

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Doctorado en Ingeniería de Biosistemas

Manejo del estrés por sequía mediante el uso de luz UV-B en tabaco transgénico al gen
CchGLP

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Doctorado en Ingeniería de
Biosistemas

Presenta:

Diana Sáenz de la O

Dirigida por:

Ramón Gerardo Guevara González

Ramón Gerardo Guevara González

Presidente

Firma

Luis Miguel Contreras Medina

Secretario

Firma

Ana Angélica Feregrino Pérez

Vocal

Firma

Irineo Torres Pacheco

Suplente

Firma

Humberto Aguirre Becerra

Suplente

Firma

Dr. Manuel Toledano Ayala
Director de la Facultad de Ingeniería

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre 2022

RESUMEN

En años recientes se ha propuesto el manejo del estrés por sequía utilizando factores abióticos físicos, como la radiación ultravioleta (UV)-B, y químicos, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) pues se ha encontrado que tienen la capacidad de mitigar los efectos del déficit de agua en plantas. Por otra parte, el diseño de plantas transgénicas con alteraciones en su maquinaria antioxidante ha permitido generar genomas tolerantes o sensibles para estudiar la interacción entre el estrés oxidativo y la aclimatación a estrés. En este trabajo, se utilizó un tratamiento de 14 días de exposición a UV-B, correspondiente a una dosis biológicamente efectiva de 1.75 kJ m⁻² día⁻¹, en combinación con H₂O₂, para posteriormente, determinar la respuesta a un tratamiento de 7 días de sequía moderada en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). El manejo de H₂O₂ se realizó de dos maneras: 1) manejo endógeno, mediante el uso de un modelo de *Nicotiana tabacum* transgénico al gen *CchGLP*, que codifica una Manganese superóxido dismutasa (Mn-SOD) y en consecuencia, presenta una sobreproducción constitutiva de H₂O₂ mitocondrial y 2) manejo exógeno, mediante la aplicación foliar y radicular de 0,2 mM de H₂O₂ en el modelo silvestre (no transformado) de *N. tabacum*. Se investigó el efecto de la aplicación de los factores UV-B y H₂O₂, aplicados de forma combinada y por separado y la respuesta a sequía. El efecto se determinó en las variables relacionadas con el sistema antioxidante, así como variables morfológicas y genéticas.

Los resultados sugieren que: 1) la interacción entre las vías de señalización de UV-B y la sobreproducción de H₂O₂ mitocondrial genera un aumento importante en los niveles de ROS, en la capacidad antioxidante total y en las actividades enzimáticas de las plantas y, cuando son sometidas a condiciones adversas de sequía moderada se genera un desbalance que conlleva a una respuesta de distrés 2) un tratamiento de UV-B y H₂O₂ aplicado de forma exógena conlleva a una respuesta de eustrés o aclimatación a condiciones adversas de sequía moderada, que se asocian principalmente al aumento en la capacidad antioxidante no enzimática de las plantas y a los niveles de flavonoles epidérmicos foliares.

Palabras clave: UV-B, peróxido de hidrógeno, *Nicotiana tabacum* L., sequía, Mn-SOD

ABSTRACT

In recent years, drought stress management has been proposed using physical abiotic factors, such as ultraviolet (UV)-B radiation, and chemical factors, such as hydrogen peroxide (H₂O₂). Both UV-B and H₂O₂ have been found to alleviate the effects of water deficit in plants. On the other hand, the design of transgenic plants with alterations in their antioxidant machinery has made it possible to generate tolerant or sensitive genomes to study the interaction between oxidative stress and acclimatization to stress. In this work, a treatment of 14 days of exposure to UV-B was used, corresponding to a biologically effective dose of 1.75 kJ m⁻² day⁻¹, in combination with H₂O₂, to subsequently evaluate the response to a treatment of 7 days of moderate drought in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). The management of H₂O₂ was carried out in two ways: 1) endogenous management, using a model of *Nicotiana tabacum* transgenic to the *CchGLP* gene, which encodes a Manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) and consequently, presents a constitutive overproduction of H₂O₂ mitochondrial and 2) exogenous management, through foliar and root application of 0.2 mM of H₂O₂. The application of UV-B and H₂O₂ factors, applied in combination and separately, and the response to drought were determined by measuring variables related to the antioxidant system and morphological and genetic variables.

The results suggest that: 1) the interaction between UV-B signaling pathways and mitochondrial H₂O₂ overproduction generates a significant increase in ROS levels, total antioxidant capacity, and enzymatic activities in plants; and when they are subjected to adverse conditions of moderate drought, an imbalance is generated that leads to a distress response 2) a treatment of UV-B and H₂O₂ applied exogenously leads to an eustress or acclimative response to adverse conditions of moderate drought, which is mainly associated with the increase in the non-enzymatic antioxidant capacity of plants and the levels of foliar epidermal flavonols.

Key words: UV-B, hydrogen peroxide, *Nicotiana tabacum* L., drought, Mn-SOD

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por todas las veces que me ayudaron cuidando a Fau para poder ir al laboratorio y escribir. Sin ellos yo no estaría terminando un doctorado. Adri, por tu amor infinito. Mamá, por enseñarme sobre autonomía y alegría por la vida. Papá, por creer en mí y las pláticas filosóficas.

A Ramón Guevara, Åke Strid y Luis Morales por haberme recibido en sus grupos de trabajo y colaborado conmigo siempre con la mejor disposición.

A mis compañeras de generación. Ana Laura Villagómez por tu amistad, y por formar conmigo un equipo de apoyo. A Laura Caicedo por tu amistad y tu tenacidad al unirnos para escribir el artículo de bioética

A mis amigas y amigos del laboratorio, y colegas con los que me crucé mientras realizábamos nuestros proyectos, les agradezco por su apoyo práctico y acompañamiento. Les deseo lo mejor en sus caminos.

A mi comité tutorial: Angélica Feregrino, Luis Contreras, Humberto Aguirre e Irineo Torres. Por el apoyo que me brindaron, facilitándome equipos y espacios de trabajo, invitándome a colaboraciones, y por sus comentarios a mi trabajo.

Gracias al programa de becas de posgrado que otorga el CONACYT en conjunto con la UAQ por impulsar mi desarrollo profesional.

A Fausto

Te amo niñito

*“Hold on to the colour in your day.
I will always be around to reach your pain.
Home is where you don’t have to carry all of the worry.
You don’t have to bury all of the memories.
Hold on love.
Hold on to each other when you can.
Time will always come around to meet you with the answers.
Home is in your body”*

Nai Palm

TABLA DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN	11
2.	ANTECEDENTES	14
2.1.	ROS Y EL SISTEMA ANTIOXIDANTE DE LAS PLANTAS	14
2.2.	LUZ UV-B	15
2.3.	SEQUÍA	17
2.4.	FLAVONOIDES Y ESTRÉS HÍDRICO	18
2.5.	FLAVONOIDES Y LUZ UV	20
2.6.	TABACO COMO MODELO DE ESTUDIO.....	21
2.7.	PROTEÍNAS TIPO GERMINA (GLPs) Y DEFENSA DE LA PLANTA.....	22
2.8.	<i>CCHGLP</i>	22
2.9.	TABACO TRANSGÉNICO AL GEN <i>CCHGLP</i>	24
3.	HIPÓTESIS	26
4.	OBJETIVOS	26
4.1.	OBJETIVO GENERAL	26
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1.	DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA MORFOLÓGICA DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LAS PLANTAS DE TABACO POR EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS DE LUZ UV-B, H ₂ O ₂ Y SEQUÍA.	27
5.2.	DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS EN EL SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO Y NO ENZIMÁTICO POR EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS.....	33
5.2.1.	<i>Contenido de flavonoides en hoja</i>	33
5.2.2.	<i>Capacidad antioxidante total</i>	34
5.2.3.	<i>Actividades enzimáticas</i>	35
5.2.4.	<i>Fenilalanina amonio liasa (PAL)</i>	35
5.2.5.	<i>Catalasa (CAT)</i>	36
5.2.6.	<i>Superóxido dismutasa (SOD)</i>	36
5.2.7.	<i>Peroxidasa total (POD)</i>	36
5.3.	DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS A LA RESPUESTA A LA LUZ UV-B	36
6.	RESULTADOS	39
6.1.	DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA MORFOLÓGICA DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO POR EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS DE LUZ UV-B, H ₂ O ₂ Y SEQUÍA.....	39

6.2.	DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS EN EL SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO Y NO ENZIMÁTICO POR EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS.....	43
6.3.	DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS A SEQUÍA Y UV-B.....	48
7.	DISCUSIÓN	50
8.	CONCLUSIONES	59
9.	PERSPECTIVAS.....	60
10.	REFERENCIAS	61
11.	APÉNDICES.....	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Niveles relativos de CchGLP en las diferentes líneas transgénicas y el modelo silvestre	25
Tabla 2. Concentración en PPM de nutrientes aplicados	28
Tabla 3. Grupos de estudio	29
Tabla 4. Descripción de las mediciones realizadas para determinar la respuesta morfológica por efecto de los tratamientos	32
Tabla 5. Descripción de las pruebas realizadas para determinar la respuesta antioxidante por efecto de los tratamientos	33
Tabla 6. Efecto del tratamiento de UV-B en variables morfológicas	39
Tabla 7. Contenido relativo de agua foliar al final del tratamiento de sequía (día 21) en plantas del modelo N. tabacum transgénico L8 y sus respectivos controles	42
Tabla 8. Contenido relativo de agua foliar al final del tratamiento de sequía (día 21) en plantas de N. tabacum silvestre previamente elicitadas con 0.2mM H ₂ O ₂ y su respectivo control	43
Tabla 9. Resultados del análisis ANOVA de dos vías para los datos de la tabla 6	72
Tabla 10. Resultados del análisis ANOVA de dos vías para los datos de la figura 8	72
Tabla 11. Resultados del análisis ANOVA de tres vías para los datos de la tabla 7	73
Tabla 12. Resultados del análisis ANOVA de tres vías para los datos de la tabla 8	73
Tabla 13. Resultados del análisis ANOVA de dos vías para los datos de la figura 11	74
Tabla 14. Resultados del análisis ANOVA de tres vías para los datos de la figura 12	75
Tabla 15. Resultados del análisis ANOVA de tres vías para los datos de la figura 13	77
Tabla 16. Resultados del análisis ANOVA de tres vías para los datos de la figura 14	78
Tabla 17. Resultados del análisis ANOVA para los datos de la figura 15 (ANOVA de dos vías para TEAC día 14 y ANOVA de tres vías para TEAC día 21).....	79
Tabla 18. Resultados del análisis ANOVA de dos vías para los datos de la figura 16	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resumen de los efectos de la luz UV-B en el crecimiento, la fotosíntesis, los metabolitos secundarios y la interacción planta-insecto.....	16
Figura 2. Grupos de investigadores reportan la acumulación de flavonoides como potentes antioxidantes en respuesta al estrés.	20
Figura 3. La acumulación de metabolitos secundarios que absorben las radiaciones UV en el tejido epidérmico es un mecanismo primario de aclimatación ante estrés por luz UV.	21
Figura 4. Metodología empleada para la obtención de las plantas transgénicas de <i>N. tabacum</i> L.....	24
Figura 5. Acomodo de las plantas dentro de las cajas de acrílico en el invernadero.....	31
Figura 6. Curva de calibración del estándar antioxidante Trolox.....	35
Figura 7. Imágenes representativas de <i>Nicotiana tabacum</i> cv Xanthi nc correspondientes a los tratamientos (A) Control silvestre ; (B) Control transgénico; (C) Línea transgénica con expresión alta de CchGLP, después de 14 días de exposición a luz Ultravioleta (UV)-B.....	40
Figura 8. Efecto del tratamiento de UV-B y H ₂ O ₂ exógeno en variables morfológicas	40
Figura 9. Imágenes representativas de plantas de la línea transgénica 8 con expresión alta de CchGLP (L8) después de 5 días de exposición al tratamiento de sequía (Día 19 del experimento). (A) Grupo control (-UV-B); (B) Grupo experimental (+UV-B).....	41
Figura 10. Imágenes representativas de plantas expuestas a (A) 14 días de tratamientos y marchitamiento de plantas expuestas a 7 días de tratamiento de sequía (B) sin tratamiento, (C) UV-B, (D) H ₂ O ₂ y (E) UV-B + H ₂ O ₂	41
Figura 11. Cambios por efecto de UV-B en hojas de <i>N. tabacum</i> de los grupos control silvestre (CS), control transgénico (CT) y línea transgénica que expresa altamente CchGLP (L8). La parte gris de las barras corresponde a la media de los valores obtenidos en plantas mantenidas bajo el tratamiento de UV-B. Las barras sin presencia de una parte negra significan que el tratamiento UV-B no presentó un aumento en comparación con las condiciones de control. Las barras de error se presentan solo para las barras completas. Los asteriscos marcan las diferencias significativas cuando CT-UV-B o L8-UV-B eran diferentes de las CS-UV-B.....	44

Figura 12. Mapas de calor mostrando los cambios por efecto de 7 días de sequía moderada en hojas de <i>N. tabacum</i> de los grupos control silvestre (CS), control transgénico (CT) y línea transgénica que expresa altamente CchGLP (L8). Los paneles UV-B corresponden a datos obtenidos del grupo control (sin sequía) tratadas con UV-B; Los paneles de sequía corresponden a los datos obtenidos del grupo experimental (tratado con sequía) de plantas no tratadas con UV-B; Los paneles UV-B+Sequía corresponden a datos obtenidos del grupo experimental (tratado con sequía) de plantas tratadas con UV-B.	46
Figura 13. Actividades enzimáticas en hoja de <i>N. tabacum</i> al término del tratamiento de sequía (A) Fenilalanina Amonio Liasa (PAL); (B) catalasa (CAT); (C) Peroxidasa Total (POD); y (D) superóxido dismutasa (SOD).	47
Figura 14. Índice de flavonoles epidérmicos de la parte adaxial de las hojas estimado con Dualex el día 21 del experimento en plantas <i>Nicotiana tabacum</i> L. cultivadas bajo tratamiento con UV-B, H ₂ O ₂ o UV-B + H ₂ O ₂ , o en ausencia de tratamiento.	47
Figura 15. Capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) de los tratamientos UV-B-, H ₂ O ₂ - y UV-B + H ₂ O ₂ en las respuestas de <i>Nicotiana tabacum</i> L. a a) 14 días de aplicación de los tratamientos y b) a 7 días de tratamiento de sequía (Día 21 del experimento).	48
Figura 16. Acumulación de transcritos de los genes (A) DOMINIO NAC QUE CONTIENE LA PROTEÍNA 13 (NAC13); (B) BRI1-EMS-SUPRESOR 1 (BES1); y (C) CHALCONA SINTETASA (CHS) los días 0, 14 y 21 después del comienzo del experimento.	49
Figura 18. Modelo propuesto de dosis-respuesta de <i>N. tabacum</i> cv Xanthi que muestra la curva hormética de respuesta bifásica a condiciones de sequía moderada cuando el contenido de hojas de H ₂ O ₂ oscila entre 0,05 y 0,78 nmol mg ⁻¹ tejido de hoja.	58

1. INTRODUCCIÓN

El estrés por sequía en las plantas limita el desarrollo de éstas al afectar en funciones fisiológicas y bioquímicas (Fahad et al., 2017; Farooq et al., 2009). Sin embargo, los organismos vegetales han desarrollado respuestas orquestadas para hacer frente a los estímulos ambientales. El sistema redox de las plantas consta de dos procesos gobernados por la fotosíntesis, procesos anabólicos o reductores para almacenar energía, y procesos catabólicos u oxidativos para liberarla (Foyer & Noctor, 2003). Los agentes prooxidantes, como el anión superóxido, los radicales hidroxilo, el oxígeno singlete, el óxido nítrico y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), han sido ampliamente estudiados por ser componentes centrales de la cascada de transducción de señales involucrada en la adaptación de las plantas al entorno cambiante (Quan et al., 2008). No obstante, el estrés oxidativo se produce cuando el sistema redox sufre un desequilibrio causado por la incapacidad de neutralizar las ROS (Apel & Hirt, 2004). Por lo tanto, al ser organismos aeróbicos, la supervivencia de las plantas depende en gran medida del desarrollo de defensas que actúen como mecanismos eficientes de eliminación de ROS.

