se ajustaron a las CE de  $2.8 \text{ mS}\cdot\text{m}^{-1}$  y  $4.0 \text{ mS}\cdot\text{m}^{-1}$  y se designaron como tratamientos II y III respectivamente; mientras que los tratamientos salinos cuya fuente utilizada fue agua de mar (filtrada) consistieron en CE de  $2.8 \text{ mS}\cdot\text{m}^{-1}$  y  $4.0 \text{ mS}\cdot\text{m}^{-1}$ , las cuales fueron obtenidas por dilución con agua de pozo y fueron designados como tratamientos IV y V, respectivamente (Tabla III).

**Tabla III.** Características técnicas de los tratamientos usados como inductores de estrés salino en el cultivo de chile ancho cv. Caballero.

Tratamiento	H <sub>2</sub> O (fuente)	NaCl (mM)	C.E. (mS·m <sup>-1</sup> )
I	Pozo	0	1.3
II	Pozo + NaCl	12.5	2.8
III	Pozo + NaCl	25.0	4.0
IV	Pozo + Mar	≅ 12.5	2.8
V	Pozo + Mar	≅ 25.0	4.0

Las semillas de chile ancho se sembraron en recipientes de germinación y posteriormente se trasplantaron en macetas de plástico de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura, con sustrato comercial tipo "peat-moss" (Sunshine, Sun Gro Horticulture, Canadá). Durante 10 días y previo al inicio de los tratamientos salinos, las plantas se regaron con "Triple 20" (fertilizante comercial Fertipron: N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O) con una dosis de 150 mg·L<sup>-1</sup>. Posteriormente se inició con la aplicación diaria de los tratamientos salinos por un período de 90 días (hasta la cosecha de los frutos).

#### **6.1.4 Variables morfológicas y peso de frutos**

Se cosecharon frutos de manera aleatoria e inmediatamente se cuantificó el número de frutos por planta en cada tratamiento, determinándose el ancho y largo de cada fruto con un vernier digital (Stanley, UPC22064, China). El peso de cada fruto se registró empleando una balanza granataría (Mettler-Toledo, PG8000-S, Detroit, EUA).

#### **6.1.5 Contenido de iones**

Para los análisis de aniones y cationes, los frutos se almacenaron en bolsas de papel y se deshidrataron en horno (Shel Lab, FX-5, Cornelius, EUA) a 80° C durante 48 h. El tejido del pericarpio del fruto se pulverizó en molino eléctrico (Hamilton-Beach, EUA) hasta obtener un material completamente fino y homogéneo. Para determinar el contenido del anión cloro (Cl<sup>-</sup>), se pesaron 0.3 g de cada muestra seca y molida. Para su digestión, las muestras se calentaron a ebullición durante 1 min, se filtraron con papel Whatman No. 2 y posteriormente con jeringa y filtro de rosca de 0.2 micras, depositando los filtrados en viales.



El contenido de  $\text{Cl}^-$  se determinó mediante cromatografía de iones (Shimadzu HIC-6A, Japón). Para el análisis de cationes, se pesaron 0.2 g, realizando la extracción de los cationes mediante digestión ácida y adicionando 5.0 ml de solución digestora ( $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HClO}_4:\text{HNO}_3$ ) en proporción 1:4:10. Las muestras se colocaron en plancha caliente por un periodo de 20-45 min. Una vez digeridas, se adicionaron 3 ml de ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ ) 50% (v/v). La concentración de cationes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ ) se analizó por espectrofotometría de absorción atómica (Shimadzu, AA-660, Japón) de acuerdo con los parámetros que describe Klutte (1996).

#### **6.1.6 Preparación de extractos crudos**

Para los estudios bioquímicos (proteína total, antioxidantes enzimáticos y lipoperoxidación) las muestras se colocaron en bolsas de polietileno y se congelaron a  $-80^\circ\text{C}$  en ultra-congelador (REVCO, ULT-2186-9, Asheville, EUA). Un gramo de material vegetal fue congelado en nitrógeno líquido y pulverizado utilizando mortero y pistilo. Al homogenizado obtenido, se añadieron 2 ml de solución amortiguadora de fosfatos de potasio [ $(\text{NaKP}_i)$  50 mM, pH 7.8 conteniendo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.1 mM, cisterna 5mM, Triton X-100 0.2%, polivinil-polipirrolidona (PVPP) 1%, fluoruro-fenil-metil-sulfonil (PMSF) 0.1 mM]. La mezcla se agitó en vortex y se enfrió 30 min. en hielo. Se concentró el material sólido, centrifugando a 1000 g por 10 min. y el sobrenadante recuperado se centrifugó nuevamente a 10 000 g por 20 min. El volumen obtenido se dividió en alícuotas de un ml para realizar los análisis de proteína total, actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Todo el procedimiento de extracción se realizó a  $4^\circ\text{C}$ .

### **6.1.7 Contenido de proteína total**

El contenido total de proteínas se determinó de acuerdo al método descrito por micro Bradford (1976), el cual implicó la adición del colorante ácido azul brillante de Coomassie G-250 (Bio-Rad), utilizando albúmina de suero de bovino (BSA) como proteína estándar. Las determinaciones de proteína se realizaron por triplicado expresándose en  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

### **6.1.8 Actividad superóxido dismutasa (SOD) total**

La actividad enzimática SOD total (E.C. 1.15.1.1) se midió de acuerdo al método descrito por Paoletti *et al.*, (1986) basado en el procedimiento de Beauchamp y Fridovich (1971) con algunas modificaciones. Se midió el cambio de absorbancia a 560 nm por espectrofotometría (Jenway 6505, EUA) cada 30 s durante 5 min. Todas las muestras se mantuvieron a 25 °C. El método define una unidad de SOD como la cantidad de enzima que causa el 50 % de la máxima inhibición de NBT a azul de formazan, expresando la actividad como Unidades SOD  $\cdot \text{mg}\cdot\text{proteína}^{-1}$ ; la determinación de cada extracto se realizó por triplicado.

### **6.1.9 Actividad catalasa (CAT)**

La actividad de la enzima catalasa (E.C. 1.11.1.6) fue medida de acuerdo al método descrito por Aebi (1984), mediante la desaparición del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en solución amortiguadora y seguida a una longitud de onda de 240 nm en espectrofotómetro (Jenway, 6505, EUA). La mezcla de reacción estuvo compuesta por peróxido de hidrógeno

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 10 mM en solución amortiguadora de fosfatos de potasio (NaKP<sub>i</sub>) 50 mM, pH 7.0 y 800 µL de extracto de enzima en un volumen total de 1.2 mL.

Todas las muestras se mantuvieron a 25 °C. La actividad catalasa se expresó como unidades de CAT • mg proteína<sup>-1</sup>, cada determinación de extracto se realizó por triplicado.

#### **6.1.10 Contenido de ácido ascórbico-L**

Se cortaron y pesaron 10 g de pericarpio de la región ecuatorial de cada fruto. El tejido vegetal se comprimió empleando un exprimidor de acero inoxidable para obtener la fase líquida. De cada muestra extraída se realizó una dilución 1:20 con ácido metafosfórico. Inmediatamente se introdujo una tira indicadora de ácido ascórbico del kit RQflex plus (Merck, 1.6981.0001, Alemania) en el vaso conteniendo la muestra diluida, eliminando el exceso de líquido con papel absorbente. El contenido de ácido ascórbico-L, se midió de acuerdo a la prueba de ácido ascórbico de Merck, el cual reduce el ácido molibdofosfórico amarillo a azul de fosfomolibdeno que se determinó reflectométricamente en el equipo RQflex plus (Merck, Alemania). Como control positivo se utilizó ácido ascórbico-L puro (Sigma-Aldrich, EUA); cada determinación se realizó por triplicado, expresando la concentración en mg·L<sup>-1</sup>.

#### **6.1.11 Nivel de peroxidación de lípidos**

La concentración de malondialdehído (TBARS) se determinó de acuerdo al método indirecto descrito en Persky et al., (2000). Se homogenizó 0.1 g de pericarpio en mortero con 1.0 ml de reactivo tiobarbitúrico (TCA-TBA-HCl). Los homogenizados se incubaron por 30 min. a 90°C, posteriormente se colocaron en baño de hielo y se centrifugaron a 12,000 g

durante 15 min. La medición de malondialdehído se realizó a dos longitudes de onda 535 nm y 600 nm, el contenido de TBARS se expreso como nmol TBARS·mg-proteína<sup>-1</sup>.

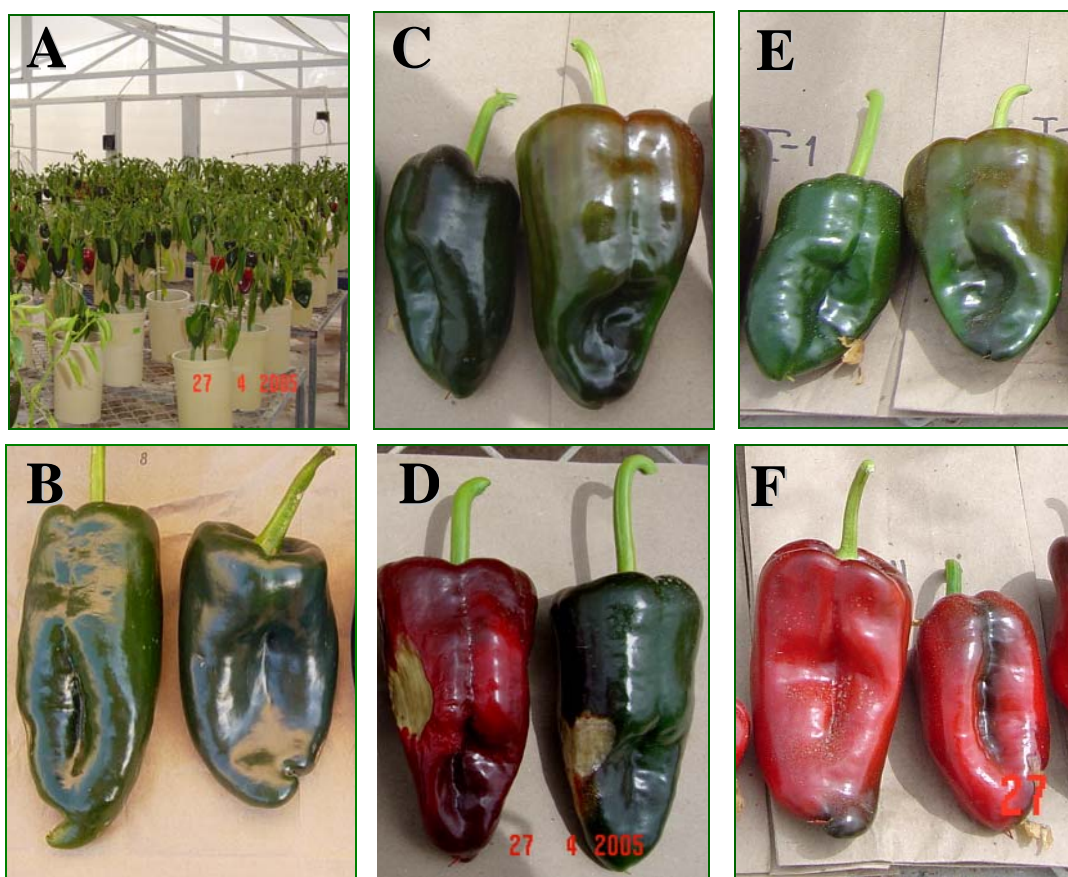
#### **6.1.12 Análisis estadísticos**

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y cuando se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, se utilizó la prueba múltiple de comparación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico Statistica 6.1 (Statistica, 2001). Para la elaboración de gráficos se utilizó el programa SigmaPlot 8.0 (SPSS, 2001)

## 6.2 Resultados y discusión.

### 6.2.1 Variables morfológicas y peso de frutos

La figura 4A muestra el sitio de estudio de la producción de frutos, en donde los frutos del tratamiento control de chile ancho cv. Caballero recolectados a los 90 días de crecimiento, presentaron las características físicas de tamaño, superficie y firmeza propias de la especie y variedad (Fig. 4B).



**Figura 4.** A. Sitio de estudio del cultivo de chile ancho cv. Caballero (90 días). Frutos recolectados correspondientes a los tratamientos: B. I: Control  $1.3 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ ; C. II: NaCl  $2.8 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ ; D. III: NaCl  $4.0 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ ; E. IV: agua de mar  $2.8 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ ; y F. V: agua de mar  $4.0 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ .

La superficie de los frutos de chile ancho, correspondientes a los tratamientos II y IV fue lisa y brillante con ausencia total de defectos tales como grietas, pudriciones y quemaduras de sol, se observó un cambio de maduración en los tratamientos II y IV, respecto al tratamiento I, presentando pigmentación verde/roja (café) en algunos frutos (Figs. 4C, 4E). En los tratamientos salinos a  $4.0 \text{ mS}\cdot\text{m}^{-1}$  (III y V), se obtuvieron frutos con cambio de maduración, presentando una pigmentación roja completa (Figs. 4D, 4E) y la formación de zonas necróticas (Fig. 4D) conocidas como “podredumbre apical” (Blossom End Rot o BER, por sus siglas en inglés).

La tabla IV muestra los resultados correspondientes al número de frutos cosechados, longitud y diámetro de los frutos, peso fresco, estado de maduración al momento de la cosecha y el contenido de proteína total de frutos. El análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre los tratamientos para ninguna de las variables antes mencionadas.

**Tabla IV. Número de frutos, Longitud, Diámetro, Peso fresco, Coloración y Proteína total de frutos de chile ancho cv. Caballero.**

Tratamiento *	Número frutos	Longitud (mm)	Diámetro (mm)	Peso fresco (g)	Coloración (pigmentación)	Proteína Total ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ )
I	5.0±1.6	110.0±13.5	50.0±8.0	63.1±13.7	Verde completo	0.018±0.0048
II	5.0±2.2	97.4±11.6	48.9±6.8	49.4±17.0	Verde-rojo	0.022±0.0072
III	7.0±2.3	106.0±8.7	49.9±10.8	51.9±13.0	Rojo-completo	0.011±0.0067
IV	5.8±2.8	98.6±18.2	52.0±4.7	58.1±14.9	Verde-rojo	0.019±0.0095
V	5.7±2.1	100.5±7.5	48.8±6.2	53.1±10.5	Rojo-completo	0.014±0.0065

\*Tratamientos. I: Control  $1.3 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ ; II: NaCl  $2.8 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ ; III: NaCl  $4.0 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ ; IV: agua de mar  $2.8 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ ; y V: agua de mar  $4.0 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ .

Los valores representan la media ± la desviación estándar.