La tolerancia al estrés de las plantas ha sido ampliamente estudiada con respecto a la radiación UV, especialmente la región UV-B (280-315 nm), ya que la radiación bajo este espectro desempeña un papel importante en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas superiores (Jansen & Bornman, 2012). Un mecanismo clave durante la aclimatación exitosa por el uso de dosis suplementarias bajas de radiación UV-B es el control de las concentraciones celulares de H_2O_2 a través del sistema antioxidante (Brosché & Strid, 2003; Czégény et al., 2016; Frohnmeyer & Staiger, 2003). Una respuesta típica a los rayos UV-B es la acumulación de flavonoides y otros fenoles que absorben los rayos UV, y que además actúan como filtro y operan como antioxidantes no enzimáticos (Agati & Tattini, 2010). Sin embargo, las respuestas de las actividades antioxidante enzimáticas y no enzimáticas han mostrado diversidad entre los estudios en diversas especies vegetales.

En *Nicotiana tabacum*, se ha reportado una regulación positiva de las defensas antioxidantes inducidas por UV-B, como aumento en la actividad de las enzimas relacionadas con la peroxidasa y de los compuestos no enzimáticos, como los flavonoides, y que han resultado en un grado de tolerancia cruzada hacia otros factores de estrés (Majer, Czégény, Sándor, Dix & Hideg 2014; Rácz, Czégény, Csepregi & Hideg 2020). Además, varios investigadores

han desarrollado plantas de tabaco modificadas genéticamente con alteraciones en el sistema redox para ayudar a dilucidar los roles que juegan algunos componentes en el estrés oxidativo y la tolerancia cruzada. La aclimatación UV-B se reportó en un modelo transgénico que producía en exceso peroxidasas oxidantes de fenol (Jansen et al., 2004) y en líneas transplastómicas que sobre-expresaban glutatión reductasa (Czégény et al., 2016). Plantas transgénicas con expresión modificada de Cu/Zn-SOD aumentaron la resistencia a temperaturas frías y a intensidades de luz moderadas y altas (Gupta et al., 1993). La expresión simultánea de tres enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa de cobre-zinc (Cu/ZnSOD), ascorbato peroxidasa y dehidroascorbato reductasa (DHAR)) fue más eficaz que la expresión simple o doble para combatir el estrés inducido por paraquat (Lee et al., 2007).

En un reporte previo, se generó el modelo biológico *Nicotiana tabacum* L. Xanthi nc transgénico al gen *Capsicum chinense* L. *germin-like protein* (*CchGLP*), el cual expresa una proteína de tipo germina (GLP) con actividad de la enzima manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD) (Gasca-González et al., 2008; Guevara-Olvera et al., 2012; León-galván et al., 2011). Ésta última, es un elemento de defensa antioxidante en la mitocondria que elimina al radical libre superóxido ($O_2^{\cdot-}$) transformándolo en H_2O_2 y oxígeno molecular (Foyer & Noctor, 2003). En consecuencia, las líneas generadas de tabaco transgénico presentan una producción continua de H_2O_2 y se ha encontrado que el *CchGLP* induce la expresión de genes relacionados a la resistencia sistémica adquirida (Guevara-Olvera et al., 2012). De hecho, el tabaco transgénico con alta expresión de *CchGLP* ha mostrado tolerancia frente a infección por geminivirus (Guevara-Olvera et al., 2012), sequía (G. Cardenas-Manríquez et al., 2016), y sales de cadmio y aluminio (Sáenz-de la O et al., 2020).

El H_2O_2 , aplicado de forma exógena a las plantas también ha recibido considerable atención (Parola-Contreras et al., 2020; Vazquez-Hernandez et al., 2019). Entre las respuestas desencadenadas por H_2O_2 , a menudo se observa una tolerancia cruzada al estrés abiótico y biótico (Hossain et al., 2015). Se ha reportado tolerancia a sequía mediante la elicitación controlada de H_2O_2 en pepino (Sun et al., 2016), arroz (Sohag et al., 2020) y soja (Ishibashi et al., 2011). El estrés por sequía puede provocar daño oxidativo debido al aumento de los niveles de ROS en cloroplastos, peroxisomas y mitocondria (Cruz De Carvalho, 2008). A pesar de esto, la elicitación con H_2O_2 ha demostrado proteger a las plantas contra el daño al activar enzimas antioxidantes, como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión

peroxidasa y ácido ascórbico peroxidasa (APX), reduciendo así la acumulación de diferentes ROS (Hossain et al., 2015). Esto sugiere que el daño oxidativo puede ser evitado de manera efectiva por la maquinaria antioxidante después de la activación a través de la aplicación de H₂O₂ exógeno.

Numerosos reportes han demostrado que la combinación de factores reguladores del estrés, pueden interaccionar e inducir una respuesta diferencial o más pronunciada de tolerancia a condiciones adversas. Tratamientos combinados de sequía y radiación UV-B pueden causar efectos aditivos, es decir igual a la suma de los efectos causados por los factores individuales por separado, o efectos sinérgicos, es decir que los efectos de ambos factores se combinan e intensifican obteniendo un efecto mayor que la suma de los efectos de cada factor por si sólo (Alonso et al., 2015; Fina, 2017; Martínez-Lüscher et al., 2013). Se ha reportado que el tratamiento de radiación UV en plantas incrementa la tolerancia de éstas a la sequía y viceversa, las plantas que son más tolerantes a las sequías también es probable que sean más tolerantes a la radiación UV (Bandurska et al., 2013). En un reporte por Mátai et al. (2018), los efectos de aplicar tratamientos en paralelo de UV-B y de sequía en plantas de *Nicotiana benthamiana* L. fueron aditivos sobre la capacidad total de antioxidantes y de neutralización de oxígeno singlete. Por otra parte, se encontró un efecto sinérgico en el índice de flavonoides en hojas maduras, lo que sugirió que el tratamiento previo con UV-B tiene efectos duraderos para mitigar los efectos del déficit de agua. Sin embargo, aún se desconoce de qué manera la combinación de tratamientos de UV-B y H₂O₂ puede favorecer la tolerancia a la sequía.

El presente trabajo tuvo como objetivo investigar algunos componentes del sistema antioxidante, así como sus efectos en variables morfológicas y genéticas, durante la interacción entre el modelo de tabaco transgénico al gen *CchGLP* y un tratamiento de 14 días de exposición a UV-B, correspondiente a una dosis biológicamente efectiva de 1.75 kJ m⁻² día⁻¹, para posteriormente, evaluar la respuesta a un tratamiento de 7 días de sequía moderada. Además, para evaluar las diferencias entre la aplicación endógena y exógena de H₂O₂, se agregó un tratamiento que consistió en la aplicación foliar y radicular de 0,2 mM de H₂O₂ en el modelo silvestre de tabaco (no transformado).

2. ANTECEDENTES

2.1. ROS y el sistema antioxidante de las plantas

Durante su ontogénesis, las plantas enfrentan un entorno dinámico en función de factores abióticos (p. ej., luz / oscuridad, temperatura, disponibilidad de nutrientes y agua, y compuestos tóxicos como metales pesados) e interacciones bióticas (p. ej., microbios benéficos y patógenos, hongos, insectos, otros herbívoros) (Suzuki et al., 2014). Las perturbaciones ambientales que alteran significativamente el metabolismo, el desarrollo y el rendimiento, se consideran situaciones de estrés y provocan respuestas de estrés en el sistema biológico. Tal estrés impuesto suele ir acompañado de un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) que conducen a un desequilibrio entre su producción y eliminación (Laxa et al., 2019). A pesar de su naturaleza reactiva y, por lo tanto, tóxica, ROS y RNS también son componentes clave de las vías de transducción de señales que desencadenan respuestas de estrés. Además, ROS y RNS están involucrados en los procesos de desarrollo de las plantas (Mhamdi & Van Breusegem, 2018) y en las interacciones planta-microbio (Segal & Wilson, 2018). Sin embargo, el sistema antioxidante debe contrarrestar la producción excesiva de ROS y RNS para evitar el desarrollo de daños y la muerte celular.

La activación del sistema antioxidante mediante señalización retrógrada es un proceso clave en la aclimatación de las plantas al estrés oxidativo. La regulación positiva de las enzimas antioxidantes representa un indicador importante para diversos tipos de estrés biótico y abiótico. En la célula, la producción y eliminación de ROS y RNS está estrictamente controlada y el equilibrio puede verse perturbado por varios estreses bióticos y abióticos (Gill & Tuteja, 2010). Las plantas mantienen a las ROS bajo control mediante un sistema de barrido eficiente y versátil. La defensa antioxidante comprende compuestos de bajo peso molecular como glutatión (GSH), ascorbato (ASC), α -tocoferol, carotenoides y enzimas que incluyen catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y las tiol peroxidasas del tipo PRX y glutatión peroxidasa (GPX) (Hussain et al., 2016). Las tiol peroxidasas están unidas a la NADPH-tiorredoxina reductasa (NTR), dependiente de ferredoxina TRX reductasa (FTR) y sistemas GSH/GRX (Sevilla et al., 2015). Recientemente, se asignó una nueva función a las tiol peroxidasas en la regulación redox y se les nombró como TRX oxidasas. Este mecanismo

permite leer el equilibrio entre el aporte reductor de electrones y el drenaje oxidativo de electrones y ajusta el estado redox y de actividad de las proteínas blanco (Vaseghi et al., 2018)

2.2. Luz UV-B

La luz solar funciona como fuente de energía para las plantas, pero además es una señal que regula el crecimiento y el desarrollo de éstas. Las plantas vasculares interpretan la luz solar en forma de señales para regular una amplia gama de procesos vinculados al desarrollo y adaptación que incluyen la germinación, la des-etiolación, la evitación de la sombra, el desarrollo estomático, el ritmo circadiano y la floración. Por otro lado, el espectro de la luz energéticamente más alta, en particular la radiación UV, puede llegar a inducir respuestas de estrés en las plantas (Müller-Xing et al., 2014)

La respuesta al estrés, por efecto de radiación UV, varía dependiendo de varios factores como la tasa de fluencia, el tiempo de exposición y si las plantas han sido aclimatadas por la exposición previa a la luz. La presencia de luz UV-B (280-315 nm), en plantas, activa vías de señalización relacionadas con respuestas a estrés. La magnitud del daño celular y de la supervivencia de la planta depende de la relación entre compuestos oxidantes y anti-oxidantes. Altas dosis de luz UV son potencialmente citotóxicas debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y pueden causar daño a componentes celulares directamente (Mátai et al., 2018).

Por otra parte, las respuestas de las plantas expuestas a dosis bajas de UV-B son de aclimatación, y se componen de cambios, mediados por fotorreceptores, en la morfología y en la producción de metabolitos. Los ajustes fisiológicos en plantas cultivadas bajo UV-B incluyen un aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes y aumento en la cantidad de antioxidantes no enzimáticos (Czégény et al., 2016).

Las anteriores son también las características de las respuestas de aclimatación a otros factores de estrés, lo cual sugiere que la luz UV-B tiene potencial para mejorar la supervivencia de las plantas en condiciones de estrés biótico o abiótico (Mátai et al., 2018). Por ejemplo, moderadas dosis de UV-B incrementaron la tolerancia a frío en pepino (Teklemariam & Blake, 2003). Mientras que Kóvacs et al. (2014) demostraron que el mismo tratamiento con UV-B puede tener un efecto positivo o negativo en hojas de trigo

dependiendo del tipo de estrés abiótico adicionado. La respuesta frente a tratamientos de Luz UV-B y sequía ha sido evaluada en varios estudios. Algunos resultados han mostrado que la radiación UV-B puede mejorar la tolerancia a estrés por sequía a través de los efectos fotomorfogénicos inducidos, como la acumulación de flavonoides y fenoles foliares (Gitz y Liu-Gitz, 2003), el aumento del contenido de ácido salicílico en las hojas (Bandurska & Cieślak, 2013; Kovács et al., 2014) o a través de la disminución de la conductancia estomática y el aumento de la síntesis de prolina (Poulson et al., 2006). Se encontró también que tanto la radiación UV-B, como la sequía, de forma individual, estimulan la actividad de las enzimas antioxidantes, por lo tanto, resulta aceptable suponer que se de una superposición o empalme en las vías de señalización (Mátai et al., 2018).

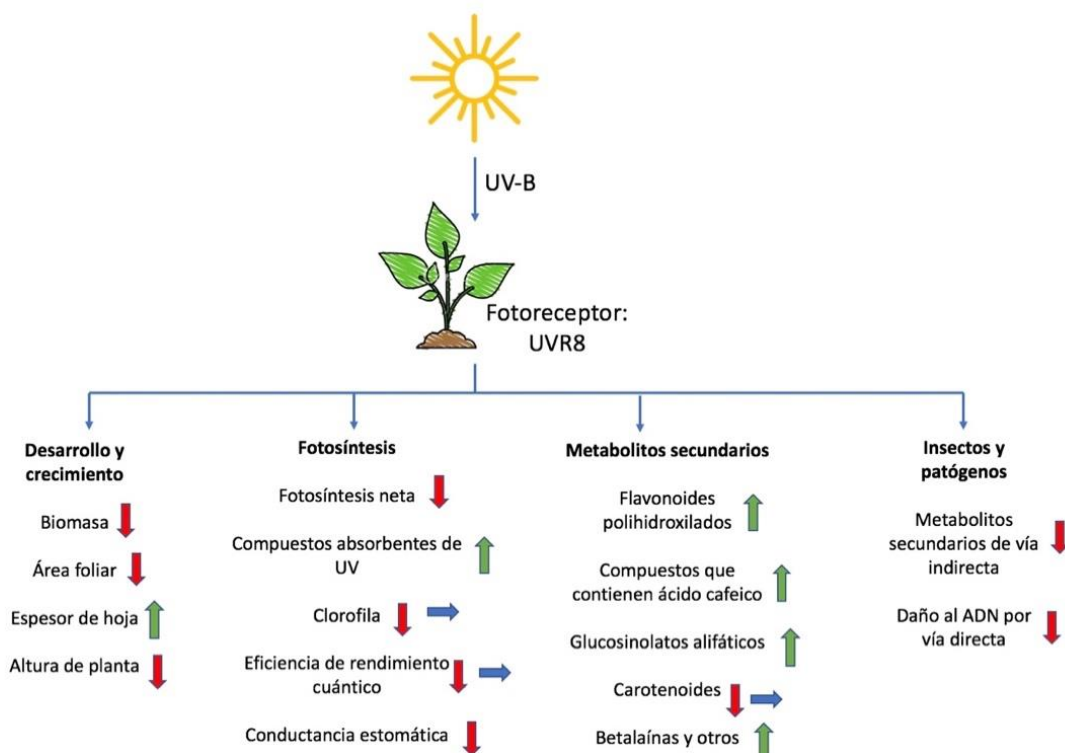


Figura 1. Resumen de los efectos de la luz UV-B en el crecimiento, la fotosíntesis, los metabolitos secundarios y la interacción planta-insecto.

2.3. Sequía

El estrés por sequía afecta severamente el desarrollo de las plantas, el crecimiento y la fertilidad. La sequía desencadena pérdida de agua y una disminución en el potencial hídrico, lo que conduce a una reducción en la turgencia celular (Tezara, 2002). Estas modificaciones son medibles y se utilizan para caracterizar la gravedad del estrés. La relación hídrica en plantas se puede determinar mediante el contenido relativo de agua, el potencial hídrico de la hoja, la tasa de transpiración, la conductancia estomática y la temperatura de la hoja (Farooq et al., 2009). Así mismo se pueden medir la conductancia mesofílica, la fotosíntesis neta, la abundancia de osmoprotectores, el contenido de ABA y la integridad de la membrana. La modificación del metabolismo inducida por el estrés por sequía, incluye la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), que afectan el estado regulador redox de las células (Laxa et al., 2019). Existen evidencias que asignan un papel importante al sistema antioxidante en la tolerancia a la sequía de las plantas. Entre los procesos más rápidos inducidos por la sequía se encuentra el cierre de estomas mediado por ácido abscísico (ABA) (Pirasteh-Anosheh et al., 2016). El estrés prolongado por la sequía y el aumento de la intensidad del estrés conducen a más reacciones de aclimatación. Estas respuestas incluyen ajuste osmótico (An et al., 2013; Blum, 2017), disminución de la relación raíz-brote (Silva et al., 2012), modificaciones de la pared celular (Lü et al., 2013), reprogramación del metabolismo (Zhang et al., 2014) y activación del sistema antioxidante (Ajithkumar & Panneerselvam, 2014; He et al., 2017).