### 6.2.2 Contenido de iones

El análisis de varianza para el contenido de los iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Mn}^{2+}$  en los frutos, mostró diferencias significativas entre los tratamientos, observándose que ésta concentración iónica disminuyó en los cuatro tratamientos salinos (Tabla V). Los contenidos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en frutos, mostraron diferencias significativas entre los tratamientos, aumentando significativamente en todos los tratamientos salinos, observándose en el tratamiento III ( $4.0 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$  de NaCl) los valores mayores de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ .

La disminución del contenido de los cationes  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Mn}^{2+}$ , confirman el estrés iónico inducido por el estrés salino, registrándose en los frutos de plantas sometidas al tratamiento III, daños por necrosis celular en el fruto. Un estudio realizado por Aktas *et al.* (2005) con frutos de chile *cv.* Mazurca, determinó que la disminución de  $\text{Mn}^{2+}$  era la causa principal de la formación de zonas necróticas conocidas como “podredumbre apical” (Blossom End Rot o BER, por sus siglas en inglés) en los frutos de chile y no la disminución de  $\text{Ca}^{2+}$ . Nuestros resultados confirman esta hipótesis ya que el contenido de  $\text{Mn}^{2+}$  en frutos disminuyó en los tratamientos salinos de  $2.8$  y  $4.0 \text{ mS}\cdot\text{m}^{-1}$ , conforme se incrementó el contenido de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Tabla V). Al considerar que el presente estudio se realizó dentro de un rango de salinidad moderada, acorde con las clasificaciones de Maas y Hoffman (1977) y Rhoades *et al.* (1992), el contenido máximo de sales tolerables fue menor a  $4.0 \text{ mS}\cdot\text{m}^{-1}$ . De esta manera, los resultados permiten entender el efecto de dosis específicas mínimas y máximas de sales en los frutos de chile, especie considerada como moderadamente sensible a la salinidad (Larrinaga-Mayoral, 2001).

**Tabla V.** Contenido de iones en base a peso seco en frutos de chile ancho *cv.* Caballero.

Tratamiento *	C.E. mS·m <sup>-1</sup>	Ca <sup>2+</sup> (mg)	Mg <sup>2+</sup> (mg)	K <sup>+</sup> (mg)	Mn <sup>2+</sup> (mg)	Na <sup>+</sup> (mg)	Cl <sup>-</sup> (mg)
I	1.3	0.177 a	0.510 a	7.530 a	0.0082 a	0.091 a	0.812 a
II	2.8	0.118 b	0.330 b	5.397 b	0.0076 b	0.175 b,c	1.066 a,b
III	4.0	0.094 b	0.319 b	5.492 b	0.0072 b	0.209 c	1.123 b
IV	2.8	0.105 b	0.326 b	5.660 b	0.0074 b	0.164 b	1.081 b
V	4.0	0.120 b	0.330 b	5.197 b	0.0074 b	0.132 a,b	1.079 b

\* Tratamientos. I: Control 1.3 dS·m<sup>-1</sup>; II: NaCl 2.8 dS·m<sup>-1</sup>; III: NaCl 4.0 dS·m<sup>-1</sup>; IV: agua de mar 2.8 dS·m<sup>-1</sup>; y V: agua de mar 4.0 dS·m<sup>-1</sup>. Los valores representan la media ± la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0.05).

### 6.2.3 Contenido de proteína total

El análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre los tratamientos para el contenido de proteína total. Sin embargo, los resultados del contenido de proteína indican que este se incrementó en los frutos de los tratamientos II y IV (Tabla IV). De acuerdo con Hernández-Saavedra y Ramírez-Serrano (2003) la exposición a un estrés moderado induce un mejoramiento en la resistencia a un estrés mucho más severo (tolerancia cruzada), por lo tanto, como respuesta a una condición de estrés, la célula produjo una serie de proteínas adicionales a aquellas que se sintetizaban antes de la condición de estrés. Los frutos del tratamiento III presentaron una disminución en la concentración de proteína total con respecto al resto de tratamientos, sugiriendo que altas concentraciones de NaCl afectan el balance o estabilidad de los enlaces de hidrogeno que controlan la estructura secundaria de las proteínas (Serrano, 1999), pero principalmente las ERO's generadas a partir de altas concentraciones de NaCl producen un daño en los



residuos de aminoácidos de proteínas (particularmente histidina, arginina, lisina y prolina) para producir productos con grupos carbonilo.

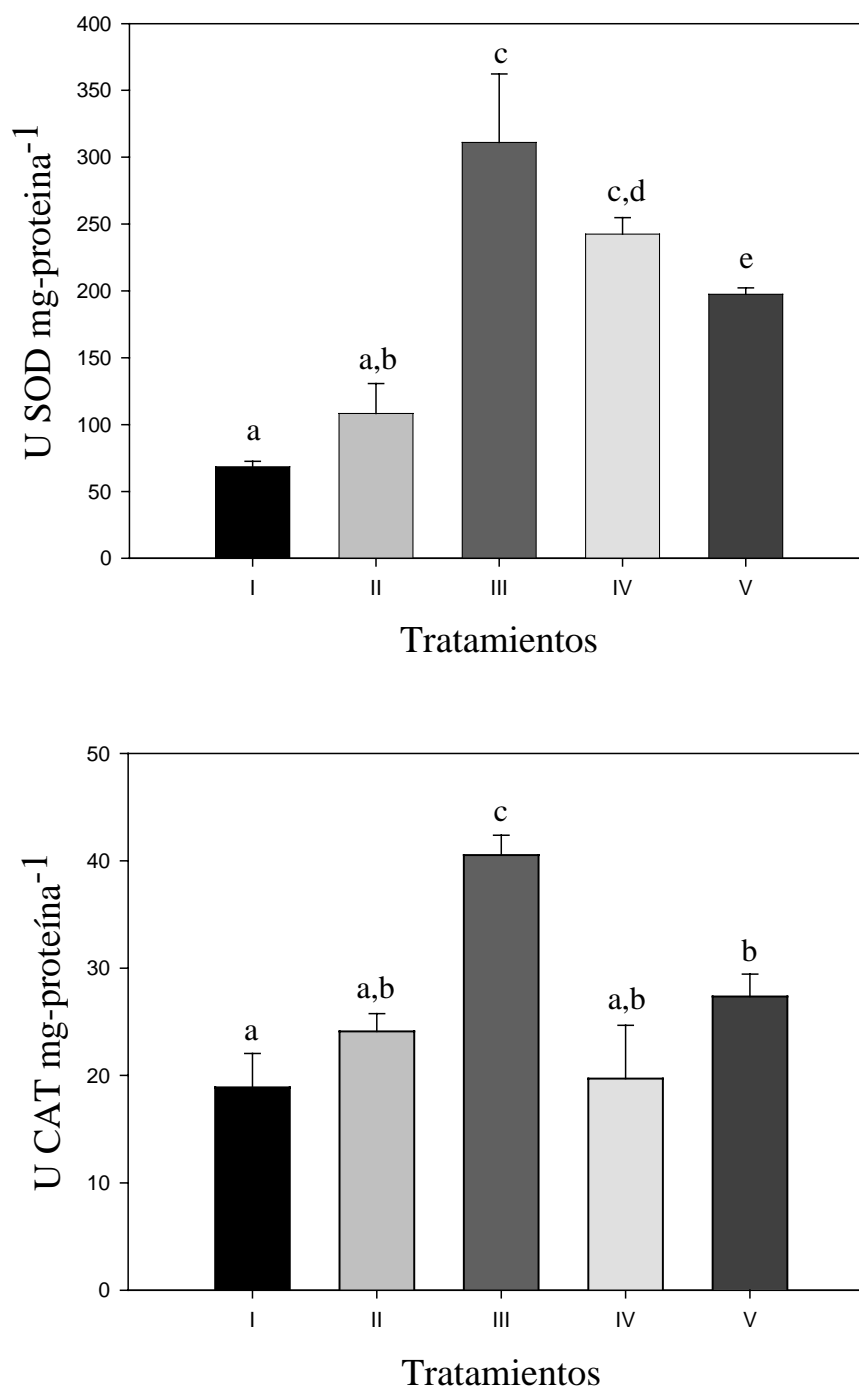
#### **6.2.4 Actividad superóxido dismutasa (SOD) total**

El nivel de actividad SOD total se incrementó significativamente en los tratamientos salinos (Fig. 5A). La activación del sistema antioxidante enzimático represento una respuesta específica a la formación de ERO's, que se forman por el cambio en el metabolismo basal de la célula y como respuesta al estrés osmótico e iónico inducido por las altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  y la disminución de iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{K}^+$  (caracterizados por su antagonismo). En este sentido, el tratamiento III presentó un incremento superior en la actividad SOD (311.1 unidades SOD·mg de proteína<sup>-1</sup>), para dismutar o convertir radicales superóxido a peróxido de hidrogeno. Este incremento en la actividad total y/o nivel de enzimas SOD, se debe a la activación de mayor número de isoenzimas SOD como respuesta a un nivel moderado de estrés oxidativo generado por el tratamiento directo de NaCl. Kawano *et al.* (2002) atribuyen la producción de EROs a un choque catiónico entre  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ , el cual causa un aumento de ERO's mediado por la enzima NAD(P)H oxidasa, llevado a cabo *in situ* en el apoplasto del fruto. Los resultados del presente estudio aportan evidencia relevante acerca de este choque catiónico en frutos de chile ancho y de acuerdo con los estudios de Aktas *et al.* (2005) se desconocía si tal choque catiónico se llevaba a cabo. La respuesta de la actividad SOD y la etapa de maduración de los frutos se relacionaron con el nivel de estrés salino inducido, ya que a

mayores niveles de actividad SOD, la etapa de maduración de los frutos se modificó, acelerando la maduración.

### **6.2.5 Actividad catalasa (CAT)**

Los resultados del presente estudio mostraron diferencias significativas entre tratamientos en la actividad catalasa (CAT), presentándose un incremento de dicha actividad en los frutos de los tratamientos II, III y V (Fig. 5B). Este aumento se relacionó directamente con el aumento de la actividad SOD, que al catalizar el radical superóxido a peróxido de hidrogeno induce la participación de enzimas catalasa para convertir el peróxido de hidrogeno formado en agua y oxígeno, inhibiendo así la formación de radicales hidroxilo y sus subsecuentes daños a la célula. La baja actividad catalasa obtenida en el tratamiento IV, fue debido a que en las plantas el peróxido de hidrogeno es usualmente removido por dos tipos de enzimas: catalasa y peroxidasas. Sin embargo, la participación de ambas es dependiente de la concentración del peróxido de hidrogeno dismutado por la SOD. Cuando los niveles de catalasa son bajos, la enzima ascorbato peroxidasa al igual que la catalasa puede reducir el peróxido de hidrogeno para formar agua. Esta enzima se encuentra en todas las partes de las plantas, incluyendo el espacio apoplástico, en donde bajo condiciones de estrés salino se produce un aumento de especies reactivas de oxigeno. Los niveles intermedios de actividad SOD y CAT, sugieren que a estas concentraciones salinas se logró mantener un equilibrio oxido-reductivo entre la generación de EROs y la respuesta inmediata de los sistemas de defensa antioxidante.



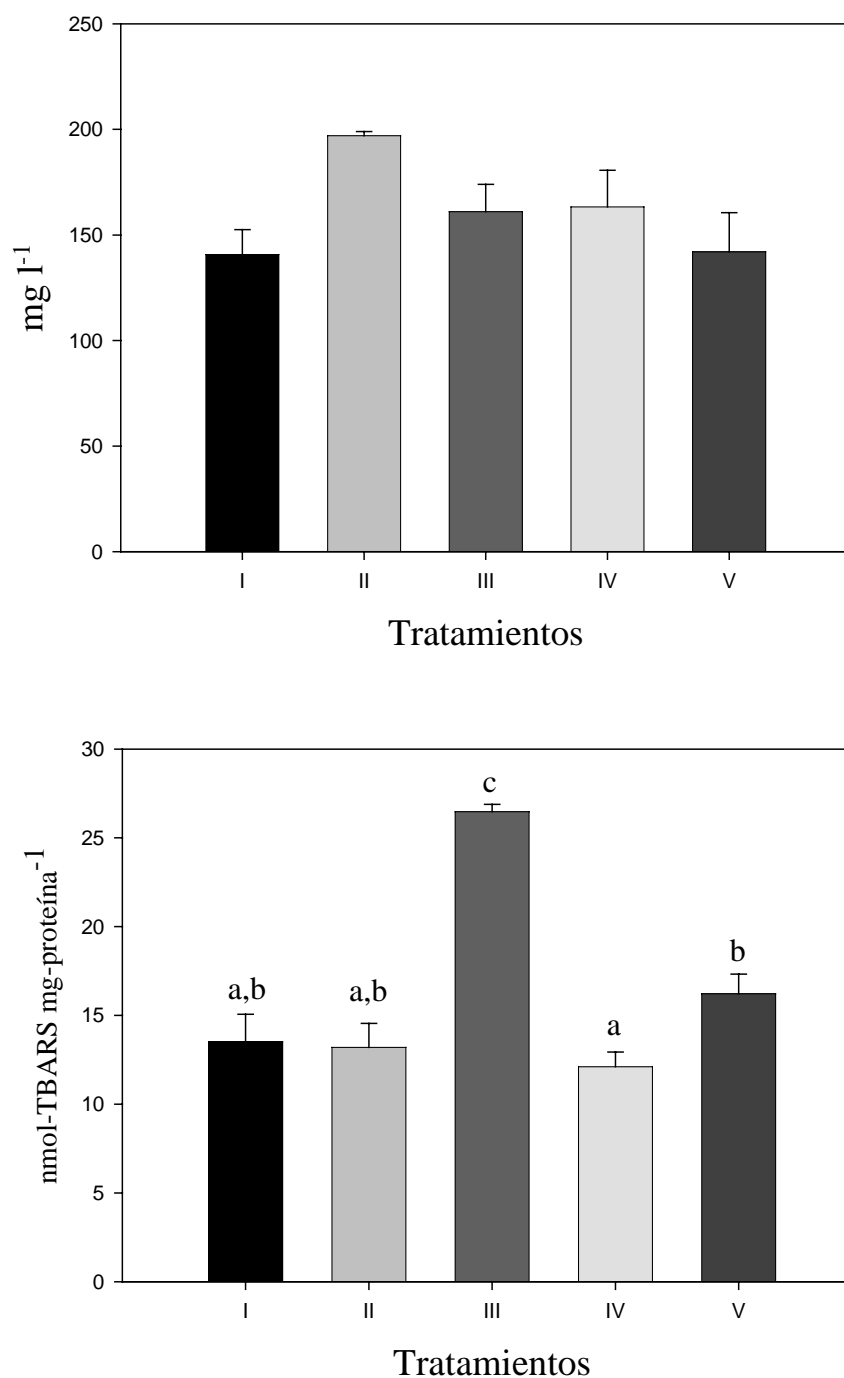
**Figura 5. A)** Actividad superóxido dismutasa total (SOD) y **B)** actividad de la catalasa (CAT) en frutos de chile ancho *cv.* Caballero. Tratamientos. I: Control 1.3 dS·m<sup>-1</sup>; II: NaCl 2.8 dS·m<sup>-1</sup>; III: NaCl 4.0 dS·m<sup>-1</sup>; IV: agua de mar 2.8 dS·m<sup>-1</sup>; y V: agua de mar 4.0 dS·m<sup>-1</sup>. Las barras en columnas representan la media ± error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### **6.2.6 Contenido de ácido ascórbico-L**

El análisis de varianza del contenido de ácido ascórbico no presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos (Fig. 6A). Inzé y Van Montagu (2002), mencionan que altas concentraciones de ácido ascórbico son asociadas típicamente con tejidos en rápido crecimiento y desarrollo. Por otra parte mencionan que las concentraciones de ácido ascórbico de tejidos se incrementan en respuesta al daño en tejido por heridas, como en el caso de los tratamientos III y V. Además el ácido ascórbico está involucrado en la biosíntesis de proteínas ricas en hidroxiprolina en la pared celular donde podrían funcionar como osmoprotectantes en los tratamientos salinos.