Las plantas tolerantes a sequía están equipadas con niveles más altos de osmolitos y antioxidantes no proteicos, reprograman su metabolismo y mejoran su capacidad antioxidante. Por otra parte, las especies sensibles también activan su sistema antioxidante. Sin embargo, a pesar de esta aparente contradicción, la tolerancia a la sequía parece ser una función de la capacidad antioxidante obtenida en respuesta a la sequía. Además, la actividad antioxidante no solo es importante durante el estrés por sequía aguda, sino que también interfiere con la recuperación de la limitación de agua y la resurrección de la deshidratación (Laxa et al., 2019).

La primera respuesta de las plantas a la sequía es el cierre de los estomas para minimizar la pérdida de agua debido a la transpiración. Debido a que la fotosíntesis continúa bajo la luz, el aumento de la barrera de difusión de gases facilita el agotamiento de la concentración de

dióxido de carbono intercelular (CO₂). La baja disponibilidad de CO₂ estimula la oxigenación de la ribulosa-1,5-bisfosfato y, por lo tanto, la producción fotorrespiratoria de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en los peroxisomas (Noctor et al., 2002).

Durante el estrés por sequía, la regulación de los sistemas antioxidantes se produce tanto a nivel transcripcional, como a nivel post-transcripcional. Ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) son las enzimas principales en la desintoxicación de ROS en plantas bajo sequía. De estos tres, APX parece ser inducido más fuertemente en el nivel post-transcripcional. A diferencia de CAT y GPX, APX también está regulado a nivel transcripcional. Las actividades APX citosólicas, cloroplásticas y peroxisomales se incrementan comúnmente en todas las especies del reino vegetal. Se ha reportado que la actividad del APX citosólico aumenta durante la sequía en plantas de sequía (Mittler & Zilinskas, 1994). Se ha reportado que un mutante al gen *alx8* (expresión alterada de APX2) de *Arabidopsis* revela una tolerancia mejorada a la sequía (Wilson et al., 2009). CAT es una enzima tetramérica que cataliza la dismutación de H₂O₂ en H₂O y O₂ en el peroxisoma. Esta enzima juega un papel crucial cuando la planta está expuesta a un estrés por sequía severa (Sofa et al., 2015).

2.4. Flavonoides y estrés hídrico

Los flavonoides, considerados como compuestos fenólicos, son un grupo de metabolitos secundarios producidos por las plantas que resultan ser multifuncionales (Falcone et al., 2012). Por una parte protegen a las plantas contra estrés abiótico, patógenos y radiación UV (Treutter, 2006) y, por otra determinan el color de sus flores, frutos y semillas (Falcone et al., 2012). También son responsables de la simbiosis planta-bacteria (Treutter, 2006) y del control del crecimiento y desarrollo de éstas mediante la inhibición del transporte de auxinas (Peer et al., 2011). La biosíntesis de los flavonoides se lleva a cabo a través de la ruta del ácido siquímico, siendo sus precursores los ácidos cinámico y cumárico (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Los flavonoles son el tipo de flavonoides más comúnmente encontrados en las plantas, éstos se caracterizan por poseer en su estructura un grupo hidroxilo (OH⁻), incluyendo sus derivados funcionales (Shojaie et al., 2016).

Los flavonoles tienen un efecto protector en los sistemas biológicos debido a que sus grupos hidroxilo tienen la facilidad de ceder electrones y actuar como buenos agentes reductores,

causando la eliminación de radicales libres (Han et al., 2012; Shojaie et al., 2016). Los flavonoles más importantes y conocidos son el kaempferol y la quercetina, de los cuales se producen derivados glicosídicos (Khan et al., 2011). En *Arabidopsis thaliana* L., estos flavonoles muestran una mayor actividad antioxidante que otros flavonoides (Amic et al., 2003). La ingesta de flavonoides en la dieta humana se relaciona con efectos beneficiosos, pues se ha encontrado que actúan como anticancerígenos, antimicrobianos, antialérgicos y antiestrogénicos (Cutler et al., 2008). De lo anterior deriva la importancia de buscar incrementar la cantidad de flavonoides producidos en las plantas de cultivo.

Los flavonoides se acumulan en las plantas en respuesta al estrés hídrico, y actúan como un mecanismo de defensa ante el estrés oxidativo causado por éste. El estrés hídrico en plantas ocasiona un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), también conocidos como radicales libres (Kavas et al., 2013). Algunos estudios reportan la acumulación de flavonoides como potentes captadores de ROS en respuesta al estrés por sequía (Figura 2) (Nakabayashi et al., 2014; Treutter, 2006; Winkel-Shirley, 2002). Por ejemplo, bajo diferentes condiciones de sequía, se reportó un incremento de flavonoides totales y de tres flavonoles (epicatequina, galato de epicatequina y galato de epigallocatequina) en hojas de *Cistus clusii* (romerina o romero macho) (Hernández et al., 2004), un aumento en los niveles de kaempferol en brócoli (Khan et al., 2011) y un aumento en el contenido de flavonoides en diferentes órganos de *Leonorus cardiaca* L. (agripalma) (Wei et al., 2013). Además, se sugiere que la intensidad y duración del estrés (diferentes niveles de déficit hídrico) pueden desempeñar un papel clave en la determinación del tipo, cantidad y localización de flavonoides en las plantas (Shojaie et al., 2016). En un estudio por Shojaie y col. en 2016 en el cual se evaluaron los cambios inducidos en la cantidad, tipo y localización de flavonoides bajo diferentes condiciones de sequía en *Arabidopsis thaliana* L., solo se detectaron a los flavonoides quercetina y kempferol. Las cantidades máximas de estos flavonoles se detectaron bajo estrés severo de sequía y la cantidad de flavonoides totales fue mayor en las raíces que en los brotes de las plantas.

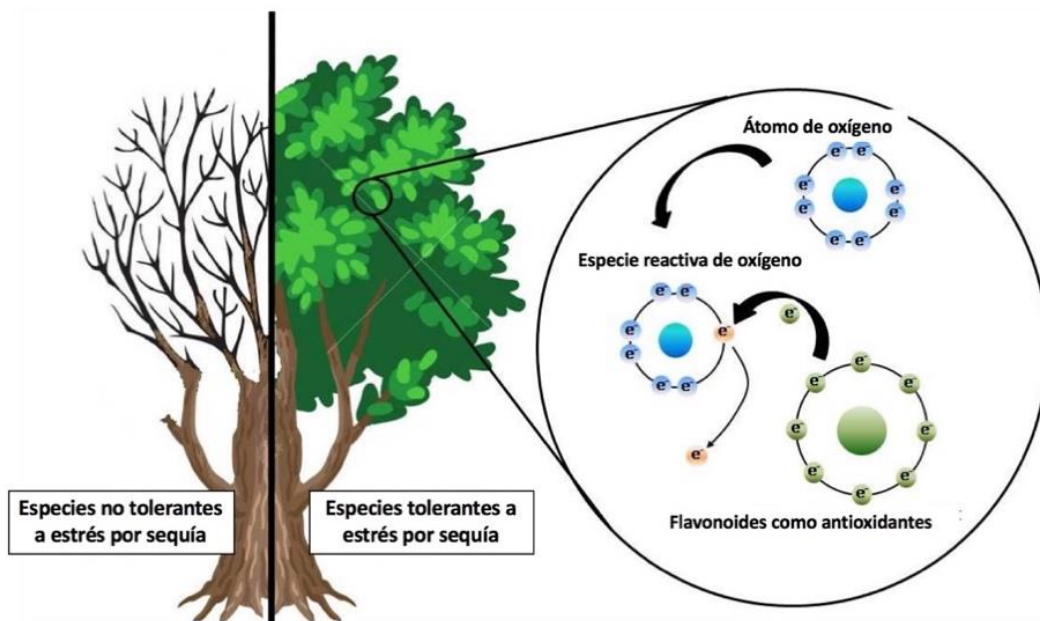


Figura 2. Grupos de investigadores reportan la acumulación de flavonoides como potentes antioxidantes en respuesta al estrés.

2.5. Flavonoides y luz UV

De la radiación solar total que llega a la superficie de la tierra, la radiación de la luz ultravioleta (UV) (290-400 nm) comprende una fracción relativamente pequeña. Sin embargo, se sabe que la radiación bajo este espectro, desempeña un papel importante en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas superiores (Jansen y Bornman, 2012). Las longitudes de onda más cortas y altamente energéticas de UV solar (UVB; 290-315 nm) pueden inducir una serie de efectos nocivos en las plantas, incluida la alteración de la integridad y función de macromoléculas importantes (ADN, proteínas y lípidos), daño oxidativo, cambios en la planta bioquímica, inhibición parcial de la fotosíntesis y reducción del crecimiento (Hideg et al., 2013). En consecuencia, la UVB se ha considerado tradicionalmente como factor estresante. Sin embargo, investigaciones recientes han resaltado las propiedades reguladoras de los niveles de UV-B bajos y ecológicamente relevantes que desencadenan cambios distintos en el metabolismo secundario de la planta que resulta en una acumulación de compuestos secundarios en las plantas (Mewis et al., 2012; Neugart et al., 2012; Schreiner et al., 2012). Las plantas tienen receptores UV particulares que perciben la radiación UV. El receptor UVR8 de *Arabidopsis thaliana* L. es específico

para la radiación UVB (280-315 nm) y conduce a una cascada de señalización a través de *UVR8*/*COP1*/*HYH5*/*HYH* (Lang-Mladek et al., 2012) controlando una gama de elementos clave para la aclimatación de UVB.

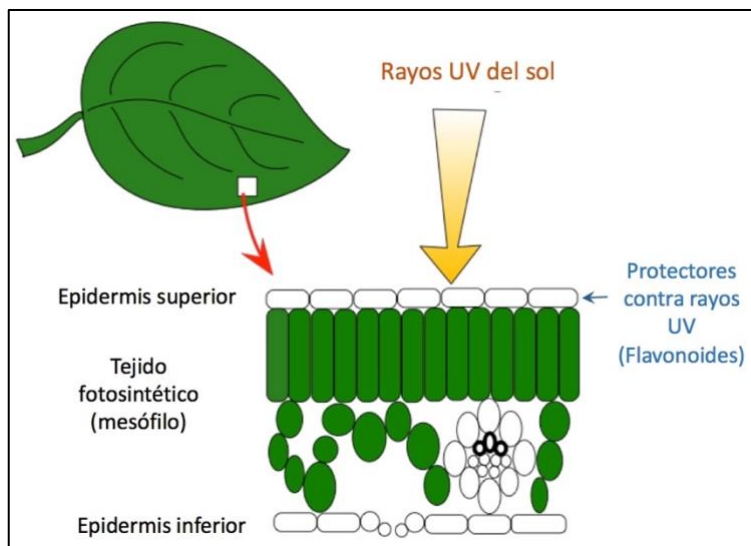


Figura 3. La acumulación de metabolitos secundarios que absorben las radiaciones UV en el tejido epidérmico es un mecanismo primario de aclimatación ante estrés por luz UV.

2.6. Tabaco como modelo de estudio

Nicotiana tabacum L. es miembro de la familia *Solanaceae*, que también incluye al tomate, papa, y chile entre otros cultivos de importancia agrícola. Fue originalmente usada como modelo debido a su importancia económica pero su utilización para el estudio biológico de las plantas comenzó cuando se convirtió en la primera planta genéticamente modificada en 1983 (Edwards et al., 2010). Dadas las posibilidades metodológicas actualmente disponibles, un modelo biológico ideal para el estudio de mecanismos moleculares en plantas requiere que sea fácil de modificar y regenerar genéticamente (eficiencia de transformación mayor a 80%), que se cuente con información en las bases de datos mundiales para llevar a cabo comparaciones, y que tenga una tasa de crecimiento rápido (entre 1 y 2 meses) (Goodin et al., 2008; Bombarely et al., 2012; Junping et al., 2014; Edwards et al., 2010). *Nicotiana Tabacum* L. es un organismo ideal para el estudio de algunas funciones

biológicas básicas, como la interacción planta-patógeno, la respuesta al ambiente, la regulación del crecimiento y la fase de senescencia (Veluthakkal & Dasgupta, 2015).

2.7. Proteínas tipo germina (GLPs) y defensa de la planta

Las proteínas germina y tipo germina (GLPs) están codificadas por una familia de genes existentes en todas las plantas. Pertenecen a la superfamilia de las cupinas, que agrupa diversas proteínas que comparten una estructura terciaria conservada, aunque con una limitada similitud en su secuencia primaria (Dunwell et al., 2008). La expresión de ciertas GLPs se ha asociado a una variedad de estados específicos del desarrollo de las plantas como la embriogénesis e inducción floral, pero particularmente ante diferentes tipos de estrés biótico y abiótico como exposición a altas concentraciones de sales, metales o altas temperaturas (Khuri et al., 2001; Schafleitner y Wilhelm., 2002; Park et al., 2004). La primera evidencia sobre la inducción de la expresión de GLPs debido a estrés abiótico se reportó en un estudio por estrés salino en raíces de cebada (Dunwell et al., 2000). Se ha reportado que diversas GLPs expresan actividad de la superóxido dismutasa (SOD) que convierte aniones superóxido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), una molécula implicada en la respuesta de defensa de las plantas (Davidson et al., 2009).

2.8. CchGLP

Previamente se reportó el perfil de expresión de genes de una colecta de plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* L. Jacq.), específicamente la colecta denominada BG-3821 del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (Gasca-González et al., 2008; Barrera-Pacheco et al., 2008). Esta colecta de chile habanero es proveniente de la Península de Yucatán, de donde fue recolectada en su forma silvestre para fines de un estudio que evaluó varias poblaciones de esta especie y se buscó identificar plantas que mostraran una adecuada resistencia viral, específicamente a infecciones por el virus PHYVV. Posteriormente se probó que plantas pertenecientes a la colecta BG-3821 además de mostrar rasgos de resistencia a infección simple, también se mostraron asintomáticas ante infección mixta de *PHYVV* y *PepGMV* (Godínez-Hernández et al., 2001; Anaya-López et al., 2003).

La expresión transcripcional, inducida bajo diferentes tipos de estrés biótico y abiótico, que se analizó en *Capsicum chinense* L. BG-3821, permitió identificar varios genes candidatos a estar involucrados en la respuesta de resistencia de estas plantas (Barrera-Pacheco et al., 2008). Dentro de éstos se reportaron el gen R-52 y el R-100 que presentaron similitud con genes que codifican para proteínas tipo germina. Debido a que se sabe que se puede inducir la expresión del sistema defensivo de las plantas mediante el uso de elicitores (moléculas inocuas a los vertebrados y el medio ambiente) (Mejía-Teniente et al., 2013), se hizo aplicación de ácido salicílico en las plantas evaluadas. Este elicitador abiótico resultó ser un fuerte inductor de la expresión de los genes reportados en interacciones incompatibles, confirmando su participación en la respuesta sistémica adquirida en la planta. En un estudio complementario se hizo evidente la inducción del gen correspondiente a la clona R-100 en plantas inoculadas con el PHYVV mientras en plantas control el nivel de expresión fue comparativamente inferior (Gasca-González et al. 2008).

Posteriormente la clona R-100, expresada diferencialmente, se catalogó como el gen *Capsicum chinense* L. *Germin Like Protein CchGLP*. Las características reportadas a partir de la secuenciación de esta proteína, junto con las reportadas por un análisis bioinformático de esta secuencia confirmaron su similitud con otras GLPs. Se probó que su secuencia consiste de 203 aminoácidos y que una sola copia de este gen está presente en el genoma de *Capsicum chinense* L. BG-3821. Del análisis bioinformático se identificó en la *CchGLP*, el dominio propio de las cupinas y 3 regiones altamente conservadas llamadas cajas germina A, B y C (Lu et al., 2010). Una de las cajas conteniendo tres residuos de histidina y un residuo de glutamato. Además, se identificó una señal secretora en los primeros 18 aminoácidos del extremo N-terminal, así como un sitio de N-glicosilación del residuo 44 al 47 (León-Galván et al., 2011).