### **6.2.7 Nivel de peroxidación de lípidos.**

La peroxidación de lípidos mostró diferencias significativas entre tratamientos (Fig. 6B). El nivel más alto de lipoperoxidación se observó en el tratamiento III, que presentó el mayor efecto tóxico por estrés iónico, acelerando la maduración de los frutos y causando daños a sus tejidos (necrosis celular), característicos de la deficiencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en los frutos. No obstante que se cuantificó la mayor actividad enzimática SOD y CAT en el tratamiento III, dicha respuesta celular no fue suficiente para disminuir o evitar la peroxidación de lípidos. Este resultado se relaciona directamente con el contenido de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en los frutos irrigados con NaCl a una C.E. de  $4.0 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ , determinándose esta concentración de sales como el umbral de salinidad para el chile ancho *cv.* Caballero. El índice de peroxidación de lípidos se ha utilizado como un marcador del grado de estrés oxidativo a nivel de la membrana celular. Los radicales libres si no son inactivados, inducen peroxidación de lípidos (Dhindsa *et al.*, 1982) lo cual conduce al rompimiento de la membrana celular asociada con la maduración de los frutos.



**Figura 6. A)** Concentración de ácido ascórbico y **B)** Nivel de peroxidación de lípidos en frutos de chile ancho *cv.* Caballero. Tratamientos. I: Control 1.3 dS·m<sup>-1</sup>; II: NaCl 2.8 dS·m<sup>-1</sup>; III: NaCl 4.0 dS·m<sup>-1</sup>; IV: agua de mar 2.8 dS·m<sup>-1</sup>; y V: agua de mar 4.0 dS·m<sup>-1</sup>. Las barras en columnas representan la media ± error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Los resultados del presente estudio muestran que la maduración de los frutos se relacionó directamente con el nivel de estrés oxidativo generado a su vez por estrés iónico y osmótico en el fruto del chile. La maduración de los frutos de los tratamientos a  $2.8 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$  no se modificó cualitativamente por las concentraciones de sales (Tabla IV). En cambio, los frutos cosechados de los tratamientos a  $4.0 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$  de ambas fuentes salinas, mostraron cambios evidentes en la etapa de maduración, mostrando una mayor pigmentación de carotenoides de coloración roja. De acuerdo con el estudio de Collera-Zúñiga *et al.* (2005), este incremento surge como respuesta a la generación de EROs por el estrés osmótico y su efecto directo en la inducción de la biosíntesis de cromoplastos carotenoides y en la transformación de cloroplastos a cromoplastos (Bouvier *et al.*, 1998). Los carotenoides tienen un papel importante en la coloración de los frutos y actúan como antioxidantes, reaccionando con las EROs como el radical superóxido, por lo que es posible inferir que el incremento rápido de pigmentos de coloración roja en los frutos es una respuesta celular para reducir los niveles altos de estrés oxidativo generados en los tratamientos III y V; lo cual se relaciona directamente con las altas actividades SOD y CAT y el nivel de lipoperoxidación, causados por el incremento significativo de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . En general, los resultados mostraron que la respuesta del sistema antioxidante enzimático a través de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa tuvieron una respuesta específica como mencionan Kotchoni y Gachomo (2006), de acuerdo con el grado de estrés oxidativo generado por la salinidad y en base a su incremento y/o disminución es posible determinar etapas de maduración de frutos de chile en condiciones basales y bajo estrés salino.

## **Segundo artículo:**

**Biomarcadores de maduración postcosecha en  
frutos de chile (*Capsicum annuum* L.)  
cultivados bajo condiciones de estrés salino**

**(Artículo sometido)**

## **6.3 Materiales y métodos**

### **6.3.1 Material genético**

Se utilizaron semillas del híbrido de chile ancho (*Capsicum annuum* L.) cv. Caballero (Sakata, SPP 7502), debido a las características genéticas que posee este cultivar. Presenta frutos grandes de 12-14 cm de longitud, un color verde intenso, de maduración en color rojo escarlata, paredes gruesas y con un 75 % de frutos lisos de 2 venas (lóculos), siendo el restante de tres lóculos, plantas vigorosas con entrenudos largos y pedúnculo fuerte. Su maduración es verde oscuro brillante para su cosecha en fresco y rojo escarlata para deshidratado. El tiempo relativo para su madurez es de 80 a 88 días. Su contenido de capscicina es media, de 500 a 2000 unidades Scoville, dándole el picor característico de este tipo de chile. Por lo que tiene una elevada aceptación en el mercado nacional como de exportación.

### **6.3.2 Descripción del sitio de estudio**

El estudio se realizó bajo una estructura tipo invernadero con malla sombra en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), ubicado en los terrenos costeros de El Comitán, y localizado en la porción meridional de la península de Baja California, a 24° 08' latitud norte y 110° 24' longitud oeste, 17 km al oeste del puerto de La Paz, Baja California Sur, México. La península de Baja California, se ubica en la franja limitada por los paralelos 19° y 31° norte, donde se localizan los principales desiertos y zonas de mayor aridez en el mundo (Aguilera y Martínez, 1996, Nieto-Garibay et al., 2002).



### **6.3.3 Diseño del cultivo**

Las semillas de chile ancho se sembraron en recipientes de germinación y posteriormente se trasplantaron en macetas de plástico de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura, con sustrato comercial tipo "peat-moss" (Sunshine, Sun Gro Horticulture, Canadá). Durante 10 días y previo al inicio de los tratamientos salinos, las plantas se regaron con "Triple 20" (fertilizante comercial Fertipron: N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O) con una dosis de 150 mg·L<sup>-1</sup>.

### **6.3.4 Inducción del estrés salino**

Se emplearon dos tratamientos con cloruro de sodio (NaCl) 12.5 y 25 mM designados como tratamientos II y III respectivamente. Para la preparación de las soluciones salinas se empleo agua de pozo con cantidades mínimas de sales disueltas y esta fue considerada como control (tratamiento I). Los tratamientos salinos se aplicaron diariamente por un período de 60 días (hasta la cosecha de los frutos). Cada experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar y cada tratamiento consistió de 10 repeticiones.

### **6.3.5 Variables morfológicas y peso de frutos**

Se cosecharon frutos de cada tratamiento en etapa inmadura (color verde) y de tamaño similar (diámetro del fruto) e inmediatamente se cuantificó el número de frutos por planta en cada tratamiento, determinándose el ancho y largo de cada fruto con un vernier digital (Stanley, UPC22064, China). El peso de cada fruto se registró empleando una balanza granataría (Mettler-Toledo, PG8000-S, Detroit, EUA).

### **6.3.6 Almacenamiento a 4 °C**

Los frutos fueron almacenados a 4 °C durante 90 días. Se tomaron tres frutos al azar de cada tratamiento en los días 15, 30, 45, 60, 75 y 90. Frutos al momento de la cosecha (día 0) sirvieron como control. Los frutos se congelaron a -80 °C, para su posterior determinación de actividad enzimática, ácido ascórbico, pigmentos (clorofilas y carotenoides), peroxidación de lípidos y contenido de proteínas carboniladas.

### **6.3.7 Preparación de extractos crudos**

Para los estudios bioquímicos (proteína total, antioxidantes enzimáticos y lipoperoxidación) las muestras se colocaron en bolsas de polietileno y se congelaron a -80 °C en ultra-congelador (REVCO, ULT-2186-9, Asheville, EUA). Un gramo de material vegetal fue congelado en nitrógeno líquido y pulverizado utilizando mortero y pistilo. Al homogenizado obtenido, se añadieron 2 ml de solución amortiguadora de fosfatos de potasio [(NaKPi) 50 mM, pH 7.8 conteniendo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.1 mM, cisterna 5mM, Triton X-100 0.2%, polivinil-polipirrolidona (PVPP) 1%, fluoruro-fenil-metil-sulfonil (PMSF) 0.1 mM]. La mezcla se agitó en vortex y se enfrió 30 min. en hielo. Se concentró el material sólido, centrifugando a 1000 g por 10 min. y el sobrenadante recuperado se centrifugó nuevamente a 10 000 g por 20 min. El volumen obtenido se dividió en alícuotas de un ml para realizar los análisis de proteína total, actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Todo el procedimiento de extracción se realizó a 4 °C.

### **6.3.8 Contenido de proteína total**

El contenido total de proteínas se determinó de acuerdo al método descrito por Bradford (1976), el cual implicó la adición del colorante ácido azul brillante de Coomassie G-250 (Bio-Rad), utilizando albúmina de suero de bovino (BSA) como proteína estándar. Las determinaciones de proteína se realizaron por triplicado expresándose en  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

### **6.3.9 Actividad superóxido dismutasa (SOD)**

#### **6.3.9.1 Actividad superóxido dismutasa (SOD) total**

La actividad enzimática SOD total (E.C. 1.15.1.1) se midió de acuerdo al método descrito por Paoletti *et al.*, (1986) basado en el procedimiento de Beauchamp y Fridovich (1971) con algunas modificaciones. Se midió el cambio de absorbancia a 560 nm por espectrofotometría (Jenway 6505, EUA) cada 30 s durante 5 min. Todas las muestras se mantuvieron a 25 °C. El método define una unidad de SOD como la cantidad de enzima que causa el 50 % de la máxima inhibición de NBT a azul de formazan, expresando la actividad como Unidades SOD  $\cdot \text{mg}\cdot\text{proteína}^{-1}$ ; la determinación de cada extracto se realizó por triplicado.

#### **6.3.9.2 Isoenzimas superóxido dismutasa (SOD)**

El estudio de isoenzimas SOD se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE por sus siglas en inglés) no desnaturizante, utilizando geles de poliacrilamida al 12% (p/v), con stacking gel de poliacrilamida al 7.5% y un equipo Mini-Protean III (Bio-Rad, USA). Cada línea del gel contuvo la misma cantidad de proteína. Las isoenzimas SOD fueron localizadas fotoquímicamente, según se describe en Beauchamp y

Fridovich (1971), las isoenzimas se identificaron utilizando inhibidores selectivos, con cianuro de potasio (KCN) 2 mM se inhibieron las Cu,Zn-SODs (se observan bandas acromáticas Mn-SOD y Fe-SOD) y con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se inhibieron las Cu,Zn-SODs y las Fe-SOD (se observan bandas acromáticas de Mn-SOD).

### **6.3.10 Actividad catalasa (CAT)**

La actividad de la enzima catalasa (E.C. 1.11.1.6) fue medida de acuerdo al método descrito por Aebi (1984), mediante la desaparición del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en solución amortiguadora y seguida a una longitud de onda de 240 nm en espectrofotómetro (Jenway, 6505, EUA). La mezcla de reacción estuvo compuesta por peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 10 mM en solución amortiguadora de fosfatos de potasio (NaKPi) 50 mM, pH 7.0 y 800 µL de extracto de enzima en un volumen total de 1.2 mL. Todas las muestras se mantuvieron a 25 °C. La actividad catalasa se expresó como unidades de CAT • mg proteína<sup>-1</sup>, cada determinación de extracto se realizó por triplicado.

### **6.3.11 Contenido de ácido ascórbico-L**

Se cortaron y pesaron 10 g de pericarpio de la región ecuatorial de cada fruto. El tejido vegetal se comprimió empleando un exprimidor de acero inoxidable para obtener la fase líquida. De cada muestra extraída se realizó una dilución 1:20 con ácido metafosfórico. Inmediatamente se introdujo una tira indicadora de ácido ascórbico del kit RQflex plus (Merck, 1.6981.0001, Alemania) en el vaso conteniendo la muestra diluida, eliminando el exceso de líquido con papel absorbente. El contenido de ácido ascórbico-L, se midió de

acuerdo a la prueba de ácido ascórbico de Merck, el cual reduce el ácido molibdofosfórico amarillo a azul de fosfomolibdeno que se determinó reflectométricamente en el equipo RQflex plus (Merck, Alemania). Como control positivo se utilizó ácido ascórbico-L puro (Sigma-Aldrich, EUA); cada determinación se realizó por triplicado, expresando la concentración en  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

### **6.3.12 Nivel de Peroxidación de lípidos**

La concentración de malondialdehído (TBARS) se determinó de acuerdo al método indirecto descrito en Persky et al., (2000). Se homogenizó 0.1 g de pericarpio en mortero con 1.0 mL de reactivo tiobarbitúrico (TCA-TBA-HCl). Los homogenizados se incubaron por 30 min. a 90 °C, posteriormente se colocaron en baño de hielo y se centrifugaron a 12,000 g durante 15 min. La medición de malondialdehído se realizó a dos longitudes de onda 535 nm y 600 nm, el contenido de TBARS se expresó como  $\text{nmol TBARS} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ .

### **6.3.13 Nivel de proteínas carboniladas**

El contenido de grupos carbonilo en proteínas fue realizado basado en el procedimiento de Levine et al., (1990) con ligeras modificaciones como describe Prasad (1996). El tejido vegetal (0.2 g) se homogenizó con tampón de fosfatos potásico 100 mM, pH 7.0 y 2.5  $\mu\text{g}$  de cada uno de los inhibidores de proteasas leupeptina, pepstatina y aprotinina. El homogenizado se filtró empleando una malla de nylon y se centrifugó a 20,000 g durante 15 min. Se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante mediante el método descrito por Bradford (1996). Se tomaron 400  $\mu\text{l}$  de sobrenadante y se añadieron

100  $\mu\text{L}$  de 20 mM DNPH en tubos Eppendorf. Los tubos se incubaron durante 1 h. Agitando cada 15 min. Las proteínas fueron precipitadas con 500  $\mu\text{L}$  de 20 % de ácido tricloroacético (TCA), incubándose 10 min. a temperatura ambiente. Se concentró el precipitado conteniendo proteínas a 11,000 g durante 3 minutos y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se lavó tres veces con un mL de solución etanol:acetato de etilo (1:1). Posteriormente, el precipitado se resuspendió en 600  $\mu\text{L}$  de guanidina HCl 6M, incubándose por 15 min. a 37 °C. Se midió la absorbancia a 370 nm frente a un blanco de guanidina, así como los controles de HCl y DNPH. El contenido de grupos carbonilo se calculó utilizando un coeficiente de absorción molar de 22,000  $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , expresándose los resultados en  $\text{nmol} \cdot \text{mg}$  de proteína.