Así mismo se analizó la actividad enzimática de la *CchGLP*, encontrando actividad de la manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD). La superóxido dismutasa es una enzima capaz de convertir al radical superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Bonilla et al., 2002), el cual activa o inactiva proteínas involucradas con transducción de señales para la expresión de genes relacionados con tolerancia a diversos tipos de estrés incluyendo estrés oxidativo, hídrico y derivado de patógenos (Apel y Hirt., 2004; Pitzschke et al., 2006).

El gen *CchGLP* mostró ser inducido durante interacciones incompatibles (con *PepGMV* y *PHYVV*) y al aplicar elicitores biológicos, deduciendo que la producción de peróxido de hidrógeno es resultado, ya sea de la ruta de señalización del ácido salicílico o por la del etileno (León-Galván et al., 2011).

2.9. Tabaco transgénico al gen *CchGLP*

Se confirmó el rol de *CchGLP* en el sistema de defensa de las plantas contra infección por geminivirus, a través de un estudio que evaluó la resistencia de planta de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cultivar Xanthi nc) expresando el *CchGLP* (Guevara-Olvera et al., 2012). La metodología empleada para la obtención de las plantas transgénicas de *Nicotiana Tabacum* L. se llevó a cabo por Ruíz-Nito en 2009 (Figura 4). El primer paso fue la construcción entre el promotor CaMV35S y la secuencia completa de *CchGLP* dentro del vector binario pBI121 (Figura 4.A). La construcción pBI121-*CchGLP* se introdujo por electroporación a *Agrobacterium tumefaciens* PGV2260 (Figura 4.B). La cepa obtenida se usó para inocular explantes foliares de tabaco (Figura 4.C) los cuales se transfirieron, después del co-cultivo, a un medio específico para la generación de brotes (Figura 4.D) y posterior a la selección de los explantes transformados, se pasaron a otro medio que permitió la generación de la planta completa (Figura 4.E). Se realizó transcripción reversa de plantas de tabaco transgénicas y control para comparar por densitometría óptica el nivel de transcrito correspondiente al transgén *CchGLP*.

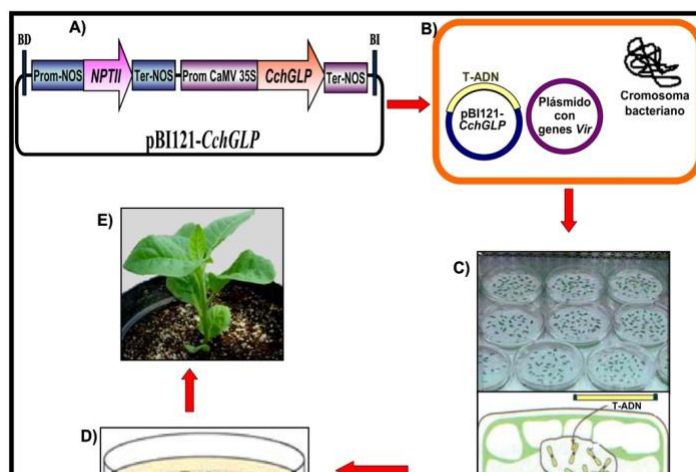


Figura 4. Metodología empleada para la obtención de las plantas transgénicas de *N. tabacum* L.

Se caracterizaron 6 líneas de tabaco transgénicas, las cuales mostraron un desarrollo y crecimiento idénticos a la planta sin transformar. Las líneas mostraron diferentes niveles de expresión, 4 de ellas (líneas 8,9,25 y 26) presentaron un nivel muy similar en transcrito. Sin embargo, se encontró que para una de las líneas (línea 1) aunque hubo amplificación que indicó la presencia del transcrito, el nivel de expresión del transgén fue nulo, una posible causa es que el *CchGLP* se integró en una zona del genoma que impidió su libre transcripción (Guevara-Olvera et al., 2012; Ruíz-Nito., 2009)

La planta de *Nicotiana tabacum* L. transgénica asegura producción endógena y uniforme de peróxido de hidrógeno comparada con la planta silvestre. Además, se indujeron algunos genes relacionados a la resistencia sistémica adquirida (SAR) específicamente los genes fenilalanina amonio liasa (PAL) y proteína relacionada con la patogénesis 1^a (PR-1a) (Guevara-Olvera et al., 2012). Este modelo de expresión es ideal para determinar los elementos diferenciales involucrados en las redes moleculares de defensa. Lo anterior con base en que se ha demostrado que presenta tolerancia ante infecciones por geminivirus (Guevara-Olvera et al., 2012), a infecciones por *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*, *Fusarium oxysporum* y estrés hídrico (G. Cardenas-Manríquez et al., 2016).

Tabla 1. Niveles relativos de CchGLP en las diferentes líneas transgénicas y el modelo silvestre

Líneas	Nivel relativo de transcrito
1	≈0
2	0.539
8	1
9	0.97
25	0.912
26	0.993
Tabaco silvestre	0

3. HIPÓTESIS

La interacción de los factores peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y luz ultravioleta (UV)-B genera cambios en el sistema antioxidante de *Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi nc que le confieren tolerancia a sequía significativamente mayor comparando con su control.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar los cambios en el sistema antioxidante de *Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi nc durante la interacción entre H₂O₂ y luz UV-B y su efecto de protección a sequía.

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar la respuesta morfológica de crecimiento y desarrollo de las plantas de tabaco (*N. tabacum* L. cv. Xanthi nc) por efecto de los tratamientos de luz UV-B, H₂O₂ y sequía.
2. Determinar cambios en el sistema antioxidante enzimático y no enzimático por efecto de los tratamientos en estas plantas.
3. Determinar los niveles de expresión de genes relacionados a la respuesta a luz UV-B en estas plantas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Los métodos, materiales y equipos para lograr cada objetivo establecido para confrontar la prueba de hipótesis de este proyecto se describen a continuación.

La metodología del objetivo 1 y los ensayos para evaluar capacidad antioxidante total y contenido de flavonoles del objetivo 2 se realizaron en el laboratorio de Bioquímica del departamento Life Science en la Universidad de Örebro, Suecia. Los ensayos restantes del objetivo 2 y la metodología del objetivo 3 fueron realizados en el laboratorio de Biotecnología en el campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro. Para transportar las muestras experimentales, éstas fueron liofilizadas en un liofilizador (Lyolab 3000) por 72 horas consecutivas.

5.1. Determinación de la respuesta morfológica de crecimiento y desarrollo de las plantas de tabaco por efecto de los tratamientos de luz UV-B, H₂O₂ y sequía.

Se utilizaron semillas del modelo silvestre *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi nc., así como del modelo transgénico de esta especie al gen *CchGLP*. Específicamente la línea 8, la cual es altamente expresiva, y la línea 1, que funcionó como un control transgénico (CT) o acigoto (alberga el gen, pero no lo expresa). La línea silvestre (wild-type) se utilizó como control silvestre (CS) para determinar los efectos causados por la transformación genética a través de la comparación con CT. La transformación genética y la propagación de las plantas *in vitro* se llevaron a cabo por Ruiz-Nito, (2009).

Durante todas las etapas del experimento (germinación, crecimiento y aplicación de tratamientos) las plantas se mantuvieron en un invernadero bajo un fotoperiodo de 16:8 (luz: oscuridad), la luz siendo aplicada de 6:00h a 22:00h utilizando lámparas de vapor de sodio. La radiación fotosintéticamente activa (PAR en inglés) recibida fue entre 120-240 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La temperatura promedio fue de $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

La germinación de las semillas se llevó a cabo de forma *in vitro* siguiendo el siguiente protocolo: las semillas fueron desinfectadas por sumersión en etanol al 70% por 2 minutos, seguido por sumersión en una solución de hipoclorito de sodio al 50% con Tween 20® al

0.1% por 7 minutos seguido de cinco lavados con agua destilada estéril en campana de flujo laminar. Posteriormente, fueron sembradas en placas Petri utilizando medio de cultivo MS y kanamicina para la selección de las semillas.

Diez días después de la aparición de la radícula (3 días después de la siembra), las plántulas fueron transplantadas a macetas individuales de 420 mL de capacidad utilizando como sustrato peat-moss con fertilizantes añadidos. Para compensar la pérdida gradual de nutrientes en el sustrato, se proporcionó nutrición suplementaria cada 15 días mediante el riego con solución nutritiva de Hoagland diluida al 50% (pH: 5.9; EC: 1.8 mS cm⁻¹). La solución de Hoagland se utiliza para el crecimiento saludable de plantas comerciales, presentando mejoras sobresalientes en comparación con otras formulaciones minerales (Hoagland, 1920). La concentración total de nutrientes en el sustrato y en la solución nutritiva se indican en la tabla 2.

Tabla 2. Concentración en PPM de nutrientes aplicados

NUTRIENTE	Peat moss fertilizado PPM	Solución de Hoagland al 50% PPM
Nitrógeno (N)	140	105
Fósforo (P)	70	15.5
Potasio (K)	149	117.5
Magnesio (Mg)	249	24
Azufre (S)	76	32
Calcio (Ca)	2186	100
Hierro (Fe)	0.9	.5 a 2.5
Manganeso (Mn)	1.6	.25
Cobre (Cu)	1.2	.01
Zinc (Zn)	0.4	.025
Boro (B)	0.3	.25
Molibdeno (Mo)	2.0	.005

Para favorecer la aclimatación de las plantas, las macetas fueron cubiertas con plástico transparente adherente, como forma de simular las condiciones in vitro en las que se

encontraban. El plástico se quitaba diario empezando por 30 minutos y agregando otros 30 minutos cada día. Este proceso duró 4 días.

Cuando las plantas cumplieron 3 semanas de edad inició la aplicación de los tratamientos de luz UV-B y H₂O₂ exógeno, que tuvo una duración de 14 días, lo que resultó en ocho grupos de tratamiento:

Tabla 3. Grupos de estudio

Líneas	Control	+ UV-B	+H ₂ O ₂ 0,2 mM	+UV-B+H ₂ O ₂
Control Silvestre (CS)	Grupo CS control	Grupo CS + UV-B	Grupo H ₂ O ₂	Grupo UV-B + H ₂ O ₂
Control Transgénico (CT)	Grupo CT control	Grupo CT + UV-B	-	-
Línea altamente expresiva de CchGLP (L8)	Grupo L8 control	Grupo L8 + UV-B	-	-

El número de plantas que se cultivaron bajo cada condición de tratamiento fue de 30. Las condiciones de tratamiento fueron las siguientes:

1. Para la aplicación del tratamiento de luz UV-B se utilizaron lámparas fluorescentes (Phillips TL40 / 12 UV, Eindhoven, Países Bajos) y las plantas fueron colocadas dentro de cajas de acrílico forradas con láminas de acetato de celulosa de 0,13 mm (Nordbergs Tekniska AB, Vallentuna, Suecia) para filtrar la longitud de onda de la luz UV-B y eliminar cualquier radiación UV-C. Las plantas control se colocaron dentro del mismo tipo de cajas con la diferencia de que tenían una capa extra de acrílico PERSPEX, que tiene la característica de bloquear los rayos UV. La exposición diaria fue de 4 horas (de 10:00 am a 2:00 pm). Esta dosis de UV-B se utilizó para simular condiciones en ambientes externos, debido a que es durante ese periodo del día que las plantas reciben mayor radiación UV-B en condiciones naturales (Aphalo et al., 2015). La radiación UV se midió utilizando un

espectrorradiómetro de doble monocromador OL756 de Optronic Laboratories (Orlando, FL). En total se aplicaron 122 mW m^2 de radiación total de UV-B ponderada por planta, normalizada a 300 nm (Kalbina et al., 2008; Thimijan et al., 1978; Yu and Björn, 1997). La exposición de 4 h dio una dosis total de $1,75 \text{ kJ m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ de UV-B ponderada por planta. Los niveles de UV-B se seleccionaron con base en respuestas fotomorfogénicas inducidas por UV-B en especies de plantas económicamente importantes (*Cucumis sativus*, Qian et al., 2019, 2020, 2021; *Capsicum annuum*, Rodríguez-Calzada et al., 2019); *Anethum graveolens*, Castro-Alves et al., 2021). Las plantas de los grupos control se expusieron a luz blanca en la misma cámara de crecimiento que las plantas UV-B.

2. Una solución de H_2O_2 0,2 mM (H_2O_2 30% Perhidrol para análisis EMSURE ISO) se aplicó foliarmente por aspersión (utilizando 2,5 ml por planta) y se aplicó al riego (utilizando 10 ml por planta). La aplicación de H_2O_2 se llevó a cabo por 14 días, cada tercer día al final del tratamiento UV-B (a las 14:00 h), dando un total de cinco aplicaciones. Todas las plantas se dispusieron aleatoriamente en las bandejas, pero las que recibieron el tratamiento con H_2O_2 se colocaron cada una en un vaso de plástico individual para evitar contaminar el agua de riego de las otras plantas en las bandejas. Para realizar la aspersión foliar, las plantas se llevaban a una cámara separada, con las mismas condiciones climáticas, y se devolvían a su lugar cuando no quedaban rastros de la solución en las hojas y el tejido. La concentración de H_2O_2 utilizada se determinó teniendo en cuenta los niveles reportados en una serie de estudios en los que se utilizó H_2O_2 como tratamiento para mejorar la tolerancia al estrés abiótico (Hossain et al., 2015). Se aplicó H_2O_2 a las raíces debido a un estudio preliminar que no mostró diferencias en el fenotipo o la resistencia al estrés en las plantas de tabaco después de la aplicación foliar solamente (datos no mostrados). Por lo tanto, se optó por aplicar también las raíces siguiendo la lógica de que el estrés por sequía está relacionado con este órgano de la planta.

El acomodo de las plantas en el invernadero se esquematiza en el siguiente cuadro:

	Caja tratamiento 2 10 plantas por grupo	Caja control 2 10 plantas por grupo	
Caja tratamiento 1 10 plantas por grupo	ENTRADA		Caja tratamiento 3 10 plantas por grupo
Caja control 1 10 plantas por grupo			Caja control 3 10 plantas por grupo

Figura 5. Acomodo de las plantas dentro de las cajas de acrílico en el invernadero

El día 15 del experimento (1 día después de la finalización de los tratamientos de UV-B y H₂O₂), se usaron 12 plantas por tratamiento para llevar a cabo un experimento de sequía de 7 días. Seis de ellas se sometieron a un tratamiento de sequía y seis se usaron como controles bien regados. Para lograr condiciones de sequía moderada, las plantas se regaron y se les permitió alcanzar la capacidad de campo (cuando se detuvo el drenaje). Así, el día 15 del experimento se pesó cada maceta y se estableció este valor en 100%. Después de 3 días de extracción de agua, la capacidad de macetas alcanzó el 40–45 %. El tratamiento de sequía se realizó pesando las macetas diariamente y regando, cuando fuere necesario, colocando las macetas en una bandeja con agua solo el tiempo necesario para que la capacidad de la maceta se mantuviera al 40-45% hasta el final del experimento.

En el transcurso de los 21 días del experimento, se rotaron diariamente las posiciones de las plantas en las bandejas que las contenían y las posiciones de las bandejas en las cajas de acrílico eran rotadas diariamente.

A continuación se describen las mediciones realizadas y su frecuencia para determinar la respuesta morfológica por efecto de los tratamientos aplicados.

Tabla 4. Descripción de las mediciones realizadas para determinar la respuesta morfológica por efecto de los tratamientos

Tratamiento	Frecuencia	Medidas realizadas
UV-B y/o H ₂ O ₂	Días 1, 7 y 14	<ul style="list-style-type: none"> • Altura del tallo (n=6) • Diámetro del tallo (n=6) • Número de hojas (n=6)
Estrés hídrico	Diario	Contenido relativo de agua del sustrato (n=4)
	Días 15, 19 y 21	Contenido relativo de agua en hoja (n=3)

La altura del tallo se realizó midiendo desde el borde de la maceta hasta el ápice del tallo, se evitó medir desde la superficie del sustrato ya que éste puede condensarse por efecto del riego. El diámetro del tallo se midió en la base, arriba de los cotiledones utilizando un Vernier (Mutitoyo, USA, +-0.001 cm).