#### **6.3.14 Contenido de pigmentos**

El análisis de pigmentos por HPLC fue realizado de acuerdo con el método de Vidussi et al., (1996). Muestras de pericarpio (0.5 g en peso fresco) fueron cortadas de la zona ecuatorial del fruto, empleando para ello un sacabocado. Cada muestra fue extraída con 2.0 mL de acetona mediante agitación en ausencia de luz, el procedimiento se realizó en baño de hielo. Los pigmentos fueron mantenidos a -20 °C en solución de acetona, previo a su análisis por HPLC. Antes de la inyección, 500  $\mu\text{L}$  de extracto fueron mezclados con 250  $\mu\text{L}$  de 1 M acetato de amonio. El extracto fue inyectado dentro del sistema de HPLC, equipado con una columna Millipore, Waters Div. (Milford, Massachusetts, USA).  $\mu$ -porasil 125 Å, 10  $\mu\text{m}$ , 3.9 X 150 mm. La elusión fue realizada a una tasa de flujo de 1  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$  utilizando un gradiente binario entre el solvente A (Metanol: 0.5 N acetato de amonio acuoso, 70:30 v/v) y solvente B (Metanol) el cual fue programado de acuerdo al

siguiente procedimiento (minutos; % solvente A, % solvente B): (0;75,25), (1;50,50), (15;0,100), (19;75,25). Los solventes utilizados fueron todos de grado HPLC.

La identificación de pigmentos fue hecha por sus tiempos de retención en HPLC y por comparación del espectro de absorción UV-Vis en línea, con aquella de una librería de espectros establecidos de cultivos de referencia del Laboratorio de Pigmentos del CIBNOR.

### **6.3.15 Análisis estadísticos**

Para las variables morfológicas número de frutos cosechados, longitud de fruto, diámetro de fruto y peso fresco de fruto, se realizaron análisis de varianza considerando como única fuente de variación el factor salinidad, mientras que para el resto de las variables, los análisis de varianza se realizaron considerando dos factores o fuentes de variación. Como factor A, se consideraron los diferentes tratamientos salinos y como factor B, los diferentes tiempos (en días) de almacenamiento de los frutos. En ambos casos, cuando se encontraron diferencias significativas entre tratamientos y sus interacciones, se utilizó la prueba múltiple de comparación de medias Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico Statistica (StatSoft Inc. 2001). Para la elaboración de gráficos se utilizó el programa SigmaPlot 8.0 (SPSS, 2001)

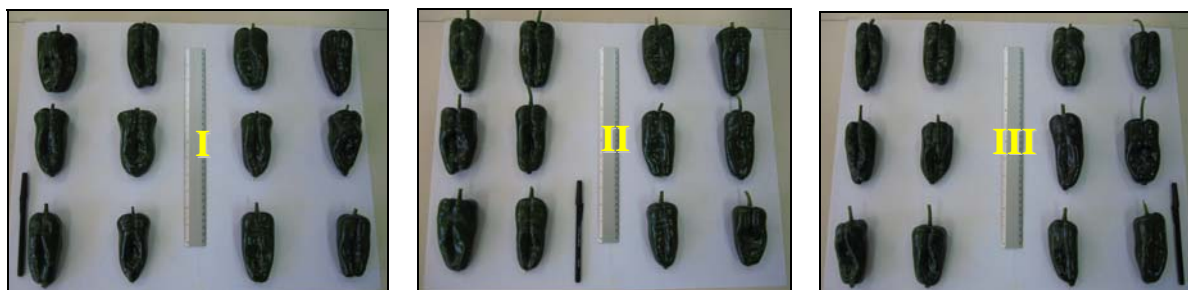
## 6.4 Resultados y discusión

### 6.4.1 Inducción del estrés salino

El análisis cualitativo mostró que los frutos cosechados presentaron las características físicas de tamaño, firmeza y coloración verde propias de la especie y variedad (Fig. 7). Asimismo, la superficie de los frutos fue lisa y brillante con ausencia total de defectos tales como grietas, pudriciones y quemaduras de sol.

### 6.4.2 Variables morfológicas y peso de frutos

En cuanto a las variables morfológicas número de frutos cosechados, longitud de fruto, diámetro de fruto y peso fresco de fruto, no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos (Tabla VI).



**Figura 7.** Frutos de chile ancho cv. Caballero en etapa verde, recolectados a los 60 días de crecimiento. Tratamientos. I: Control; II: 12.5 mM NaCl; III: 25 mM NaCl.



**Tabla VI.** Número de frutos, longitud, diámetro y peso fresco de frutos chile ancho cv. Caballero, recolectados a 60 días de crecimiento.

<b>Tratamiento*</b>	<b>Número frutos</b>	<b>Longitud (mm)</b>	<b>Diámetro (mm)</b>	<b>Peso fresco (g)</b>
I	29±8	63.4±5.69	36.0±2.43	21.1±4.04
II	25±5	71.5±3.38	39.0±2.31	25.4±4.26
III	25±5	68.8±6.86	37.1±2.79	23.0±4.11

\*Tratamientos. I: Control; II: 12.5 mM NaCl; III: 25 mM NaCl.

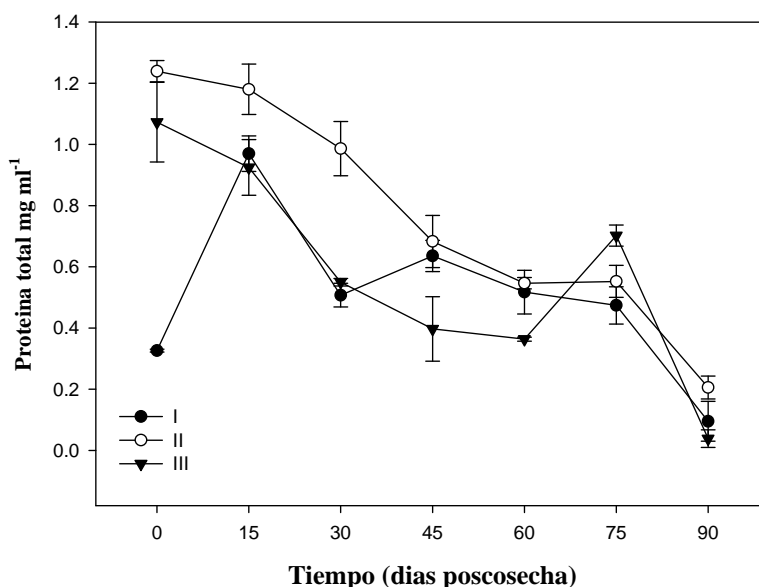
Los valores representan la media ± la desviación estándar.

#### **6.4.3 Almacenamiento a 4 °C.**

La coloración de los frutos almacenados (etapa verde) se observó hasta los 60 días después de la cosecha en los tratamientos salinos de 12.5 y 25 mM de NaCl, solo a partir de los 75 días después de la cosecha, se observaron cambios de coloración (turning) verde/naranja y verde/rojo en los tratamientos salinos antes mencionados. No se observaron cambios de coloración durante los 90 días de almacenamiento en los frutos del tratamiento control. La degradación de la clorofila es el primer síntoma visible de senescencia; con el tiempo, un cambio de coloración puede ser notorio, sin embargo, la senescencia ya ha ocurrido.

#### 6.4.4 Contenido de proteína total

El contenido de proteína total presentó diferencias significativas entre los tratamientos, se observó una disminución gradual con respecto al tiempo. El tratamiento II presentó un mayor contenido de proteína total respecto al tratamiento control. De acuerdo con Hernández-Saavedra y Ramírez-Serrano (2003) la exposición a un estrés moderado induce un mejoramiento en la resistencia a un estrés mucho más severo (tolerancia cruzada), por lo tanto, como respuesta a una condición de estrés, la célula produjo una serie de proteínas adicionales a aquellas que se sintetizaban antes de la condición de estrés. El tratamiento III, presentó una disminución desde el inicio hasta el día 60 entrando en un periodo de incremento hasta los 75 días y disminuyendo a partir de este momento.



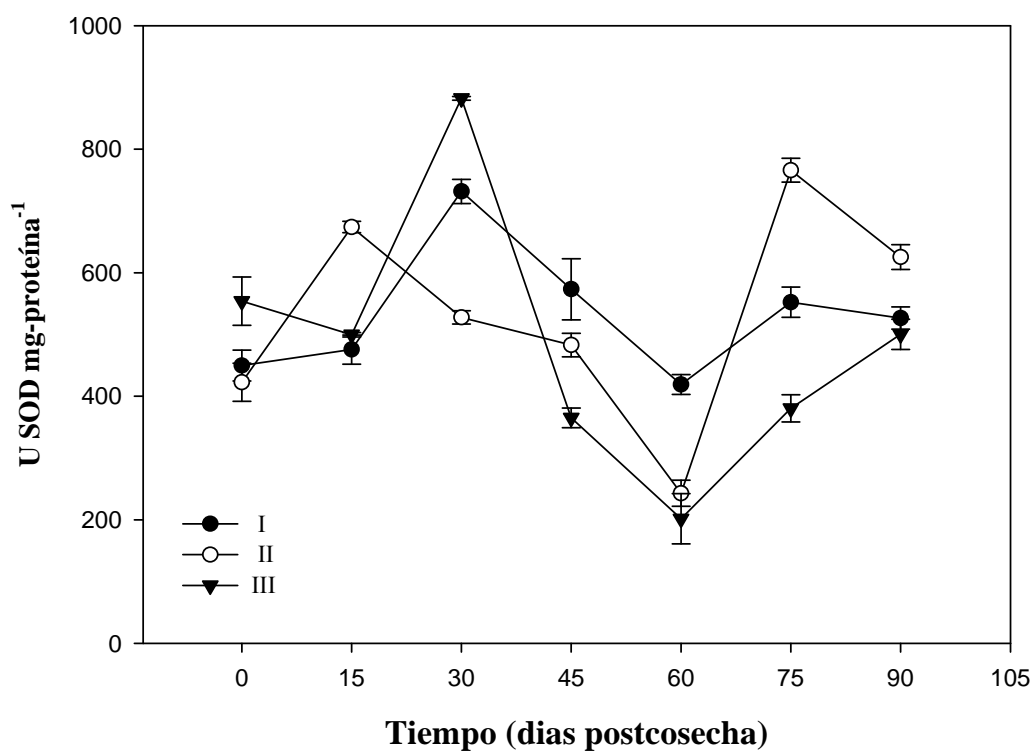
**Figura 8.** Contenido de proteína total en frutos de chile ancho *cv.* Caballero durante el tiempo de almacenamiento postcosecha a 4°C. Tratamientos. I: Control; II: 12.5 mM NaCl; III: 25.0 mM NaCl. Las barras en los símbolos representan la media  $\pm$  error estándar.

6.4.  
5

## Actividad SOD

### 6.4.5.1 Actividad SOD total

La actividad SOD total mostró diferencias significativas para el factor salinidad ( $F_{2,42}=29.85$ ,  $p=0.0000$ ), para el factor tiempos de almacenamiento de los frutos ( $F_{6,42}=251.87$ ,  $p=0.0000$ ) así como para la interacción de ambos factores ( $F_{12,42}=91.33$ ,  $p=0.0000$ ).



**Figura 9.** Actividad superóxido dismutasa total (SOD) en frutos de chile ancho cv. Caballero durante el tiempo de almacenamiento postcosecha a 4°C. Tratamientos. I: 0 mM NaCl; II: 12.5 mM NaCl; III: 25.0 mM NaCl. Las barras en los símbolos representan la media  $\pm$  error estándar.

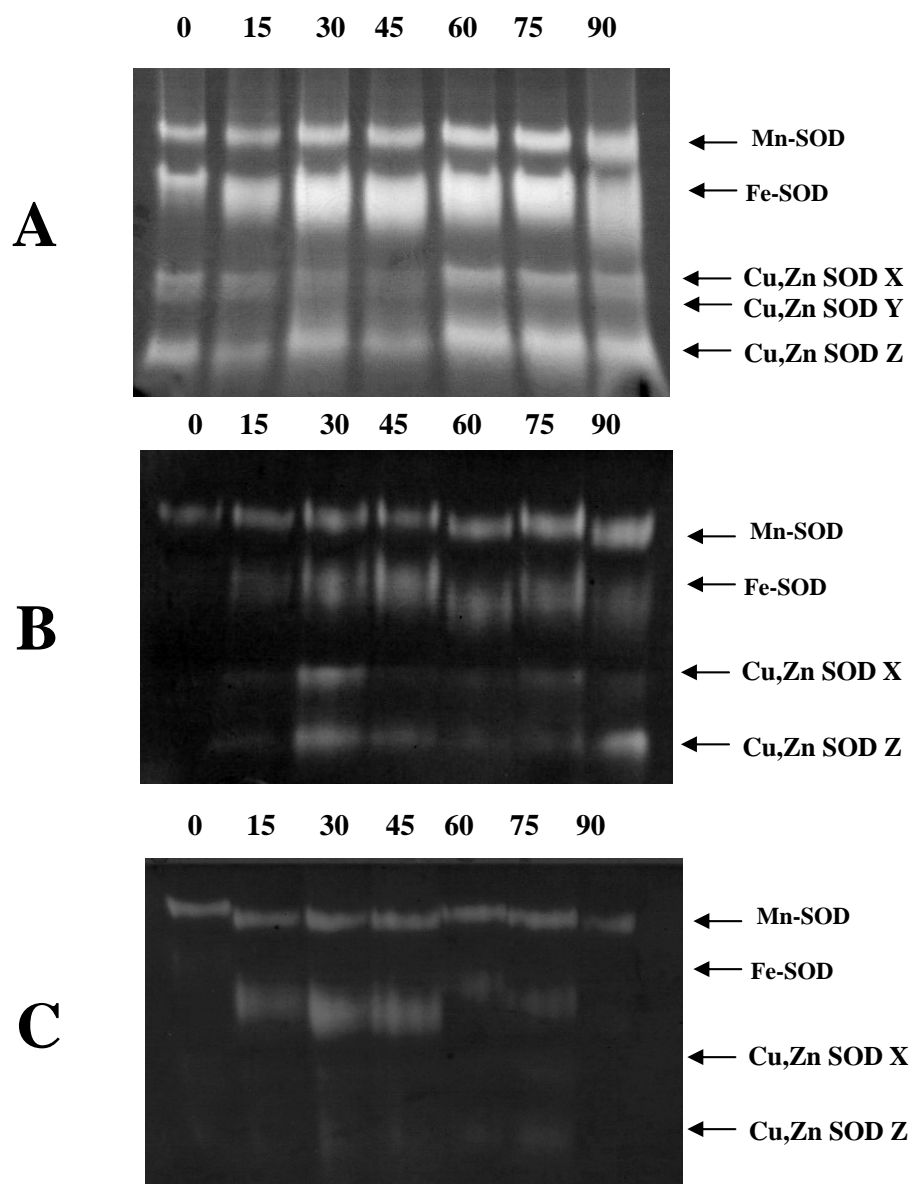
En los tratamientos a 12.5 y 25 mM de NaCl se observan tres etapas variables de actividad SOD, una etapa inicial de incremento (< 30 días), seguida de una etapa intermedia de disminución (30-60 días) y finalmente una etapa de incremento (>60 días posteriores a la cosecha) en ambos tratamientos salinos (Fig. 9).

Existe poca información en la literatura acerca de la actividad SOD durante la maduración y la reportada en frutos de pimiento (*Capsicum annuum* L.) es contradictoria. En un estudio realizado por Imahori et al., (2000) menciona que la actividad SOD en pimiento dulce se incrementa de la etapa verde a la verde/amarilla, en cambio Jiménez et al., (2003) menciona que la actividad SOD en pimiento cv. California disminuye al final de la maduración. Nuestros resultados de actividad SOD indican que la actividad fue más alta en los frutos verdes o en etapa de maduración (tratamiento I) y esta disminuye en los frutos con cambios de coloración de verde a rojo o en etapa de senescencia (tratamientos II y III). Nuestro razonamiento es que en los tratamientos II y III, la actividad SOD no fue suficiente para disminuir el exceso de radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en los distintos compartimentos celulares por lo que la célula utiliza el  $H_2O_2$  como señalizador induciendo la biosíntesis de antioxidantes no enzimáticos como carotenoides y ácido ascórbico (fruto en desarrollo) de tal manera que estos inhiban la formación de radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y subsecuentes especies reactivas de oxígeno, modificando con ello en igual proporción el estado de madurez fisiológica de los tejidos del fruto de chile ancho, incluso antes de la cosecha.

#### 6.4.5.2 Isoenzimas SOD

El análisis del patrón de isoenzimas SOD en el tratamiento I (Fig. 10A), mostro al menos cinco isoenzimas, que por su sensibilidad a inhibidores corresponden a una Mn-SOD, una Fe-SOD y tres Cu,Zn-SOD's designadas en este trabajo como X, Y y Z en base a su creciente movilidad en el gel. La actividad de las isoenzimas Mn-SOD y Fe-SOD se incremento durante los 90 días, mientras que la actividad de las Cu,Zn-SOD se incrementaron hasta a los 60 días, se observaron diferencias de actividad entre las tres Cu,Zn-SOD, siendo la isoenzima Z la que mostro mayor intensidad de banda.

En el análisis del tratamiento II, se identificaron una isoenzima Mn-SOD, una Fe-SOD y dos Cu,Zn-SOD (Fig. 10B). La actividad Mn-SOD se incremento durante los 90 días de almacenamiento, de manera similar al tratamiento I, mientras que la Fe-SOD a diferencia del tratamiento I se incremento a los 15 días. Solamente se observaron las isoenzimas Cu,Zn-SOD X y Z y estas fueron visibles el día 30, sin embargo disminuyeron durante el almacenamiento. En el tratamiento III (Fig. 10C), fueron visibles las isoenzimas Mn-SOD y Fe-SOD, la Mn-SOD permaneció constante hasta los 75 días de almacenamiento, mientras que la Fe-SOD presento un incremento de los 15 a 45 días. Se observaron las isoenzimas Cu,Zn-SOD X y Z, pero con muy poca actividad a lo largo del almacenamiento.



**Figura 10.** Estudio de las isoenzimas Mn-SOD, Fe-SOD y Cu,Zn SOD's durante el tiempo de almacenamiento a 4°C. Tratamientos: (A) 0 mM NaCl; (B) 12.5 mM NaCl; (C) 25 mM NaCl.

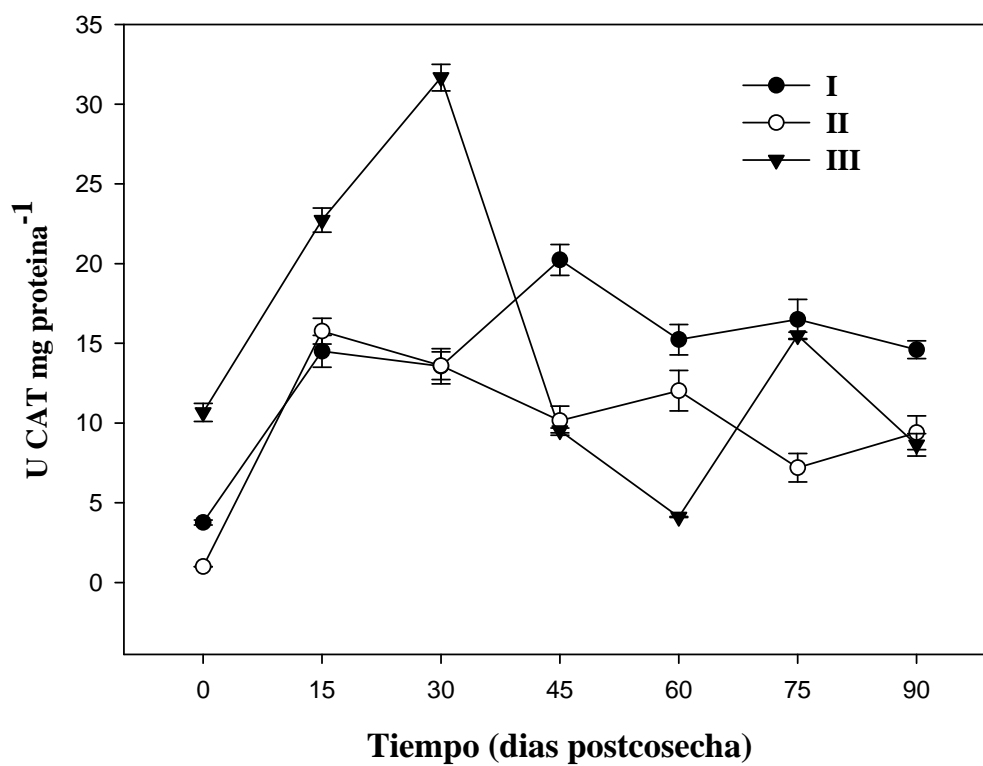
Al parecer los frutos de chile ancho fueron sometidos a un estrés adicional generado por bajas temperaturas durante el almacenamiento postcosecha a 4°C. Estudios previos realizados con frutos de manzana en almacenamiento frío, mencionan que la actividad SOD disminuye en frutos almacenados a bajas temperaturas (Du y Bramlage, 1994; Masia, 1998). Los resultados de actividad SOD total y los diferentes patrones de isoenzimas SOD de los tratamientos de nuestro estudio en almacenamiento a 4 °C, pudieran reflejar la sensibilidad de las SOD a bajas temperaturas en frutos de chile ancho cv. Caballero. El chile, es considerado un fruto sensible al frío y de acuerdo con la norma ISO 6659:1981 su almacenamiento en refrigeración debe ser a 8 °C por 3-5 semanas, es factible almacenar a 4 °C, pero solamente hasta 3 semanas, porque tiempos más largos de exposición pueden provocar daños por enfriamiento. Sin embargo a pesar de mantener los frutos por 90 días a 4 °C, no se observaron daños por congelamiento o puntos de necrosis. En los cultivares sensibles al enfriamiento el incremento en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede irreversiblemente inactivar las enzimas SOD (Bowler et al., 1992). Esta disminución de actividad SOD, podría estar relacionada con el incremento en los niveles de expresión del gen y de la enzima alternativa oxidasa (AOX) que reduce directamente el radical superóxido a una molécula de agua directamente y que ha sido demostrado presentar un incremento significativo, cuando frutos de pimiento fueron almacenados a bajas temperaturas (Purvis, 2002; Fung et al., 2004). Purvis y Shewfelt (1993) fueron los primeros en proponer que la AOX redujo la producción de AOS, donde esta oxida directamente a QH<sub>2</sub> sin la formación de los inestables QHs y es activa cuando el consumo de energía de la célula es bajo. Estudios posteriores en los cuales la actividad AOX fue variando por el uso de inhibidores de las rutas de citocromo y alternativa, y desacopladores de la cadena de transporte de

electrones y ADP, soportaron fuertemente la hipótesis que la producción de superóxido es reducida cuando la AOX es activa (Purvis et al., 1995; Purvis, 1997; Popov et al., 1997; Wagner and Purvis, 1998; Braidot et al., 1999).

#### **6.4.6 Actividad catalasa**

La actividad catalasa (Fig. 11) mostró diferencias significativas para el factor salinidad ( $F_{2,42}=217.22$ ,  $p=0.0000$ ), para el factor tiempos de almacenamiento de los frutos ( $F_{6,42}=313.48$ ,  $p=0.0000$ ) así como para la interacción de ambos factores ( $F_{12,42}=159.62$ ,  $p=0.0000$ ). La actividad catalasa en el tratamiento salino III, se incrementó hasta los 30 días de almacenamiento, sin embargo disminuyó inmediatamente en igual proporción hasta el día 90 de almacenamiento. Los resultados de los tratamientos II y III, confirman que la disminución de la actividad catalasa en la célula, es paralela a la disminución de la actividad SOD, después de los 45 días de almacenamiento. El incremento de la actividad catalasa en el tratamiento III durante los primeros 30 días, es acorde con los resultados de Masia A. (1998), los cuales muestran que la actividad catalasa fue inducida a bajas temperaturas, como una respuesta del sistema de defensa a la exposición de frutos a bajas temperaturas, lo que resulta en la acumulación de  $H_2O_2$  como señal de estrés oxidativo.





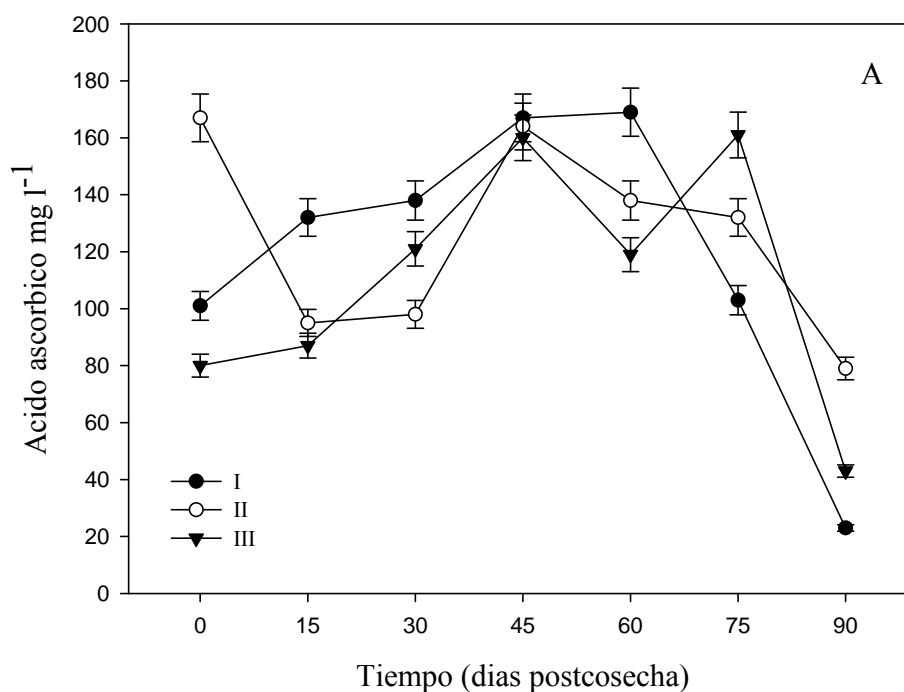
**Figura 11.** Actividad catalasa (CAT) en frutos de chile ancho *cv.* Caballero durante el tiempo de almacenamiento postcosecha a 4°C. Tratamientos. I: Control; II: 12.5 mM NaCl; III: 25.0 mM NaCl. Las barras en los símbolos representan la media  $\pm$  error estándar.

#### 6.4.7 Contenido de ácido ascórbico-L

Los resultados del ácido ascórbico mostraron diferencias significativas para el factor salinidad ( $F_{2,42}=29.12$ ,  $p=0.0000$ ), para el factor tiempos de almacenamiento de los frutos ( $F_{6,42}=304.61$ ,  $p=0.0000$ ) así como para la interacción de ambos factores ( $F_{12,42}=63.78$ ,  $p=0.0000$ ). El contenido de ácido ascórbico-L obtenido en los tres tratamientos (Fig. 12) se encuentra dentro del rango reportado en varios tipos de chiles, 46-243 mg·100 g<sup>-1</sup> peso fresco (Wimalasiri y Wills, 1983; Howard et al, 1994, 2000, Lee et al., 1995; Kader y Lee, 2000). El contenido de ácido ascórbico-L en condiciones basales (tratamiento I) se incrementó significativamente hasta los 60 días, confirmando estudios previos que reportaron incrementos durante la maduración de pimiento (Howard et al., 1994, 2000; Osuna-García et al., 1998). El contenido de ácido ascórbico-L en el tratamiento II disminuyó casi 70 mg·L<sup>-1</sup> durante los primeros 30 días, recuperando su nivel inicial al día 45 y disminuyendo nuevamente, en comparación con el tratamiento I. El contenido de ácido ascórbico-L en el tratamiento III, fue significativamente menor al tratamiento I, hasta el día 75. Estas disminuciones indican que durante los primeros 30 días de almacenamiento el ácido ascórbico-L pudo haber sido utilizado como sustrato por la ascorbato peroxidasa (APX) del ciclo ascorbato-glutatión para detoxificar altos contenidos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por la SOD, el incremento de actividad catalasa en este periodo, puede confirmar esta hipótesis ya que ambas enzimas utilizan al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato.