Para determinar el contenido relativo de agua del suelo se pesaron las macetas por las mañanas (8:00 am) y por las tardes (6:00 pm) durante los 7 días del tratamiento de sequía. La diferencia entre los dos valores permitió determinar la pérdida de agua por día. El porcentaje del contenido relativo de agua en el suelo al final del experimento se calculó utilizando como referencia el peso de las macetas regadas a capacidad de campo (plantas control).

El contenido relativo de agua (RWC, en inglés) en hoja se midió durante los días 1, 4 y 7 del tratamiento de sequía a las 10:00 am. Se tomó muestra de la segunda hoja completamente desarrollada desde el ápice y se obtuvieron 12 discos de hoja de 15 mm de diámetro. El peso de los discos de hoja se midió 1) inmediatamente después del muestreo (peso fresco, Fw) 2) Después de 4 horas de inmersión en agua desionizada a 4°C en oscuridad (peso de turgencia, Tw) 3) posterior a un proceso de secado a 80°C durante una noche (peso seco, Dw). El RWC se calculó como $RWC = (Fw - Dw)/(Tw - Dw)$ (Jones 2007).

5.2. Determinación de los cambios en el sistema antioxidante enzimático y no enzimático por efecto de los tratamientos

La siguiente tabla presenta un resumen de las pruebas físicas y bioquímicas para determinar la respuesta antioxidante por efecto de los tratamientos aplicados.

Tabla 5. Descripción de las pruebas realizadas para determinar la respuesta antioxidante por efecto de los tratamientos

Tratamiento	Frecuencia/muestreo	Medidas realizadas	n
UV-B y/o H₂O₂	Hora 0 y Hora 4 Días 2, 3, 5, 7, 9, 12 y 14	Contenido de flavonoides en hoja	6 (muestreo no destructivo)
	Día 14	Contenido de H ₂ O ₂ foliar, Capacidad antioxidante total y actividades enzimáticas POD, CAT, PAL y SOD	3 (muestreo foliar)
Estrés hídrico	Día 21	Contenido de flavonoides en hoja	6 (muestreo no destructivo)
		Capacidad antioxidante total y actividades enzimática POD, CAT, PAL y SOD	3 (muestreo foliar)

Para los análisis de capacidad antioxidante total, actividades enzimáticas y expresión diferencial de genes se muestrearon 3 plantas por grupo en las horas 0, 4 y 28 y a las 2:00 pm los días 7, 14 y 21. Se muestrearon las 3 hojas maduras más jóvenes. Las muestras fueron congeladas utilizando nitrógeno líquido inmediatamente después de ser cosechadas. Posteriormente se colocaron en un ultra congelador a -80°C.

5.2.1. *Contenido de flavonoides en hoja*

El contenido de flavonoides en hoja se midió con el sensor DUALEX (Force-A) a las 9:00 am y a las 2:00 pm el primer día del experimento y a las 2:00 pm los días 2, 3, 5, 7, 9, 12, 14 y 21. Se midió en la hoja madura más joven de 6 plantas por grupo.

5.2.2. Capacidad antioxidante total

La capacidad antioxidante total se determinó usando el kit comercialmente disponible denominado Total Antioxidant Capacity Assay kit (Sigma-MAK187). Éste permite determinar la concentración de antioxidantes enzimáticos y no-enzimáticos debido a que éstos reaccionan con el ion Cu^{2+} , reduciéndolo a Cu^+ . El ion Cu^+ quela con una sonda colorimétrica, dando un amplio pico de absorbancia a ~ 570 nm, que es proporcional a la capacidad antioxidante total. Se utiliza como estándar antioxidante el Trolox, el cual es un análogo soluble en agua de la vitamina E, por lo que los resultados se obtienen en equivalentes de Trolox.

Las muestras fueron homogenizadas en mortero con el uso de nitrógeno líquido hasta pulverizar. Se pesaron 100 mg de tejido molido de cada muestra en un tubo Eppendorf. Se trabajó siempre colocando los tubos en hielo. Se llevo a cabo la extracción de las muestras añadiendo 1 mL de una solución 1X de tampón fosfato salino (PBS) a 5°C. Se utilizó vortex por 1 minuto para agitar las muestras. Se llevó a cabo centrifugación por 20 minutos a 12000 rpm a 4°C.

Se recuperó el sobrenadante y se diluyó 1:30 utilizando PBS como solvente. Para determinar el valor de la dilución se llevó a cabo un ensayo de prueba con un gradiente de dilución (1:100, 1:50, 1:25, 1:10, 1:5, 1:2) para asegurarse de obtener valores dentro del rango de los estándares del kit.

Las muestras se analizaron siguiendo el protocolo del fabricante del kit: en una placa transparente de fondo plano de 96 pocillos, se añadieron 0, 4, 8, 12 16 y 20 μL de la solución 1mM del estándar trolox. Cada pocillo se aforó a 100 μL utilizando agua desionizada. Para las muestras, se agregaron 100 μL de cada una a los pocillos correspondientes. Posteriormente, se agregaron 100 μL de la solución de trabajo de Cu^{2+} a cada uno de los pocillos y se dejaron incubar las reacciones por 90 minutos a temperatura ambiente en obscuridad. Pasado este tiempo, se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro para microplaca. Los valores obtenidos de las absorbancias de las muestras fueron correlacionados con la curva estándar graficada utilizando los valores del Trolox (Figura 7). Los valores se normalizaron a unidades de peso fresco del tejido.

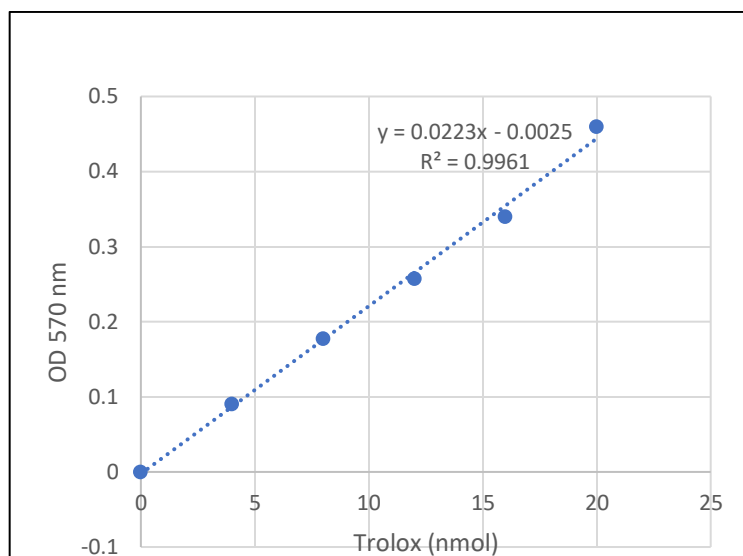


Figura 6. Curva de calibración del estándar antioxidante Trolox

5.2.3. Actividades enzimáticas

Las muestras de hojas liofilizadas (50 mg) se molieron con 2 ml de buffer de fosfato de potasio enfriado con hielo (0,05 M, pH 7,8) utilizando un mortero y pistilo. Las muestras se centrifugaron a 16 100 g durante 15 min a 4 °C. Los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta su posterior utilización para ensayos de actividades de CAT, PAL, SOD y POD. El contenido de proteína soluble total se determinó espectrofotométricamente (λ 595 nm) de acuerdo con el ensayo de Bradford estándar (Bradford 1976), utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

5.2.4. Fenilalanina amonio liasa (PAL)

La actividad de fenilalanina amonio-liasa (PAL; EC 4.3.1.5) fue determinada espectrofotométricamente a 290 nm a través de la formación de ácido trans-cinámico, de acuerdo al método descrito por Toscano et al. (2018). La curva de calibración se hizo usando un gradiente de concentraciones de ácido cinámico. La mezcla de reacción estuvo constituida de 100 μ L de extracto de planta en 1,5 mL de buffer de borato 0,1 M (pH 8,8) y 100 μ L de solución L-fenilalanina 10 mM. La mezcla fue incubada a 40°C por 1 h. Pasado este tiempo la reacción fue detenida por la adición de 25 μ L de HCl 1N. Una unidad de PAL libera 1 μ mol de ácido cinámico por minuto a pH 8,8 y 40 °C. La actividad enzimática se expresó como U/mg de proteína.

5.2.5. *Catalasa (CAT)*

La actividad de catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) se determinó mediante el método espectrofotométrico descrito por Afiyanti & Chen, (2014) monitoreando la oxidación de H₂O₂ durante 6 minutos a temperatura ambiente bajo una absorbancia de 240 nm. La mezcla de reacción consistió de 70 µL de extracto de muestra en 1,4 mL de buffer de fosfato de potasio 50 mM (pH 8,0) y 140 µL de H₂O₂ 100 mM. El blanco fue preparado de la misma manera, excepto que en lugar de extractor foliar, se adicionó bufer de fosfatos 50 mM (pH 8,0). La actividad específica de la enzima fue expresada como los µmoles de H₂O₂ oxidado por mg de proteína por minuto (µmol/mg proteína/min).

5.2.6. *Superóxido dismutasa (SOD)*

La actividad de superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) se determinó espectrofotométricamente (λ560nm) utilizando el método de Hayat et al. (2018). Se añadieron 50 µl del extracto de muestra a 2,95 ml de la mezcla de reacción. La mezcla contenía 1,5 ml de búfer de fosfato 0,05 M (pH 7,8), 0,3 ml de EDTA 0,1 mM, 0,3 ml de metionina 0,13 M, 0,3 ml de NBT 0,75 mM, 0,3 ml de riboflavina 0,02 mM y 0,25 ml de agua destilada. Una unidad de actividad de SOD se definió como la cantidad de enzima requerida para una inhibición del 50% de la reducción fotoquímica de nitroblue tetrazolium expresada como U/mg de proteína.

5.2.7. *Peroxidasa total (POD)*

La actividad de la peroxidasa total (POD, EC 1.11.1.7) se registró utilizando un kit comercialmente disponible (Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit, ThermoFisher Scientific, número de catálogo: A22188). Las muestras se diluyeron 1:5 para llevar los valores dentro del rango de los estándares del kit. Las muestras se trataron según el protocolo del fabricante, detectando la señal de fluorescencia en un lector de placas con emisión a 590 nm.

5.3. Determinación de los niveles de expresión de genes relacionados a la respuesta a la luz UV-B

Las muestras de hojas previamente obtenidas bajo los tratamientos aplicados y control se trituraron en nitrógeno líquido y se llevó a cabo la extracción y purificación de ARN usando

el protocolo de TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA). Posteriormente, se utilizó únicamente ARN de alta pureza (relación de absorbancia de 260/280 nm por encima de 2.0 y relación de absorbancia de 260/230 nm entre 1.8–2.0). Para sintetizar cDNA se utilizó el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis (ThermoFisher Scientific) específico para RT-qPCR de acuerdo con las instrucciones del proveedor (10 min a 25 °C seguido de 15 min a 50 °C). Se llevó a cabo la técnica de PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR) utilizando las siguientes condiciones de reacción: 2 segundos a 95°C y 40 ciclos de 3 segundos a 95°C, finalmente 30 segundos a 60°C. Se utilizarán los primers de los genes NAC13 (delantero 5'-CTC TGC CAT AGA CAC CAA CTT-3', inverso 5'-CCA AGT TCG GTC CTT TAA TAA-3'), Bes1 (delantero 5'-GCA GCA TTC CTC CTC CTA CT-3'; inverso 5'-ATT TCT TTG CCT TGT TGT TG-3'), y CHS (delantero 5'-TCG ACC CTC AGT CAA ACG AC-3'; inverso 5'-TGG GCC ACG GAA AGT AAC TG -3').

El gen BES1 se midió debido a que durante la exposición a UV-B, el fotoreceptor UVR8 interactúa físicamente con BES1 para inhibir su actividad de unión al ADN y el crecimiento o alargamiento promovido por los brasinoteroides (BR) (Wang et al., 2019). Es decir que la señalización endógena de BR y la señalización por luz UV-B actúan de forma antagónica para regular el crecimiento de las plantas. El gen NAC13 pertenece al grupo de genes de la familia NAC, que son regulados a nivel transcripcional por UV-B y éstos median una señal retrograda relacionada con ROS que se origina en el complejo mitocondrial III (Lyu et al., 2019). Se llevó a cabo análisis de expresión de chalcona sintasa, CHS, (número de acceso de GenBank FJ705842.1) debido a que es una enzima principal de la vía biosintética de los flavonoides.

El diseño experimental utilizado fue de bloques al azar. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa GraphPad prism 9.0 (GraphPad Software). Los datos se recogieron de dos experimentos independientes. Se usó ANOVA de una vía para analizar los datos obtenidos durante la primera parte del experimento cuando se aplicaron los tratamientos UV-B, H₂O₂ y UV-B+H₂O₂ (Día 14). Las variables incluidas fueron la longitud del tallo; diámetro basal; número de hojas; capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC); actividades enzimáticas (PAL, POD, SOD y CAT); y absorbancia UV epidérmica.

La absorbancia UV epidérmica y TEAC al final de la segunda parte del experimento (Día 21) se analizó utilizando ANOVA de dos vías utilizando el tratamiento de sequía y los tratamientos como factores. Las medias se compararon con la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar de seis plantas por tratamiento para las variables morfológicas e índice de flavonoles epidérmicos estimados con Dualex, y de tres plantas por tratamiento para el resto de las variables medidas.

6. RESULTADOS

6.1. Determinación de la respuesta morfológica de crecimiento y desarrollo por efecto de los tratamientos de luz UV-B, H₂O₂ y sequía

En el día 14 del experimento (al término del tratamiento de UV-B), el tratamiento de UV-B tuvo un efecto de reducción de la longitud del tallo en todos los grupos (Tabla 6). Las plantas control de ambos grupos, CS y CT, no mostraron diferencias en la reducción de la longitud del tallo por efecto del tratamiento UV-B. La longitud del tallo de las plantas transgénicas L8 fue significativamente menor en comparación con los controles. Los resultados sobre el número de hojas y el diámetro del tallo siguieron la misma tendencia. Si bien no hubo diferencias entre las plantas CS y CT tratadas con UV-B, las plantas transgénicas L8 mostraron una reducción significativa causada por el factor UV-B en comparación con ambos controles (Tabla 6, Figura 8). Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de estos datos se pueden consultar en la Tabla 9 del Apéndice.

Tabla 6. Efecto del tratamiento de UV-B en variables morfológicas

Tratamiento	Grupo	Altura del tallo (cm)	Número de hojas	Diámetro del tallo basal (mm)
Control	CS	14.68 ^a	14.67 ^a	5.29 ^a
	CT	13.07 ^b	14.17 ^a	5.15 ^a
	L8	12.98 ^b	14.56 ^a	4.87 ^a
UV-B	CS	10.28 ^c	14.67 ^a	4.99 ^a
	CT	9.817 ^c	14.83 ^a	4.62 ^a
	L8	8.2 ^d	12.13 ^b	4.04 ^b

CS, control silvestre; CT, control transgénico; L8, la línea transgénica con alta expresión de CchGLP de plantas de *Nicotiana tabacum* Xanthi nc.

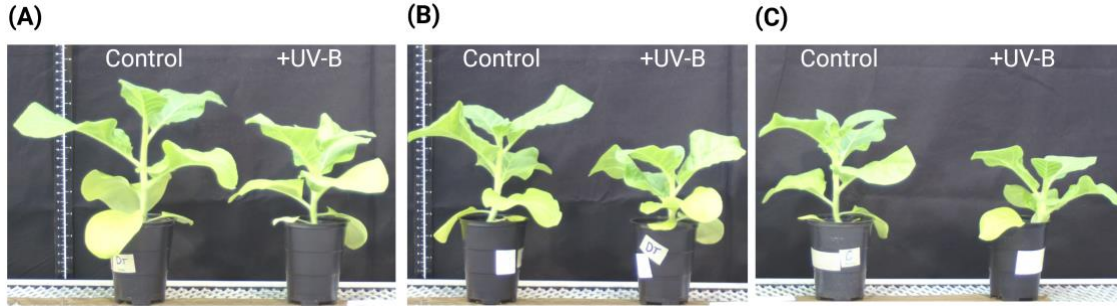


Figura 7. Imágenes representativas de *Nicotiana tabacum* cv *Xanthi nc* correspondientes a los tratamientos (A) Control silvestre ; (B) Control transgénico; (C) Línea transgénica con expresión alta de CchGLP, después de 14 días de exposición a luz Ultravioleta (UV)-B.

Respecto al tratamiento de elicitación de H₂O₂ exógeno, el tratamiento individual de elicitación con H₂O₂, tuvo un efecto de reducción de la longitud del tallo y el tratamiento combinado UV-B+H₂O₂ condujo a una reducción de esta variable mayor que la producida por efecto del tratamiento de forma individual. El diámetro del tallo basal y el número de hojas disminuyeron por efecto del tratamiento combinado UV-B+H₂O₂ en comparación con sus respectivos controles (Figura 8). Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de estos datos se pueden consultar en la Tabla 10 del Apéndice.

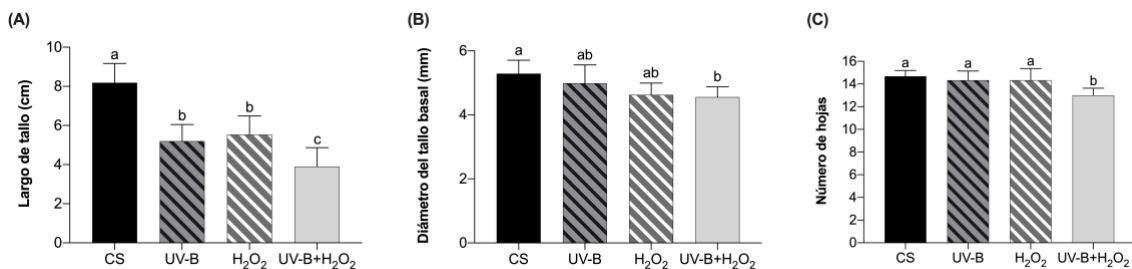


Figura 8. Efecto del tratamiento de UV-B y H₂O₂ exógeno en variables morfológicas

El día 17 del experimento (día 3 del tratamiento de sequía) las plantas L8 tratadas con UV-B mostraron síntomas ligeramente visibles de marchitez en las hojas maduras. Los síntomas se agravaron el día 19 del experimento (día 5 del tratamiento de sequía) presentándose, además, clorosis en hojas maduras (Figura 9). Los síntomas progresaron hasta el final del experimento (Día 21) con retraso en el crecimiento, clorosis en hojas viejas y marchitez en hojas jóvenes. En el día 6 del tratamiento de sequía, las plantas control CS y CT (sin tratamiento UV-B) mostraron síntomas de marchitamiento. El tratamiento UV-B en estas plantas retrasó la

presencia de marchitamiento un día (día 7 del experimento). El día 7, las plantas control (-UV-B) de la Línea 8 comenzaron a mostrar síntomas leves de marchitamiento en las hojas maduras.

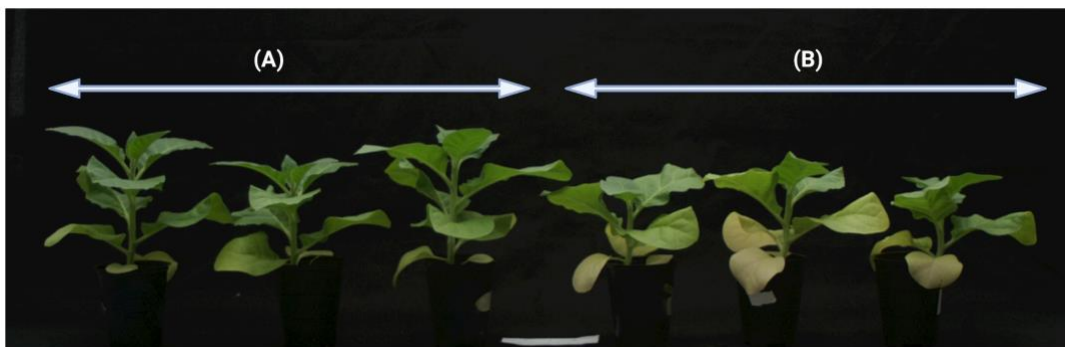


Figura 9. Imágenes representativas de plantas de la línea transgénica 8 con expresión alta de CchGLP (L8) después de 5 días de exposición al tratamiento de sequía (Día 19 del experimento). (A) Grupo control (-UV-B); (B) Grupo experimental (+UV-B).

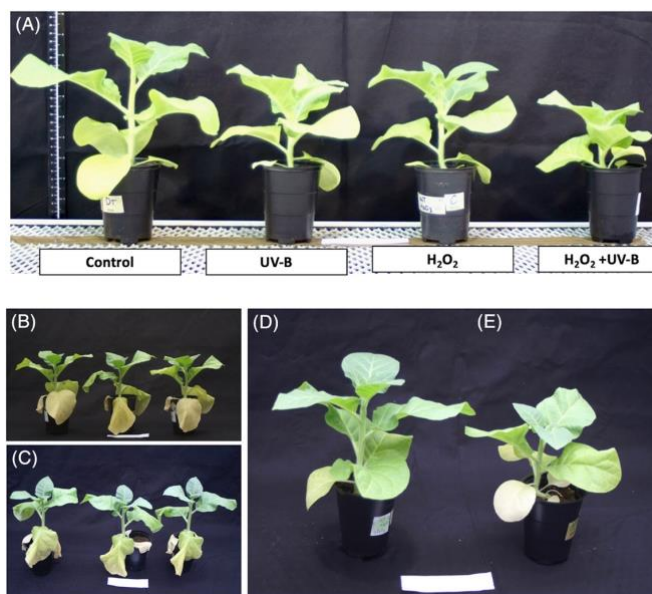


Figura 10. Imágenes representativas de plantas expuestas a (A) 14 días de tratamientos y marchitamiento de plantas expuestas a 7 días de tratamiento de sequía (B) sin tratamiento, (C) UV-B, (D) H₂O₂ y (E) UV-B + H₂O₂.

Respecto al tratamiento de H₂O₂ exógeno, las plantas tratadas con H₂O₂ de forma individual y las tratadas con la combinación UV-B + H₂O₂ no mostraron ningún síntoma o signos visibles de estrés durante los 7 días del tratamiento de sequía (Figura 10).

Al final del tratamiento de de sequía, al comparar los valores del contenido relativo de agua foliar de las plantas no tratadas contra el de las plantas que si fueron tratadas el grupo que mostró la mayor disminución fueron las plantas L8 tratadas con UV-B en un 33 %, seguidas por las plantas CS tratadas con UV-B en un 26 %, las plantas CS control (-UV-B) y las plantas CT tratadas con UV-B en un 22 %, las plantas CT control (-UV-B) en un 21 % y por último las plantas L8 control (-UV-B) en un 14 % (Tabla 7). Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de estos datos se pueden consultar en la Tabla 11 del Apéndice.

Tabla 7. Contenido relativo de agua foliar al final del tratamiento de sequía (día 21) en plantas del modelo *N. tabacum* transgénico L8 y sus respectivos controles

Tratamiento		Contenido relativo de agua foliar (%)	
		Control	Sequía
CS	Control	95.2 ± 1.33 ^a	74.3 ± 1.86 ^b
	UV-B	96 ± 0.63 ^a	71.5 ± 1.76 ^b
CT	Control	93.8 ± 2.33 ^a	74 ± 2.24 ^b
	UV-B	93.7 ± 2.59 ^a	73.2 ± 0.55 ^b
L8	Control	94.5±1.13 ^a	81.2±0.26 ^c
	UV-B	95.1 ± 0.54 ^a	63.4±2.81 ^d

Los valores corresponden al promedio de 3 replicas ± la desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos utilizando el test de comparaciones múltiples de Tukey ($P \leq 0.05$).

Respecto al tratamiento de elicitación exógena de H₂O₂, en el día 7 del tratamiento de sequía las plantas tratadas solo con H₂O₂, mostraron una disminución del contenido relativo de agua foliar en un 6,8 % (de 93,3 % en plantas no tratadas con sequía a 87,0 % en plantas tratadas con sequía); mientras que el tratamiento combinado UV-B + H₂O₂ condujo a una disminución en un 7,8% (del 93,3 % en plantas no tratadas con sequía a 86,2 % en plantas tratadas con sequía) (Tabla 8). Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de estos datos se pueden consultar en la Tabla 12 del Apéndice.

Tabla 8. Contenido relativo de agua foliar al final del tratamiento de sequía (día 21) en plantas de *N. tabacum silvestre* previamente elicidadas con 0.2mM H₂O₂ y su respectivo control

Tratamiento	Contenido relativo de agua foliar (%)	
	Control	Sequía
CS	95.17 ± 1.33 ^a	74.33 ± 1.86 ^b
UV-B	96 ± 0.63 ^a	71.50 ± 1.76 ^b
H ₂ O ₂	93.33 ± 2.73 ^a	87 ± 1.26 ^c
UV-B + H ₂ O ₂	93.50 ± 2.59 ^a	86.17 ± 0.75 ^c

6.2. Determinación de los cambios en el sistema antioxidante enzimático y no enzimático por efecto de los tratamientos

El día 14, el tratamiento UV-B provocó un aumento de la capacidad antioxidante (TEAC) en todos los grupos. Este incremento fue mayor en las plantas transgénicas L8, tanto en el grupo control como el grupo tratado con UV-B, en comparación con las plantas CS y CT (Figura 11a). El tratamiento de UV-B también aumentó el contenido de H₂O₂ de las hojas en todos los grupos. El aumento fue mayor en las plantas L8 en un 400% en comparación con CS y CT (Figura 11B). La actividad de la enzima PAL aumentó con el tratamiento UV-B en los tres grupos de plantas, sin diferencias significativas entre ellas (Figura 11C). Los niveles de actividad de SOD no se vieron afectados por el tratamiento UV-B en ninguna de las líneas. Sin embargo, los niveles de SOD fueron más altos en las plantas transgénicas L8 en los grupos control y tratados con UV-B, comparando con ambos controles CS y CT (Figura 11D). El tratamiento de UV-B en las plantas CS aumentó de manera significativa la actividad de CAT. Por el contrario, los niveles de esta enzima en las líneas transgénicas CT y L8 no se vieron afectados por UV-B (Figura 11E). Los niveles de actividad de POD aumentaron significativamente debido al efecto UV-B solo en plantas transgénicas L8. Las plantas L8 del grupo control (no expuestas al tratamiento UV-B) también mostraron una mayor actividad de esta enzima comparando con CS y CT (Figura 11F). El contenido de flavonoles

epidérmico adaxial foliar aumentó por efecto de la luz UV-B en los tres grupos de plantas sin presentar diferencias entre ellos (Figura 11G). Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de estos datos se pueden consultar en la Tabla 12 del Apéndice.

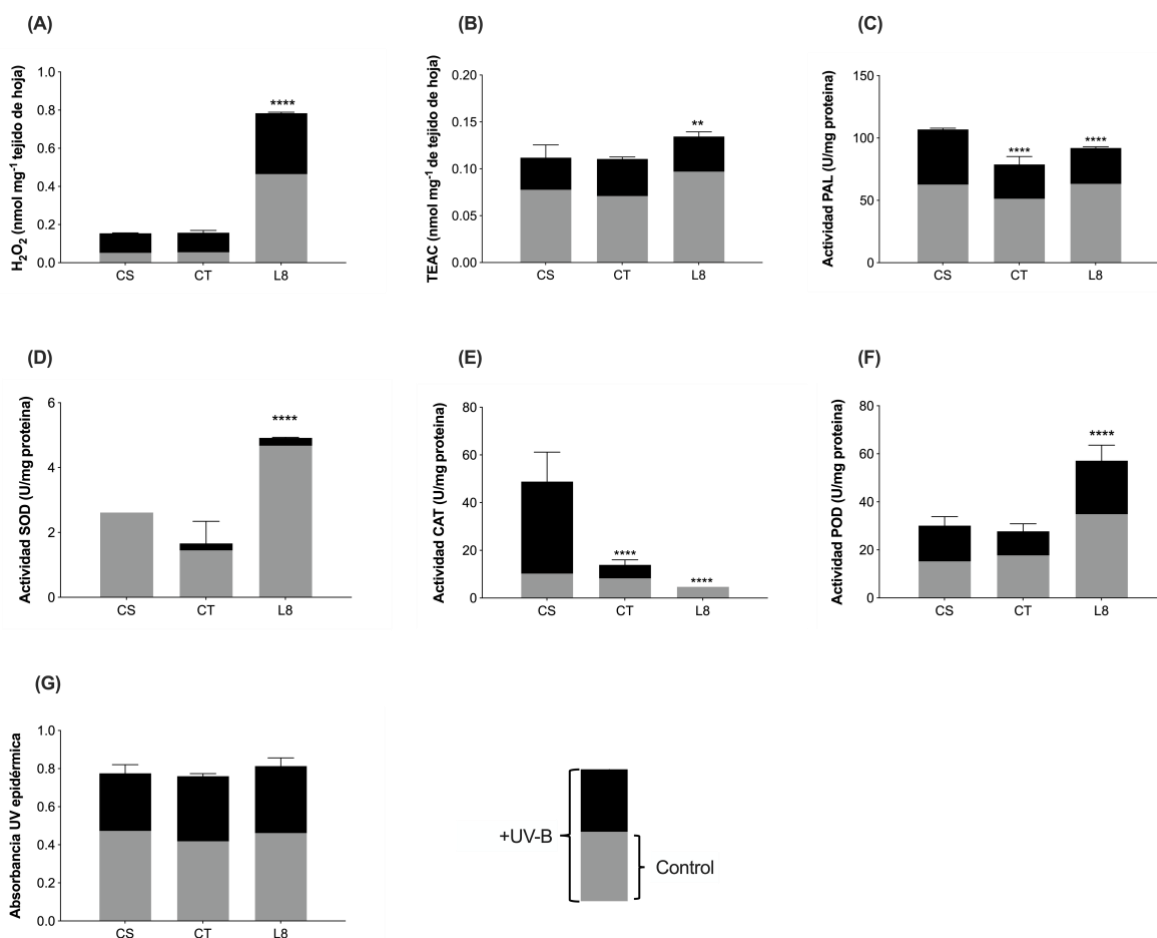


Figura 11. Cambios por efecto de UV-B en hojas de *N. tabacum* de los grupos control silvestre (CS), control transgénico (CT) y línea transgénica que expresa altamente *CchGLP* (L8). La parte gris de las barras corresponde a la media de los valores obtenidos en plantas mantenidas bajo el tratamiento de UV-B. Las barras sin presencia de una parte negra significan que el tratamiento UV-B no presentó un aumento en comparación con las condiciones de control. Las barras de error se presentan solo para las barras completas. Los asteriscos marcan las diferencias significativas cuando CT-UV-B o L8-UV-B eran diferentes de las CS-UV-B.

Al término del tratamiento de sequía (día 21 del experimento), la capacidad antioxidante total aumentó en todos los grupos tratados con UV-B y sometidos al tratamiento de sequía. Este aumento no mostró diferencias significativas entre los grupos (Figura 12A). El tratamiento de sequía aumentó la actividad de PAL en todos los grupos tratados con UV-B. Este aumento fue significativo en las plantas CS, seguido de CT y L8, respectivamente (Figura 12B). La

sequía aumentó la actividad de SOD en todos los grupos tratados con UV-B. El incremento en la actividad de SOD fue significativamente mayor en los grupos L8 (tratados y no tratados con UV-B) (Figura 12C). El tratamiento de sequía aumentó la actividad de CAT en todos los grupos tratados con UV-B; los incrementos fueron significativamente mayores en CS y CT. Las plantas L8 tratadas con UV-B mostraron una actividad CAT más baja que las plantas L8 del grupo control (-UV-B) (Figura 12D). El tratamiento de sequía ocasionó un aumento significativo de la actividad de POD en las plantas CS del grupo control (-UV-B). El tratamiento de sequía no aumentó significativamente en las plantas CS tratadas con UV-B. Las plantas CT no mostraron un aumento significativo en la actividad POD en el grupo de control en ninguno de los grupos. La actividad de POD en las plantas L8 del grupo control (-UV-B) no aumentó significativamente. A diferencia de las plantas L8 tratadas con UV-B, en las cuales si hubo un efecto de aumento de esta enzima por efecto del tratamiento de sequía (Figura 12E). El contenido de flavonoides foliares en todos los grupos tratados con UV-B aumentó significativamente cuando se sometieron a sequía. Este aumento no mostró diferencias significativas entre los grupos en las variables citadas (Figura 12F). Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de estos datos se pueden consultar en la Tabla 13 del Apéndice.