Algunos autores han encontrado que el ácido ascórbico se incrementa o permanece constante cuando los frutos de pimiento maduraron (Howard et al., 1994. 2000; Osuna-

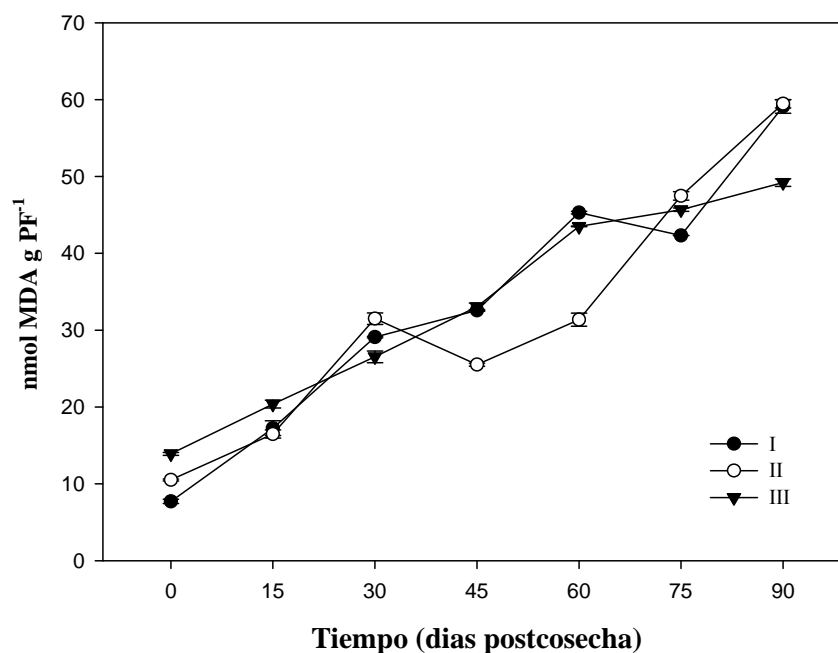
Garcia, Wall, & Wadell, 1998; Rahman, Cuckle, & Edwardsn, 1978), y disminuyeron con la maduración organoléptica mas avanzada (Gnayfeed et al., 2001).



**Figura 12.** Concentración de ácido ascórbico en frutos de chile ancho cv. Caballero durante el tiempo de almacenamiento postcosecha a 4°C. Tratamientos. I: Control; II: 12.5 mM NaCl; III: 25.0 mM NaCl. Las barras en los símbolos representan la media  $\pm$  error estándar.

#### 6.4.8 Nivel de peroxidación de lípidos.

La actividad de la peroxidación de lípidos mostró diferencias significativas para el factor salinidad ( $F_{2,42}=41.9$ ,  $p=0.0000$ ), para el factor tiempos de almacenamiento de los frutos ( $F_{6,42}=8358.0$ ,  $p=0.0000$ ) así como para la interacción de ambos factores ( $F_{12,42}=223.5$ ,  $p=0.0000$ ). El índice de lipoperoxidación se incrementó significativamente en los tres tratamientos salinos, siendo seis veces superior a los 90 días (Fig. 12). Estos datos indican que el daño oxidativo en las membranas celulares se incrementó durante la maduración de los frutos, observándose signos de deterioro como la pérdida de firmeza de los frutos a partir de los 60 días de almacenamiento, principalmente en los frutos con tratamientos salinos (12.5 y 25 mM de NaCl).



**Figura 13.** Nivel de peroxidación de lípidos en frutos de chile ancho cv. Caballero durante el tiempo de almacenamiento postcosecha a 4°C. Tratamientos. I: Control; II: 12.5 mM NaCl; III: 25.0 mM NaCl. Las barras en los símbolos representan la media  $\pm$  error estándar.

#### 6.4.9 Nivel de Proteínas carboniladas

El contenido de proteínas carboniladas mostró diferencias significativas para el factor salinidad ( $F_{2,42}=1984.3$   $p=0.0000$ ), para el factor tiempos de almacenamiento de los frutos ( $F_{6,42}=101.9$ ,  $p=0.0000$ ) así como para la interacción de ambos factores ( $F_{12,42}=916.9$ ,  $p=0.0000$ ). La formación de grupos carbonilo en los frutos del tratamiento I, ocurrió paralelamente con la maduración entre los 5-6 nmol• mg proteína<sup>-1</sup> hasta el día 75, aumentando finalmente en la etapa de senescencia. El contenido de proteínas carboniladas en el tratamiento II fue significativamente menor respecto al tratamiento I. El tratamiento III, presento diferencias significativas partir del día 45, respecto al tratamiento I. Los resultados de contenido de proteínas (Tabla VII) y proteínas carboniladas en los tres tratamientos, muestran una relación ya que al disminuir la concentración de proteínas totales los niveles de proteínas carboniladas aumentan en función del tiempo de almacenamiento.

Tabla VII. Contenido de proteína carbonilada en frutos de chile ancho *cv.* Caballero de plantas sometidas a diferentes tratamientos salinos. Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar.

Tratamientos (mM NaCl)	Tiempo (días postcosecha)	Proteína carbonilada (nmol.mg proteína <sup>-1</sup> )
0	0	5.202 $\pm$ 0.065 i*
0	15	5.621 $\pm$ 0.071 fgh
0	30	5.751 $\pm$ 0.063 fg
0	45	5.075 $\pm$ 0.050 i
0	60	5.208 $\pm$ 0.058 i
0	75	5.514 $\pm$ 0.077 gh
0	90	6.585 $\pm$ 0.069 d
12.5	0	5.778 $\pm$ 0.066 f
12.5	15	4.370 $\pm$ 0.035 jk
12.5	30	6.064 $\pm$ 0.055 e
12.5	45	3.103 $\pm$ 0.044 n
12.5	60	4.568 $\pm$ 0.073 j
12.5	75	3.671 $\pm$ 0.052 m
12.5	90	4.080 $\pm$ 0.069 l
25	0	4.033 $\pm$ 0.035 l
25	15	5.468 $\pm$ 0.085 h
25	30	4.179 $\pm$ 0.157 kl
25	45	7.489 $\pm$ 0.050 b
25	60	7.058 $\pm$ 0.160 c
25	75	8.076 $\pm$ 0.082 a
25	90	5.689 $\pm$ 0.087 fgh

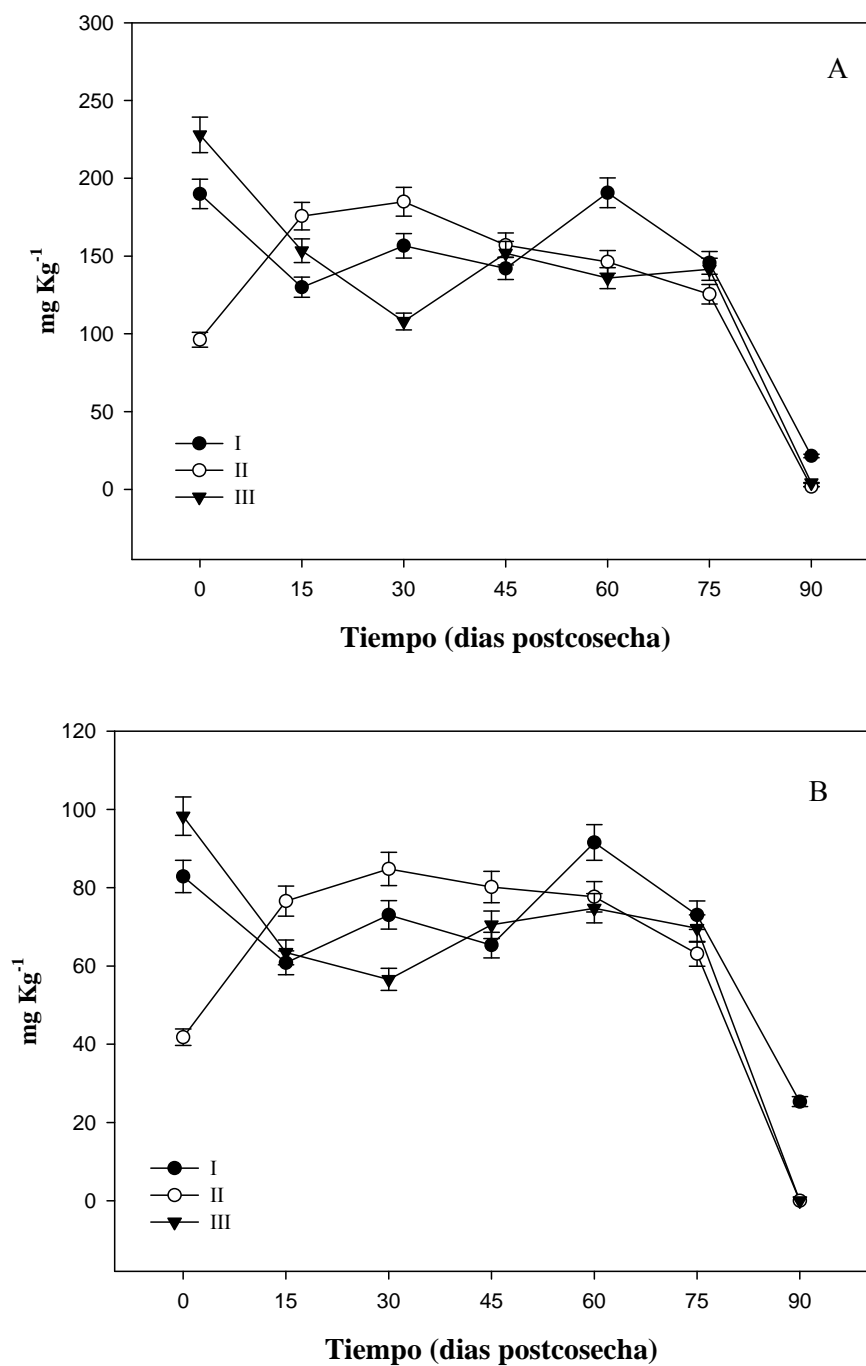
\*Valores con misma literal en columna, no difieren significativamente (Tukey  $p=0.05$ )

## 6.4.9 Contenido de Pigmentos

### 6.4.9.1 Clorofilas *a* y *b*

El contenido de clorofila *a* mostró diferencias significativas para el factor salinidad ( $F_{2,42}=16.36$   $p=0.0000$ ), para el factor tiempos de almacenamiento de los frutos ( $F_{6,42}=526.83$ ,  $p=0.0000$ ) así como para la interacción de ambos factores ( $F_{12,42}=71.29$ ,  $p=0.0000$ ). Asimismo, el contenido de clorofila *b* mostró diferencias significativas para el

factor salinidad ( $F_{2,42}=23.67$   $p=0.0000$ ), para el factor tiempos de almacenamiento de los frutos ( $F_{6,42}=467.55$ ,  $p=0.0000$ ) así como para la interacción de ambos factores ( $F_{12,42}=60.36$ ,  $p=0.0000$ ). Los resultados indican que el contenido de clorofila *a* (100-200  $\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ) fue el doble de clorofila *b* (40-100  $\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ), en los tres tratamientos. Los contenidos de clorofila *a* y *b* en los frutos (Fig. 14A, B), presentaron diferencias significativas ( $p<0.05$ ) entre los tratamientos. En el tratamiento II se observó un incremento en clorofila *a* y *b* desde el tiempo cero hasta los 30 días y a partir de los 45 días disminuyó significativamente ( $p<0.05$ ) hasta degradarse al día 90. La etapa de incremento de clorofila *a* y *b* en el tratamiento II, puede estar relacionada con el crecimiento del fruto que pudo haber sido estimulado como respuesta al incremento moderado de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , generando más células para almacenar el mayor número de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  manteniendo así la homeostasis celular. Este incremento de clorofilas puede estar relacionado directamente con los valores obtenidos en las variables morfológicas del tratamiento II, ya que se registraron los valores más altos en el menor número de frutos. En el tratamiento III, se presenta una disminución significativa, pero esta se da a partir del día 15, manteniéndose constante hasta el día 75, al día 90 el contenido de clorofila *a* y *b* fue completamente degradada. El contenido de clorofila *a* y *b* en el tratamiento I, se mantuvo constante (75  $\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ) hasta el día 75 disminuyendo al final del experimento a 25  $\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ . La degradación de la clorofila es el primer síntoma visible de la senescencia, con el tiempo un cambio de coloración puede ser visto, esto indica que la senescencia ya ha empezado.



**Figura 14.** Contenidos de A) clorofila *a* y B) clorofila *b* en frutos de chile ancho cv. Caballero durante el tiempo de almacenamiento postcosecha a 4°C. Tratamientos. I: Control; II: 12.5 mM NaCl; III: 25.0 mM NaCl. Las barras en los símbolos representan la media  $\pm$  error estándar.



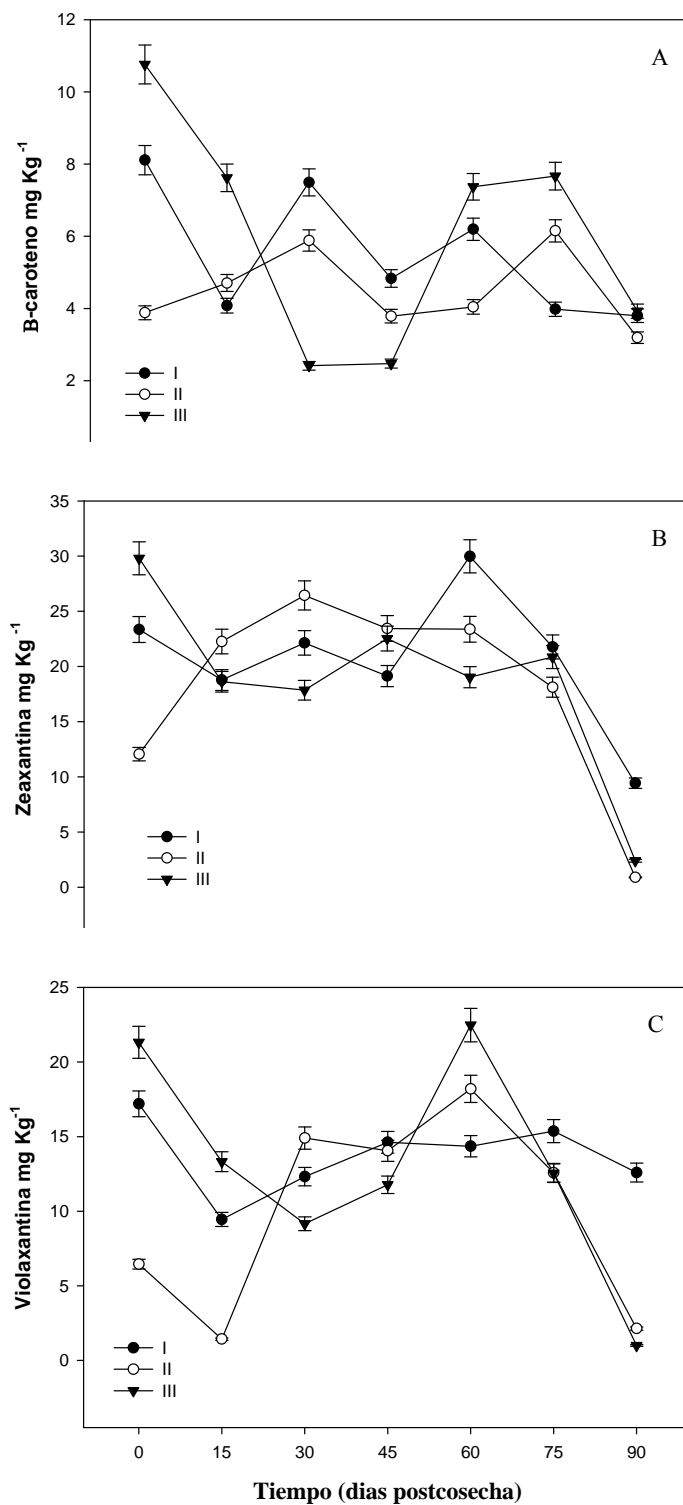
#### 6.4.9.2 Carotenoides

Los resultados del presente estudio muestran diferencias tanto en la composición como en la concentración relativa de carotenoides, encontrándose diferencias significativas para el factor salinidad ( $F_{2,42}=184.92, 35.62, 148.83$   $p=0.0000$  para violaxantina, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno, respectivamente), para el factor tiempos de almacenamiento de los frutos ( $F_{6,42}=376.28, 385.79, 204.15, p=0.0000$  para violaxantina, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno, respectivamente) así como para la interacción de ambos factores ( $F_{12,42}=151.58, 71.50, 157.22, p=0.0000$  para violaxantina, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno, respectivamente).