Respecto al tratamiento de elicitación exógena de H₂O₂ al término del experimento (día 21), la actividad de PAL aumentó en las plantas tratadas con la combinación UV-B + H₂O₂ y por efecto de la aplicación individual de H₂O₂ (Figura 13A). La sequía no alteró la actividad de CAT en las plantas tratadas con H₂O₂, pero si lo hizo en el tratamiento combinado de UV-B+ H₂O₂ (Figura 13B). De manera similar, el tratamiento de sequía no alteró la actividad de POD en las plantas tratadas con H₂O₂. Sin embargo, las plantas expuestas al tratamiento combinado UV-B+ H₂O₂ mostraron un aumento de aproximadamente cuatro veces en la actividad de POD por efecto del tratamiento de sequía (Figura 13C). Finalmente, la actividad de SOD de las plantas no expuestas a la sequía fue baja, independientemente del tratamiento que se haya dado a las plantas. La sequía condujo a un aumento de la actividad de SOD en las plantas tanto en el tratamiento individual e H₂O₂ como en el combinado UV-B+ H₂O₂ (Figura 13D). Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de estos datos se pueden consultar en la Tabla 14 del Apéndice.

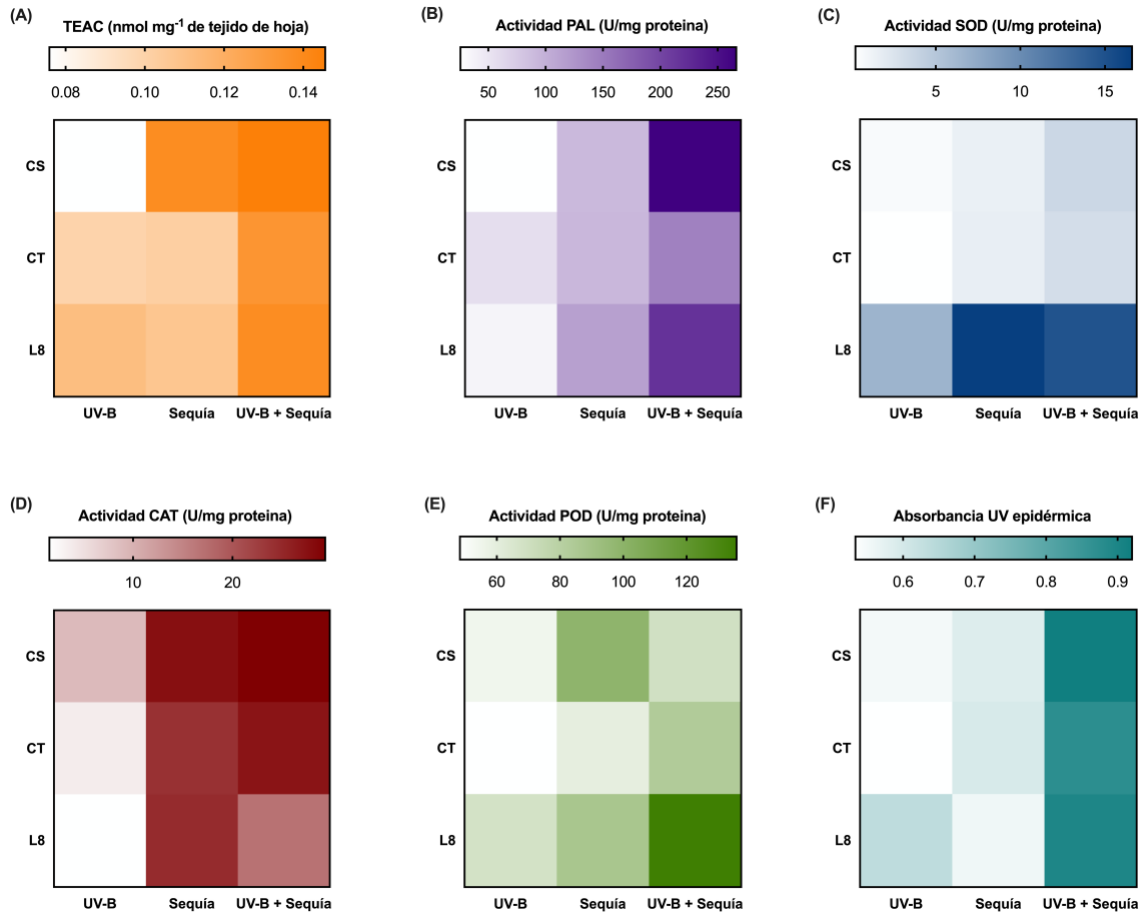


Figura 12. Mapas de calor mostrando los cambios por efecto de 7 días de sequía moderada en hojas de *N. tabacum* de los grupos control silvestre (CS), control transgénico (CT) y línea transgénica que expresa altamente *CchGLP* (L8). Los paneles UV-B corresponden a datos obtenidos del grupo control (sin sequía) tratadas con UV-B; Los paneles de sequía corresponden a los datos obtenidos del grupo experimental (tratado con sequía) de plantas no tratadas con UV-B; Los paneles UV-B+Sequía corresponden a datos obtenidos del grupo experimental (tratado con sequía) de plantas tratadas con UV-B.

Las plantas tratadas con la combinación de UV-B+H₂O₂ presentaron un índice de flavonoles epidérmicos en hoja significativamente más alto en condiciones sin sequía (Figura 14). El tratamiento de sequía incrementó aún más el contenido de flavonoles en estas plantas que presentaron los niveles más altos, seguidas por las plantas tratadas con UV-B y, finalmente, las plantas sin tratamiento. El tratamiento de sequía no aumentó el contenido de flavonoles epidérmicos de las hojas en plantas tratadas con H₂O₂. Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de estos datos se pueden consultar en la Tabla 15 del Apéndice.

TEAC fue similar en los grupos tratados con H₂O₂ y UV-B+H₂O₂ en condiciones sin sequía (Figura 15). El día 21, las plantas tratadas con H₂O₂ y UV-B + H₂O₂ no mostraron ningún incremento entre las condiciones de sequía y no sequía (Figura 15). Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de estos datos se pueden consultar en la Tabla 16 del Apéndice.

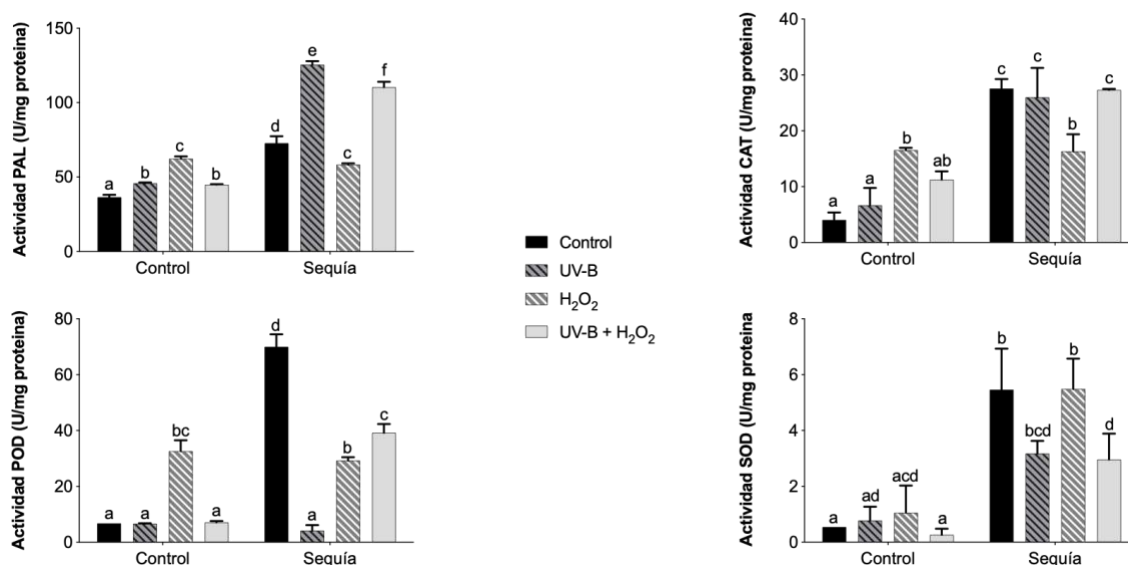


Figura 13. Actividades enzimáticas en hoja de *N. tabacum* al término del tratamiento de sequía (A) Fenilalanina Amonio Liasa (PAL); (B) catalasa (CAT); (C) Peroxidasa Total (POD); y (D) superoxido dismutasa (SOD).

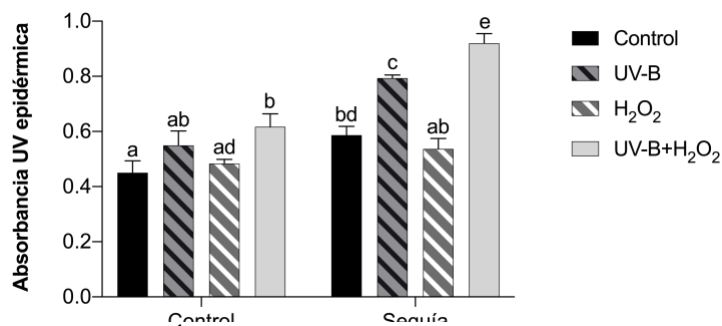


Figura 14. Índice de flavonoles epidérmicos de la parte adaxial de las hojas estimado con Dualex el día 21 del experimento en plantas *Nicotiana tabacum* L. cultivadas bajo tratamiento con UV-B, H₂O₂ o UV-B + H₂O₂, o en ausencia de tratamiento.

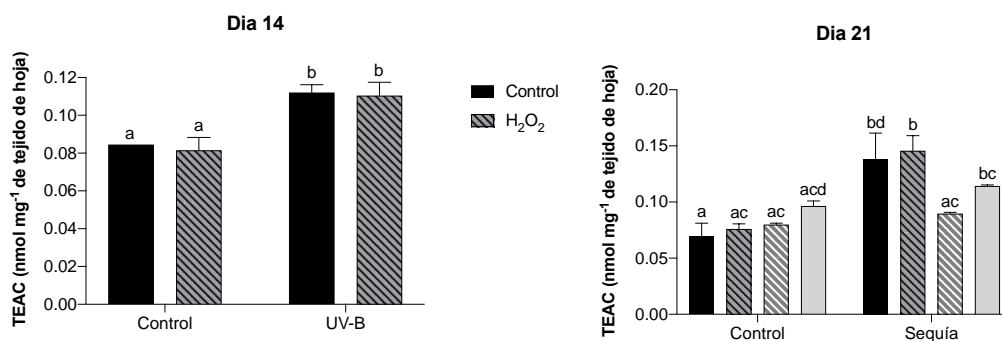


Figura 15. Capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) de los tratamientos UV-B-, H₂O₂- y UV-B + H₂O₂ en las respuestas de *Nicotiana tabacum* L. a a) 14 días de aplicación de los tratamientos y b) a 7 días de tratamiento de sequía (Día 21 del experimento).

6.3. Determinación de los niveles de expresión de genes relacionados a sequía y UV-B

El aumento en la acumulación de transcritos de NAC13 el día 14 se desencadenó en mayor medida en los grupos que fueron tratados con UV-B. El grupo que mostró el menor aumento de transcritos este día fueron las plantas L8 control (-UV-B). El día 21, las plantas que mostraron mayor aumento en la acumulación de transcritos de NAC13 por efecto del tratamiento de sequía fueron las del grupo L8 que habían recibido el tratamiento de UV-B (Figura 16A). Los niveles de transcripción de BES1 aumentaron el día 14 en los grupos que recibieron el tratamiento de UV-B comparando con sus controles que no lo recibieron. El día 21, es decir, después de 7 días de sequía, los niveles de BES1 fueron más altos en plantas tratadas con UV-B y expuestas a la sequía que las plantas de control no tratadas (Figura 16B). El tratamiento que mostró mayor acumulación de transcritos el día 21 en condiciones de sequía fueron las plantas L8 tratadas con UV-B (Figura 16B). El día 14, las plantas de tabaco mostraron un aumento en los niveles de transcrito de CHS por efecto del tratamiento de UV-B en todos los grupos evaluados. El día 21, por efecto del tratamiento de sequía los niveles de CHS disminuyeron comparando con los niveles del día 14. Todos los grupos mostraron niveles similares de acumulación del transcrito. En los grupos que no recibieron el tratamiento de sequía, los niveles del transcrito fueron mayores para los grupos que habían recibido el tratamiento de UV-B comparando con aquellos que no lo recibieron (Figura 16C). Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de estos datos se pueden consultar en la Tabla 17 del Apéndice.

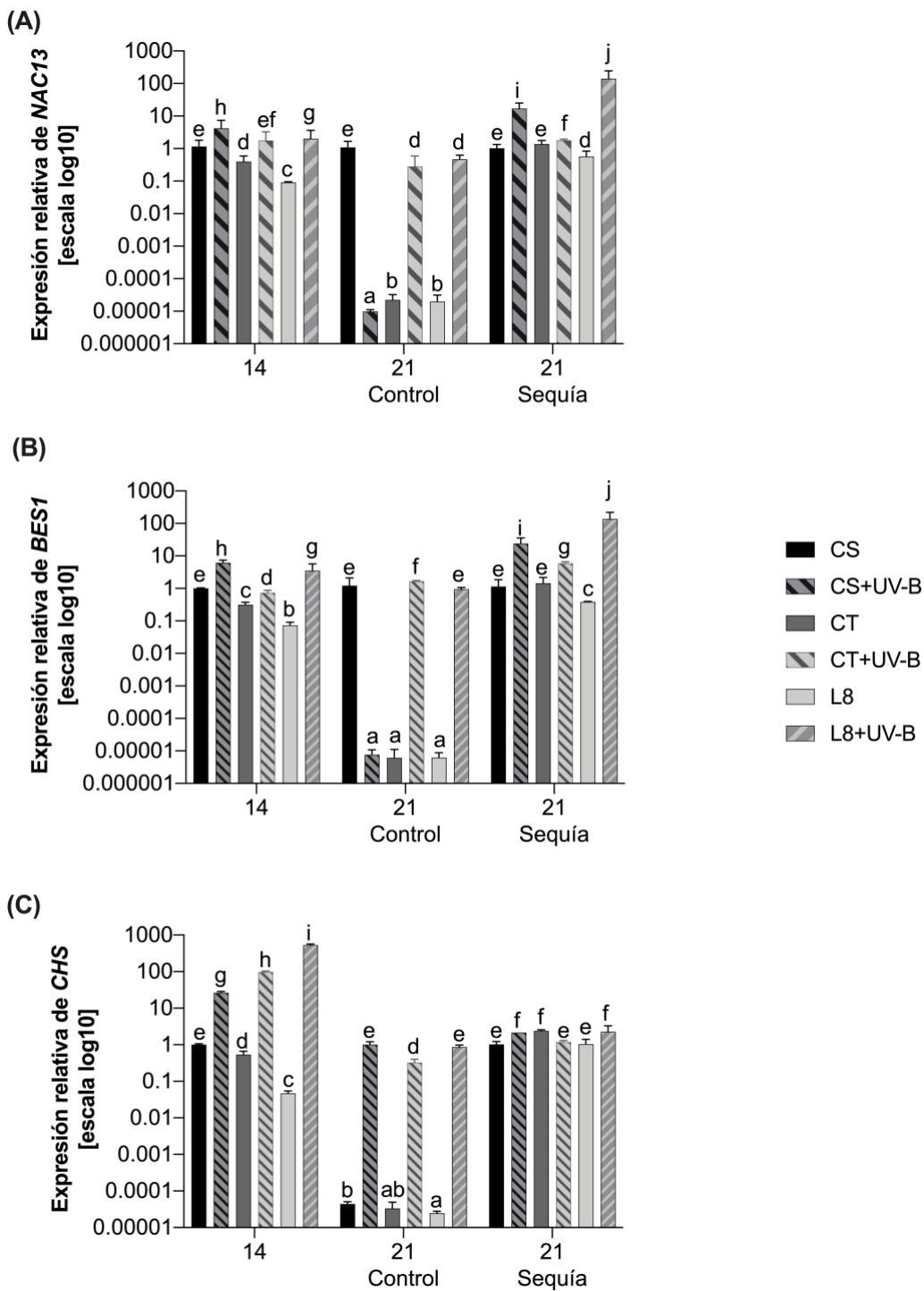


Figura 16. Acumulación de transcritos de los genes (A) DOMINIO NAC QUE CONTIENE LA PROTEÍNA 13 (NAC13); (B) BRI1-EMS-SUPRESOR 1 (BES1); y (C) CHALCONA SINTETASA (CHS) los días 0, 14 y 21 después del comienzo del experimento.