Los resultados del estudio de pigmentos carotenoides presentaron diferencias tanto en la composición como en la concentración relativa (Fig. 15 A, B, C). La composición de carotenoides identificados fue similar a los reportados en otras variedades de *C. annuum* (Deli et al., 1992, 1996, Kim et al., 2004, Zuñiga et al., 2005), siendo en nuestro estudio mas abundantes zeaxantina, violaxantina y  $\beta$ -caroteno. Astaxantina que ha sido reportado en frutos de coloración rojo, fue cuantificable en frutos de tratamientos salinos, solamente al día 90. El contenido de  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y violaxantina, disminuyo significativamente en los frutos del tratamiento II, mientras que en el tratamiento III aumento significativamente on respecto al tratamiento I. Estos resultados fueron consistentes con otros estudios, cuantificando carotenoides de chile como una funcion de la madurez (Davies et al., 1970; Minguez-Mosquera y Hornero-Mendez, 1994; Markus et al., 1999). Multiples observaciones sugieren que el estres oxidativo regula la biosintesis de carotenoides durante la transicion de cloroplastos a cromoplastos en las plantas (Bouvier et al., 1998) . Donde se menciona que una desregulacion de enzimas antioxidantes induce la

expresión de genes carotenogénicos, esta información sugiere una comunicación cruzada entre las enzimas antioxidantes y carotenogénesis en plastidos, que puede ser inferida por el enlace entre catalasa y la biogénesis de carotenoides como se muestra por estudios tempranos con plantas y hongos.

La disminución de clorofilas *a* y *b* es resultado del cambio de la etapa de maduración organoléptica a la senescencia o envejecimiento del fruto, paralelamente con el ‘aumento’ o presencia visual de pigmentos carotenoides, lográndose ver cambios de coloración verde/naranja y verde/rojo (día 90) en los tratamientos salinos. No todos los efectos de salinidad pueden ser negativos; la salinidad puede tener algunos efectos favorables sobre el rendimiento, calidad y resistencia a enfermedades (Larrinaga et al., 2001, Navarro et al., 2006). Un estudio con espinacas, menciona que su rendimiento pudo incrementarse inicialmente con irrigaciones de salinidad baja a moderada (Osawa, 1963). En zanahorias, el contenido de azúcar se incrementa, mientras que el contenido de almidón en papas, disminuye al incrementarse la salinidad (Bernstein, 1959). En nuestro estudio se demostró que las irrigaciones con concentraciones de NaCl a 25.0 mM tienen el potencial para utilizarse como un tratamiento efectivo en chile ancho para facilitar la biosíntesis de carotenoides y acelerar así los cambios de coloración, sin afectar el desarrollo del fruto y sus propiedades organolépticas. Esta aceleración podría disminuir el tiempo de maduración del fruto en la planta y reducir con ello los costos del mantenimiento del cultivo en el invernadero.



**Figura 15.** Contenido de: A)  $\beta$ -caroteno B) zeaxantina y C) violaxantina en frutos de chile ancho cv. Caballero durante el tiempo de almacenamiento postcosecha a 4°C. Tratamientos. I: Control; II: 12.5 mM NaCl; III 25.0 mM NaCl. Las barras en los símbolos representan la media  $\pm$  error estándar.

Nuestros resultados demuestran que la actividad de las enzimas antioxidantes SOD en los frutos del tratamiento I, sirven como un biomarcador del grado de estrés oxidativo presente en los frutos de chile ancho, debido tanto a la intensidad del estrés salino inducido en el cultivo, como por la variación metabólica durante el tiempo de almacenamiento postcosecha a 4°C. La alta actividad SOD en el tratamiento I, corresponde a los bajos niveles obtenidos de peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas, degradación de clorofilas y mayor contenido de  $\beta$ -caroteno, lo que da como resultado que los frutos de chile ancho presenten una maduración mas prolongada y una senescencia "normal" durante el tiempo de almacenamiento a 4 °C. De esta manera los niveles de actividad SOD en los tratamientos salinos en comparacion con el tratamiento basal, nos permiten diferenciar la etapa de maduración en frutos sometidos a concentraciones de salinidad menores a 25 mM de NaCl, incluso bajo condiciones de estres por bajas temperaturas. Los resultados muestran que los frutos almacenados a 4 °C permanecieron en etapa de maduración postcosecha verde hasta los 75 días del almacenamiento, periodo en que signos de envejecimiento como pérdida de firmeza y disminución de tamaño fueron evidentes en los frutos con tratamientos salinos (12.5 y 25 mM), iniciando la aparición de pigmentación naranja y roja en ambos tratamientos salinos.

El empleo de biomarcadores de maduración en condiciones de estres salino, puede ayudar a determinar el umbral de salinidad en los cultivares de chile con mayor demanda o seleccionar los mas aptos para las regiones aridas y semiaridas.

## 7. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos permiten concluir que la salinidad aplicada en el cultivo de los frutos de chile a partir de NaCl y agua de mar, generaron la inducción del sistema antioxidante enzimático a través de la enzima súperoxido dismutasa.
- La aplicación de la actividad SOD como biomarcador de la maduración postcosecha de chile ancho en condiciones de estrés salino, permite sugerir un periodo máximo de 60 días en almacenamiento a 4 °C.

**Primer Artículo: Respuesta antioxidante enzimática en frutos de chile ancho (*Capsicum annuum* L.) bajo condiciones de estrés salino. (Artículo publicado).**

### **Tratamientos con NaCl y con agua de mar diluida**

- El empleo de aguas salobres a una C.E. de  $2.8 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$  o  $12.5 \text{ mM}$  de NaCl en el cultivo de chile ancho cv. Caballero permitirá obtener frutos de calidad aceptable y con un contenido de antioxidantes significativamente alto.
- La principal diferencia encontrada entre los tratamientos con NaCl (II y III) y agua de mar (IV y V) correspondió al contenido de iones  $\text{Na}^+$ .
- Se determinó la C.E. de  $4.0 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$  como el umbral de salinidad para el empleo de aguas salobres en el cultivo del chile ancho cv. Caballero.

### **Actividad SOD y CAT**

- Las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) son útiles como biomarcadores del estrés salino y de la maduración de los frutos de chile ancho, ya que en base a su actividad permiten relacionar el grado de lipoperoxidación y los estados de madurez del fruto de chile ancho.

### **Contenido de ácido ascórbico-L**

- El contenido de ácido ascórbico no presentó diferencias significativas a los 90 días de crecimiento, en los tres tratamientos.

**Segundo artículo: Biomarcadores de maduración postcosecha en frutos de chile (*Capsicum annuum* L.) cultivados bajo condiciones de estrés salino. (Artículo sometido).**

### **Variables morfológicas y peso de frutos**

- Las variables morfológicas como número de frutos cosechados, longitud de fruto, diámetro de fruto y peso fresco de fruto, no se presentaron diferencias entre los tratamientos salinos y el control a los 60 días de cultivo.

### **Almacenamiento a 4 °C.**

- El almacenamiento a 4 °C, permite la conservación de los frutos con tratamientos salinos hasta los 60 días después de la cosecha, a partir de los 75 días después de la cosecha, se observaron cambios de coloración verde/naranja y verde/rojo.

### **Contenido de proteína total**

- Se obtuvo un incremento en la concentración de proteína total en frutos del tratamiento a 12.5 mM de NaCl.

### **Actividad SOD**

- Los niveles de actividad y las isoenzimas SOD en el tratamiento control, nos muestran el nivel de estrés oxidativo, lo que permite diferenciar la etapa de maduración en frutos en condiciones basales.
- El perfil de isoenzimas Cu,Zn-SOD en los tratamientos sometidos a concentraciones de salinidad a 12.5 y 25 mM NaCl, permiten diferenciar el grado de estrés salino inducido, incluso bajo condiciones de estrés por frío.

### **Actividad catalasa**

- La actividad catalasa fue inducida a bajas temperaturas, como una respuesta del sistema de defensa a la exposición de los frutos a la temperatura de almacenamiento.

### **Contenido de ácido ascórbico-L**

- El contenido de ácido ascórbico fue variable lo que indica su participación en el desarrollo del fruto.

### **Nivel de peroxidación de lípidos**

- El índice de lipoperoxidación se incrementó gradualmente en los tres tratamientos salinos, mostrando la maduración como un fenómeno de oxidación.

### Contenido de Pigmentos

- El contenido de clorofilas *a* y *b* disminuyo significativamente a partir del día 75 de almacenamiento a 4 °C, momento del cambio de coloración de los frutos de los tratamientos salinos.
- En nuestro estudio se demostro que las irrigaciones con concentraciones de NaCl a 25.0 mM tienen el potencial para utilizarse como un tratamiento efectivo en chile ancho para facilitar la biosíntesis de carotenoides y acelerar así los cambios de coloración, sin afectar el desarrollo del fruto y sus propiedades organolépticas.



## 8. LITERATURA CITADA

Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105: 121-126.

Aguilera, C.M., Martínez, R. 1996. Relaciones agua, suelo, planta, atmósfera. Universidad Autónoma de Chapingo, México, 256 pp.

Akerboom, T., Sies, H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77: 373–382.

Aktas, H., Karni, L., Dong-Chil, C., Turhan, E., Bar-Tal, A., Alón B. 2005. The supression of salinity-associated oxygen radicals production, in pepper (*Capsicum annuum*) fruit, by manganeso, zinc and calcium relation to its sensitivity to blossom-end rot *Physiol Plant.* 123:67-74.

Alonso, J.M., Chamarro, J., Granell, A. 1995. Evidence for the involvement of ethylene in the expression of specific RNAs during maturation of the orange, a non-climacteric fruit. *Plant Mol Biol.* 29: 385–390.

Apel, K., Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 55:373-399.

Arora, A., Sairam, R. K., Srivastava, G. C. 2002. *Current Science* 82:1227-1238.

Bandeoglu, E., Eyidogan, F., Yucel, M., Oktem, H.A. 2004. Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl salinity stress. *Plant Growth Regulation.* Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, the Netherlands 42:69–77.

Beauchamp, C., Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44:276-287.

Benavides-Mendoza, A. 2002. Estrategias para el uso de los mecanismos naturales de tolerancia al estrés en plantas. Artículo en línea.

Benavides-Mendoza, A., F. Ramírez-Godina, V. Robledo-Torres, H. Ramírez-Rodríguez, R.K. Maiti. 2002. Pepper seed treatment with salicylic and sulfosalicylic acid modifies seedling epidermal anatomy and cold stress tolerance. *Crop Research* 24:19-25.

Bernstein, L. 1995. Effects of salinity and sodicity on plant growth. *Annu Rev Phytopathol.* 13,295.

Berry, J. & Bjorkman, O. 1980. Photosyntetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol.* 31:491-543.

Bohnert, H. J. & Sheveleva, E. 1998. Plant stress adaptations, making metabolism move. *Curr Opin Plant Biol* 1:267–274.

Bohnert, H.J., Su, H. & Shen, B. 1999. Molecular mechanisms of salinity tolerance. En: K. Shinozaki & K. Yamaguchi-Shinozaki (eds.). *Molecular Responses to Cold, Drought, Heat, and Salt Stress in Higher Plants*. R.G. Landes Company, Austin, EEUU. pp. 29–62.

Bouvier F., Backhans R.A., Camara B. 1998. Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress, *J. Biol. Chem.* 273:30651-30659.

Bowler, C., van Montagu M., Inze, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 43:83–116.

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

Blum, A. 1988. *Plant Breeding for stress Environments*. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. 223 p.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Bramley, P. M. 2000. Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry* 54:233–236.

Breeze, E., Wagstaff, C., Harrison, E., Bramke, I., Rogers, H., Stead, A., Thomas, B., Wollaston, B. 2004. Gene expression patterns to define stages of postharvest senescence in *Alstroemeria* petals. *Plant Biotechnol J.* 2:155-168.

Brennan T, Frenkel C (1977) Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiol.* 59:411-416.

Burdon RH, O’Kane D, Fadzillah N, Gill V, Boyd PA, Finch RP (1996) Oxidative stress and responses in *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* subjected to chilling and salinity stress. *Biochem Soc Trans.* 24: 468–472.

Burke, J. J., Gamble, P. E., Hatfield, J. L. & Quisenberry, J. E., 1985 *Plant Physiol.* 79:415–419.

Cabieses F., 2003. Cosas del ají. Chasqui 8-9.

Caplan, A., Claes, B., Dekeyser, R. and Van Montagu, M. 1990 The Impact of biotechnology in Agriculture. Sangwan, R. S. & Sangwan-Norreel, B. S. (eds.), Kluwer Academic, Dordrecht, the Netherlands pp. 391–402.

- Carlos, G., Bartoli, M., Montaldi, S. E., Puntarulo, S. 1996. Oxidative stress, antioxidant capacity and ethylene production during ageing of cut carnation (*Dianthus caryophyllus*) petals *J. Exp. Bot.* 47:595–601.
- Chrispeels, M. J., Sadava D. E. 2003. Plants, genes, and crop biotechnology. Jones and Bartlett Publishers. 2 Ed. Sudbury, EEUU. pp. 1776.
- Collera-Zúñiga O., García F.J., Meléndez R.G. 2005. Comparative study of carotenoid composition in three Mexican varieties of *Capsicum annuum* L. *Food Chemistry* 90:109-114.
- Cramer, G. R. 2002. Calcium-sodium interactions under salinity stress. En: A. Läuchli and U. Lüttge (eds.). Salinity. Environment Plants Molecules. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, the Netherlands.
- Davies, B.H., Matthews, S., Kirk, J.T.O. 1970. The nature and biosynthesis of the carotenoids of different colour varieties of *Capsicum annuum*. *Phytochemistry* 9:797–805.
- De Marco A. y Roubelakis-Angelakis K. A. 1996. Hydrogen peroxide plays a bivalent role in the regeneration of protoplasts. *J Plant Physiol.* 149: 109–114.
- De Marco A. y Roubelakis-Angelakis K. A. 1999. Specific features of the ascorbate/glutathione cycle in cultured protoplasts. *Plant Cell Rep* 18: 406–411.
- del Río L.A., Pastori G.M., Palma J.M., Sandalio L.M., Sevilla F., Corpas F.J., Jiménez A., López-Huertas E., Hernández J.A. 1998. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence, Update on Biochemistry, *Plant Physiol.* 116:1195–1200.
- Deli, J., Matus, Z., Szaboles, J. 1992. Carotenoid composition in the fruits of Black Paprika (*Capsicum annuum* variety longum nigrum) during ripening. *J Agr Food Chem.* 40:2072–2076.
- Deli, J., Matus, Z., Tóth, G. 1996. Carotenoid composition in the fruits of *Capsicum annuum* cv. Szentesi kosszarvú during ripening. *J Agr Food Chem.* 44:711–716.
- Dhindsa R.S., Plumb-Dhindsa P., Reid D.M. 1982. Leaf senescence and lipid peroxidation: Effects of some phytohormones, and scavengers of free radicals and singlet oxygen. *Physiol Plant.* 56:453-457.
- Dionisio-Sese, M. L., Tobita, S. 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Sci.* 135:1–9.
- Du, Z., Bramlage, W.J. 1994. Superoxide dismutase activities in senescing apple fruit (*Malus domestica* Borkh.). *J Food Sci.* 59:581-584.

FAO, 2005. Global network on Integrated Soil Management for Sustainable Use of Salt-affected Soils. Rome, Italy: FAO Land and Plant Nutrition Management Service. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>

Flowers T.J., Flowers S.A. 2005. Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders? *Agr Water Manage.* 78:15–24.

Fox, A. J., D., Lee J. He., Sargent S. A., Talcott S. T. 2005. Ripening-induced chemical and antioxidant changes in bell peppers as affected by harvest maturity and postharvest ethylene exposure. *Hortscience* 40 (3): 732-736.

Foyer, C.H. 1993. Ascorbic Acid. En: R. G. Alscher & J. L. Hess (eds.) *Antioxidants in higher plants*. CRC Press. Boca Raton, EEUU. pp. 51-58.

Foyer, C. H., Lopez-Delgado, J. D. & Scott, I. 1997 Hydrogen Peroxide-and glutathione associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. *Physiol. Plant.* 100:241-254.

Fraser, P. D., Truesdale, M. R., Bird, C. R., Wolfgang, S. & Bramley P. M. 1994. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development. *Plant. Physiol.* 105:405-413.

Fung, R.W.M., Wang, C.Y., Smith, D.L., Gross, K.C., Tian, M., 2004. MeSA and MeJA increase steady-state transcript levels of alternative oxidase and resistance against chilling injury in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science* 166:711–719.

Giovannoni, J., 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 52:725-749.

Gossett D.R., Millhollon E.P., Lucas M.C., Don D. 1994. Antioxidant response to salt stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars in cotton. *Crop Sci* 34: 706–714.

Greenway, H. & Munns, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* 31, 149–190.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 3. Oxford University Press, Oxford, U.K. 936 pp.

Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K., Bohnert H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Ann. Rev. of Plant Physio. and Plant Mol. Biol.* 51:463–499.

Hernández J.A., Olmos E., Corpas F.J., Sevilla F., del Rio L.A. 1995. Salt induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Sci* 105:151–167.

Hernández-Saavedra, NY, Ramírez-Serrano, R (2004) Differential expression and function of copper-zinc superoxide dismutases under metal stress in the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Marine Biotechnology* 6:S1-S5.

Howard, L. R., Smith, R. T., Wagner, A. B., Villalon, B. & Burns, E. E. 1994 Provitamin A and ascorbic acid content of fresh peppers cultivars (*Capsicum annuum*) and processed jalapenos. *J. Food Sci.* 59, 362-365.

Howard, L.R., Talcott, S.T., Brenes, C.H., Villalon, B. 2000. Changes in Phytochemical and Antioxidant Activity of Selected Pepper Cultivars (*Capsicum* Species) As influenced by maturity. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 48:1713-1720.

INEGI (2006).Sistemas Nacionales Estadístico y de Información Geográfica. Versión en línea [www.inegi.com.mx](http://www.inegi.com.mx)

Jiménez A, Gomez JM, Navarro E, Sevilla F (2002) Changes in the antioxidative systems in mitochondria during ripening of pepper fruits. *Plant Physiol. Biochem.* 40:515-520.

Jiménez A., Romojaro, F., Gomez, J. M., Llanos, M. R. & Sevilla F. 2003. Antioxidant systems and their relationship with the response of pepper fruits to storage at 20 °C. *J. Agric. Food Chem.* 51:6293-6299.

Kader A.A., Lee S.K. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops *Postharvest Biology and Technology* 20:207-220.

Kafkafi, U., Valoras, N. Letey, J. 1982. Chloride interaction with nitrate and phosphate nutrition in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) *Journal of Plant Nutrition* 5:1369-1385.

Karpinski, S. H., Reynolds, B., Karpinska, G., Wingsle, G., Creissen, P. & Mullineaux I. 1999. Systemic signaling and acclimation response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 284:654-657.

Kawano T., Kawano N., Muto S., Lapeyyrie F. 2002. Retardation and inhibition of the cation-induced superoxide generation in BY-2 tobacco cell suspension culture by Zn and Mn. *Physiol Plant.* 114: 395-404.

Klutte A. 1996. Methods of soil analysis. Part 1. Physical and mineralogical methods. 2<sup>a</sup> ed. Madison, American Society of Agronomy, Soil Science Society of Agronomy. pp. 901-926.

Kotchoni S.O., Gachomo E.W. 2006. The reactive oxygen species network pathways: An essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *J. Biosci.* 31(3):389-404.

- Kranner I., R.P. Beckett, S. Wornik, M. Zorn & H.W. Pfeifhoer. 2002. Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. *Plant J.* 31:13-24.
- Larrinaga-Mayoral, J.A., Troyo-Dieguez, Enrique; Fujiyama, H. y Tinoco-Oganguren C. 2001. PHYTON *Internacional Journal of Experimental botany.*
- Larrinaga-Mayoral JA (2001) Efecto de NaCl sobre la fisiología, crecimiento y producción en plantas de chile (*Capsicum annuum L.*). Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S. México.
- Lee, Y., Howard, L.R., Villalón, B. 1995. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. *J Food Sci.* 60:473-476.
- Lester, D.R. 1999. Gibberellin 2-oxidation and the *SLN* gene of *Pisum sativum*. *Plant J.* 19:65-73.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol.* 186:464-479.
- López-Riquelme G.O. 2003. Chilli: La especia del nuevo mundo. *Ciencias* 69:67-75
- Luqman S, Rizvi SI. 2006. Protection of lipid peroxidation and carbonyl formation in proteins by capsaicin in human erythrocytes subjected to oxidative stress. *Phytother. Res.* 20:303-306.
- Maas E.V., Hoffman G.J. 1977. Crop salt tolerance-current assessment. *Journal of Irrigation Drainage* 103:115-134.
- Maggio A., De pascale S., Ruggiero C., Barbieri G. 2003. Physiological responses of pepper to salinity and drought. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 128:48-54.
- Malan, C., Greyling, M. M. and Gressel, J., *Plant Sci.*, 1990, 69, 157-166.
- Markus, F, Daood, H.G., Kapitany, J., Biacs, P.A. 1999. Change in the carotenoid and antioxidant content of spice red pepper (paprika) as a function of ripening and some technological factors. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 47:100-107.
- Martínez-Martínez, L. R. 2003. Respuesta bioquímica y molecular de la Simbiosis *Phaseolous vulgaris-Glomus intraradices* al estrés de agua. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Colima. Tecóman, Colima. México.
- Masia A. 1998. Superoxide dismutase and catalase activities in apple fruit during ripening and post-harvest and with special reference to ethylene. *Physiol plant.* 104:668-672.

- McKersie, B.D., Murnaghan, J., Jones, K. S. & Bowley, S. R. 2000. Iron-Superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. *Plant Physiol.* 122:1427-1438.
- Mínguez-Mosquera, M. I. y Hornero-Méndez, D. 1994. Comparative study of the effect of paprika processing on the carotenoids in peppers (*Capsicum annuum* L.) of the “Bola” and “Agridulce” varieties. *J Agri Food Chem.* 42:1555-1560.
- Misra, H. P. y Fridovich I. 1977. Superoxide dismutase: a photochemical, augmentation assay. *Arch Biochem Biophys* 181: 308–312.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405–410.
- Mittova V., Tal, M., Volokita M., Guy M. 2002. Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiol. Plant.* 115:393-400.
- Mori A., Lehmann S., O’Kelly J., Kumagai T., Desmond J.C., Pervan M., McBride W.H., Kizaki M., Koeffle H.P. 2006. *Cancer Res.* 66:3222.
- Nagata, M., y Yamashita, I. 1992. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Journal of Japanese Society of Food Science and Technology*, 39,925–928.
- Navarro J.M., Garrido C., Carvajal M., Martínez V. 2006. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chem.* 96:66-73.
- Nieto-Garibay A., Murillo-Amador B. Troyo-Diéguez E., Larrinaga-Mayoral J.A., García-Hernández J.L. 2002. El uso de compostas como alternativa ecológica para la producción sostenible del chile (*Capsicum annuum* L.) en zonas áridas. *Interciencia* 27:417-421.
- Ogi, Y. e Izawa, G. 1972. Quantitative changes of free amino acids and amides in barley plants during ammonia and nitrate assimilation. *Plant Cell Physiology* 13:249-259.
- Osawa, T. 1963. Studies on salt tolerance of vegetable crops with special reference to osmotic effects specific ion effects, *J Jap Soc Horti Sci.* 32:221-223.
- Osuna-García, J. A., Wall, M. M. & Waddell C. A. 1998. Endogenous levels of tocopherols and ascorbic acid during fruit ripening of new mexican-type chile (*Capsicum annuum* L.) *J. Agric. Food Chem.* 46:5093-5096.

- Paoletti F.D., Alduccini A., Caparrini A. 1986. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase in tissue extracts. *Anal. Bioch.* 154:536-541.
- Persky A.M., Green P., Stublely L., Howell C., Zaulyanov L., Brazeau G., Simpkins J. 2000. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *Proc Soc Exp Biol. Med* 223: 59–66.
- Powles, S.B. 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu Rev. Plant Physiol.* 35:15-44.
- Prasad, T. K., Anderson, M. D. & Martin, B.A. 1994. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6:65-74.
- Purvis, A., 2002. Regulation and role of the alternative oxidase in chilling injury of green bell pepper (*Capsicum annuum*). *Acta Horti* 553: 289–292.
- Ramírez-serrano, R., Larrinaga-mayoral, J.A., Murillo-Amador, B., Hernandez-Saaverda, NY., Fujiyama, H. 2008. Respuesta antioxidante enzimática en frutos de chile ancho (*Capsicum annuum* L.) bajo condiciones de estrés salino. *Interciencia* 33:377-383.
- Rhoades J., Kandiah A., Mashali A. 1992. The use of saline waters for crop production. Rome. FAO irrigation and Drainage Paper 48.133 p.
- SAGARPA-BCS, 2005. Estadísticas del cierre agrícola 2005. Consultado en enero 2008. <http://www.sagarpa.gob.mx/dlg/bajacaliforniasur/Agricultura/index.html>.
- Sairam, R. K., Deshmukh, P. S. & Saxena, D. C., *Biol. Plant.*, 1998. 41, 387–394.
- Sairam, R. K., Shukla, D. S. & Saxena, D. C., *ibid*, 1998, 40, 357–364.
- Sargent, S. 2000. Handling Florida vegetables: Pepper. Univ. Fla. Coop. Ext. Serv. IFAS, Gainesville. SS-VEC-927.
- Serrano R. 1999. A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *Journal of Experimental Botany* 50:1023-1036.
- Shalata A., Neumann P.M. 2001. Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. *J Exp Bot* 52: 2207–2211.
- Shannon M.C., Grieve C.M. 1999. Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia Horticulturae* 78:5-38.
- Sies, H. 1991. Oxidative stress: Oxidant and Antioxidant. London: Academic Press.



- Siminis C.I., Kanellis A. K., Roubelakis-Angelakis K.A. 1994. Catalase is differentially expressed in dividing and non dividing protoplasts. *Plant Physiol.* 105:1375–1383.
- StatSoft Inc. 2001. STATISTICA. System reference. StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA. 1098 p.
- Thomas, D.J., Jannette B., Thomas, S. D., Prier, N. E. & Nasso, S. K. 1999. Iron Superoxide dismutase protects against chilling damage in the *Cyanobacterium synechococcus* species PCC7942. *Plant Physiol.* 120:275-282.
- Thompson J.E., Ledge R.L., Barber R.F. 1987. The role of free radicals in senescence and wounding, *New Phytol.* 105:317–344.
- Umali D.L. 1993. Irrigation induced salinity technical. World Bank. Washington, DC Paper No. 215:3-25.
- Vanderslice, J. T., Higos, D. J., Hayes, J. M., Block, G., 1990. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid content of foods as eaten. *J. Food Compos. Anal.* 3:105-118.
- Vidussi, F., Claustré, H., Bustillos, J., Cailliau, C. Marty J. 1996. Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: separation of chlorophyll *a* from divinyl-chlorophyll *a* and zeaxanthin from lutein. *Journal of Plankton Research* 18:237-282.
- Villa, S. A. 1981. Los desiertos de México. General Technical Report WO-28 Arid Land Resource Inventories: Developing Cost-Efficient Methods. An International Workshop November 30-December 6, 1980. La Paz, México. 18-20.
- Walker R.R., Hawker J.S., Torokfalvy E. 1980. Effect of NaCl on growth, ion composition and ascorbic acid concentrations of capsicum fruit. *Scientia Hort.*, 12:211-220.
- Wimalasiri, P., Wills, R.B.H. 1983. Simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fruit and vegetables by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 256:368-371.
- Xiong L.y Zhu J. K. 2001. Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. *Physiol. Plant.* 112: 52–166.
- Xiong L. y Zhu J.K. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment* 25:131-139.

Yeo A. 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole plant physiology. *J. Exp. Bot.* 49: 913–929.

Zhu J.K., Hasegawa P. M. & Bressan R.A. 1997. Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Critical Rev Plant Sci.* 16:253–277.

Zhu J.K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6:66-71.