7. DISCUSIÓN

La inducción de tolerancia cruzada contra estrés mediante la aplicación de factores físicos y químicos se acompaña de cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares, que es importante investigar ya que su interacción puede determinar la respuesta deseada. El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la interacción entre un modelo transgénico de *Nicotiana tabacum* que presenta sobreproducción endógena de H₂O₂, y un tratamiento de UV-B correspondiente a una dosis biológicamente efectiva de 1,75 kJ m⁻² día⁻¹. Posteriormente, para evaluar si los cambios en el sistema antioxidante de las plantas conducían a una respuesta de aclimatación frente a condiciones adversas, las plantas se sometieron a un tratamiento de sequía moderada. Además, para evaluar la diferencia entre la interacción UV-B y H₂O₂ endógeno contra la interacción UV-B y H₂O₂ exógeno, se incluyó un tratamiento de aplicación foliar y radicular de 0,2 mM H₂O₂ en la planta de tabaco silvestre (no transformada).

En un estudio por Guevara-Olvera et al. (2012) se llevó a cabo la transformación genética de plantas de *N. tabacum* cv Xanthi al gen *CchGLP* y fueron generadas seis líneas que varían en el número de copias del transgén en su genoma y en los niveles de expresión del transcrito. En este estudio, utilizamos la línea transgénica 8 (L8) que es altamente expresiva y una línea que se utiliza como control transgénico (CT) ya que presenta una sola copia del gen citado pero sus niveles de expresión no son detectables. El modelo de *N. tabacum* no transformado se utilizó como control silvestre (CS). Ambos controles, CS y CT, mostraron un comportamiento similar bajo las variables estudiadas. A pesar de que las plantas CT no muestran expresión del transgén, las diferencias entre CS y CT se asocian al proceso de transformación genética que éstas sufrieron. Los resultados de esta sección se discuten con base al control transgénico CT, ya que es el modelo con mayor similitud con el modelo transgénico altamente expresivo L8.

Cuando se hace referencia a los factores *CchGLP* y UV-B aplicados de forma individual, corresponden a los datos obtenidos de las plantas L8 del grupo control (-UV-B) y de las plantas CT del grupo experimental (+UV-B), respectivamente. La combinación de factores *CchGLP* +UV-B corresponde a los datos obtenidos de L8 del grupo experimental (+UV-B). El factor de sequía individual se refiere a los datos obtenidos de las plantas L8 del grupo control (-UV-B) que fueron posteriormente sometidas al tratamiento de sequía.

El día 14 del experimento, es decir, al final del tratamiento UV-B, el factor *CchGLP* aplicado de forma individual tuvo un efecto en el aumento de los niveles de contenido foliar de H₂O₂, 7 veces mayor comparando con el control transgénico (CT). Lo anterior coincide con el hecho de que los modelos transgénicos L8 y CT han mostrado diferencias fenotípicas en condiciones basales y adversas. Estas diferencias se deben a que, mientras las plantas L8 presentaron múltiples copias del gen *CchGLP* en su genoma, las plantas CT solo presentaron una. Además, el análisis de RT-PCR de estas líneas mostró alto nivel de expresión en las líneas L8 y la línea CT no mostró niveles de expresión detectables de la transcripción de *CchGLP* (Guevara-Olvera et al., 2012). Una investigación reciente sobre el comportamiento molecular de estas plantas sugiere que un componente epigenético en la metilación del ADN de la citosina puede influir en estas diferencias (Villagómez-Aranda et al., 2021). Por otra parte, el tratamiento *CchGLP* endógeno + UV-B aumentó sinérgicamente los niveles de H₂O₂ en las plantas transgénicas L8. Mientras que los niveles de H₂O₂ por efecto de los factores *CchGLP* y UV-B aplicados de forma individual correspondieron a 0.46 y 0.16 nmol mg⁻¹ tejido de hoja, respectivamente, la combinación de los factores mostró niveles superiores a la suma de los factores por separado (0.78 nmol mg⁻¹ tejido de hoja). El aumento de los niveles de H₂O₂ y, muy probablemente, de otras especies reactivas de oxígeno (ROS), provocado por la combinación de *CchGLP* y UV-B, condujo a un aumento significativo en la capacidad antioxidante total y en la mayoría de las actividades enzimáticas estudiadas en estas plantas.

Los datos obtenidos sugieren que la única respuesta enzimática común entre los factores *CchGLP* y UV-B aplicados de forma individual fue el aumento de la actividad POD. El factor *CchGLP* mostró un aumento de actividad SOD y POD, pero la actividad de PAL no se vio afectada. El aumento de SOD en estas plantas coincide con un estudio previo que reportó que el gen *CchGLP* codifica para una Mn-superóxido dismutasa (Mn-SOD) (León-galván et al., 2011). El factor UV-B aplicado individualmente mostró mayor actividad POD y PAL, y significativamente menor actividad SOD. Resultados similares se obtuvieron por un grupo de investigadores que reportaron una mayor activación de POD que de SOD en *N. tabacum* bajo 7.7 kJ m⁻² día⁻¹ y 13.6 kJ m⁻² día⁻¹ de radiación UV-B biológicamente efectiva (Czégény et al., 2016; Majer et al., 2014).

La combinación *CchGLP* + UV-B condujo a un aumento de las actividades de SOD, POD y PAL en un 150, 92 y 16 %, respectivamente, en comparación con el control no tratado con UV-B. Los resultados de la aplicación de factores por separado sugieren que cuando los factores se aplicaron de forma combinada el papel de UV-B fue insignificante y el papel de *CchGLP* fue crucial en el aumento de SOD. Los resultados también sugieren que el aumento de la actividad PAL durante la interacción de ambos factores estuvo influenciado predominantemente por el factor UV-B. Además, el factor UV-B provocó un aumento en el contenido epidérmico foliar de flavonoles en todos los grupos tratados, sin mostrar diferencias significativas entre ellos. Estos resultados a su vez confirman que el gen *CchGLP* no tuvo un papel importante en el aumento de los niveles de estos compuestos.

La enzima catalasa (CAT) se considera una de las principales enzimas captadoras de H₂O₂ principalmente activa a concentraciones relativamente altas de H₂O₂ (Anjum et al., 2016). *CchGLP* y UV-B combinados mostraron un efecto antagónico sobre la actividad de CAT. Cuando se aplicaron por separado, los factores *CchGLP* y UV-B presentaron 4,72 y 2,64 Unidades de CAT por mg de proteína, respectivamente, mientras que la combinación de los factores provocó una disminución de la actividad de 1,26 Unidades de CAT por mg de proteína. Este resultado contrasta con el obtenido del control silvestre, que mostró un aumento significativo en la actividad de CAT en presencia de UV-B. Sin embargo, ambas líneas transgénicas L8 y el control transgénico, aun sin presencia de UV-B mostraron una respuesta disminuida de CAT. Un estudio previo ya ha demostrado, a través del estudio comparativo del proteoma y metaboloma del modelo silvestre contra las líneas transgénicas L8 y CT, que la mera presencia del transgén *CchGLP* en su genoma genera cambios metabólicos (G. Cardenas-Manríquez et al., 2016).

Sobre las respuestas morfogénicas por efecto del tratamiento UV-B, las plantas de tabaco transgénicas L8 presentaron reducción en todas las variables estudiadas en comparación con ambos controles, CS y CT, lo que puede indicar una detención del crecimiento por efecto de la combinación de factores. La reducción del largo del tallo es una respuesta fenotípica típica a la radiación UV que puede beneficiar a las plantas en condiciones de estrés por sequía, ya que tiende a reducir la carga solar total que reciben las hoja (Gitz & Liu-Gitz, 2003). No obstante lo anterior, este no fue un factor que ayudó a las plantas L8 a aclimatarse al tratamiento de sequía posterior.

Cuando las plantas L8 tratadas con UV se sometieron a un tratamiento de siete días en condiciones de sequía moderada, presentaron signos de marchitamiento tres días antes que los controles. Aunado a lo anterior, la reducción del crecimiento y las variables morfológicas estudiadas permitieron sugerir que las plantas sufrieron un estado de estrés oxidativo provocado por la combinación *CchGLP* + UV-B. Aunque no se llevó a cabo una prueba con un marcador de daño oxidativo para estudiar los niveles relativos entre las plantas L8 y los controles, los datos sobre la capacidad antioxidante, las actividades antioxidantes y las variables morfológicas permiten respaldar la sugerencia antes planteada.

Al final del tratamiento de sequía, las plantas L8 que habían recibido el tratamiento UV-B continuaron mostrando una actividad de CAT más baja y actividades de POD y SOD más altas que los controles. Este resultado sugiere que el tratamiento UV-B tiene un efecto prolongado. El factor sequía tuvo un efecto en el aumento de la actividad PAL comparando con los grupos que no recibieron el tratamiento; sin embargo, no hubo diferencia significativa entre L8 y los controles sometidos a sequía. Contrariamente a los estudios que reportan que las altas respuestas antioxidantes se correlacionan con respuestas de aclimatación; en este experimento, los datos sugieren que una mayor actividad antioxidante fue una respuesta a un desafío por altos contenidos de ROS y, que no fue suficiente para mantener el daño oxidativo. Foyer & Noctor (2003) reportaron que la producción mitocondrial de ROS no presenta diferencias bajo tratamientos de variaciones en la luz y la oscuridad debido a que, en este órgano, el consumo total de O₂ se ve menos afectado por la luz que por la actividad del ciclo del ácido tricarbóxico. Por otro lado, se ha encontrado que las enzimas localizadas en los cloroplastos parecen tener un papel crítico en la aclimatación bajo tratamientos con luz. Un modelo de tabaco transgénico en el que el transgén codifica dismutasas de superóxido de Cu/Zn localizadas en el cloroplasto Cu/Zn-SOD mostró una tolerancia a la intensidad de la luz moderada y alta (Gupta et al., 1993). Además, Majer *et al.* (2014) informaron actividades más intensas de enzimas en cloroplastos, comparando con otras SOD o peroxidasas, durante la aclimatación a UV en *N. tabacum*. Lo anterior puede sugerir que la respuesta del modelo transgénico L8 cuando se expuso a UV-B podría deberse a que la actividad de Mn-SOD mitocondrial es un mecanismo que no conduce a la aclimatación en los tratamientos con luz. Los resultados del contenido relativo de agua en hoja ayudaron a confirmar que las plantas transgénicas L8 sometidas a UV-B estaban pasando por un estado de estrés mayor que los

otros grupos, ya que presentaban valores más bajos de esta variable. Las plantas L8 del grupo control (-UV-B), que mostraron síntomas leves de estrés hasta el último día del experimento, mantuvieron los niveles más altos de contenido relativo de agua en hoja. Lo anterior coincide con la tolerancia a sequía que han mostrado estas plantas en una investigación previa (German Cardenas-Manríquez et al., 2018). Por otra parte, la dosis de UV-B utilizada en este proyecto es considerada baja, lo que coincide con los resultados obtenidos de las actividades enzimáticas por la aplicación individual del factor UV-B. El factor UV-B, aplicado de forma individual, no afectó la actividad de CAT, POD y SOD en las plantas, lo que indica que las dosis bajas de UV-B utilizadas no indujeron cambios significativos en la producción de H₂O₂ y este tratamiento por si solo no indujo estrés oxidativo en las plantas. En contraste con estos resultados, los aumentos en las actividades de CAT, SOD y POD por UV-B se han reportado en experimentos que utilizan dosis más altas. La elicitación con 6 kJ m² de radiación UV-B en plántulas de arroz indujo CAT, así como actividades SOD y APX (Thomas y Puthur, 2019). En otra investigación, la exposición de plantas de *N. tabacum* a radiación UV-B biológicamente efectiva alta (13,6 kJ m² día⁻¹) condujo a aumentos de actividad POD, APX, y Fe-SOD (Majer et al., 2014). R. Acz et al., (2018) también informaron que la aclimatación de las hojas a los rayos UV-B, correspondiente a una dosis biológicamente activa de 7,7 kJ m² día⁻¹, se confiere mediante la activación selectiva de las isoformas de POD. Los resultados sugieren que la combinación de los factores *CchGLP* + UV-B fue determinante en la respuesta de estrés mostrada por las plantas L8.

Con respecto a los resultados obtenidos durante la aplicación exógena de 0.2 mM de H₂O₂, la morfología compacta exhibida por las plantas que fueron tratadas con el factor H₂O₂ de forma individual, difiere de otros estudios que han mostrado un aumento de la biomasa y la altura de la planta en respuesta a la aplicación exógena de H₂O₂ (Ashfaque et al., 2014; Basal y Szabo, 2020; Sun et al., 2016). Sin embargo, en estos trabajos anteriores, y en la mayoría de los estudios en los que se ha aplicado H₂O₂ exógeno, se ha utilizado la aspersion foliar como único método de aplicación. En este trabajo, el tratamiento con H₂O₂ también fue aplicado a las raíces a través del riego, una diferencia que podría haber influido en los resultados. El hecho de que se obtuvieron plantas más compactas bajo todos los tratamientos

se debe considerar bajo un escenario de producción hortícola, ya que ésta podría no ser una propiedad deseada en la producción comercial si se espera una mayor biomasa.

El aumento en la capacidad antioxidante total de las plantas tratadas con UV-B + H₂O₂ al final del período de tratamiento (día 14) podría explicarse por un aumento en los antioxidantes no enzimáticos, ya que el índice de flavonoles epidérmicos foliares fue significativamente mayor en estos grupos de plantas (Qian et al., 2021). Los resultados obtenidos sobre el contenido relativo de agua de las hojas confirmaron el hecho de que los tratamientos con H₂O₂ y UV-B + H₂O₂ tuvieron un efecto en la reducción de pérdida de agua en comparación con los demás tratamientos. Se han reportado resultados similares en los que el contenido relativo de agua en hoja incrementó debido al efecto de aplicación de H₂O₂ exógeno bajo diferentes regímenes de estrés por sequía (Basal y Szab, 2020; Ishibashi et al., 2011; Sun et al., 2016). Así, los resultados de este proyecto, junto con los resultados de estudios previos, indican que una fuerte respuesta de defensa ante la sequía en plantas tratadas con H₂O₂ es el mantenimiento de altos niveles de contenido relativo de agua foliar, efecto que también se encontró en el tratamiento combinado, y que probablemente tuvo un papel clave en la tolerancia cruzada mostrada por las plantas en este experimento.

El alto nivel de actividad CAT en las plantas de tabaco tratadas con H₂O₂ en condiciones sin sequía indica que la aplicación de éste condujo a la absorción de esta molécula, o indujo la producción de ROS. Además, la actividad CAT permaneció al mismo nivel en las plantas tratadas por sequía, resultado que contrasta con el obtenido por las plantas transgénicas L8 y que pudo haber jugado un rol importante en la tolerancia mostrada en estas plantas. Las actividades PAL y POD de las plantas de tabaco tratadas con H₂O₂ mostraron el mismo comportamiento. Estos resultados sugieren que la activación de la maquinaria antioxidante enzimática debido al tratamiento con H₂O₂ indujo la tolerancia cruzada a la sequía observada en estas plantas.

Otras investigaciones también han concluido que la capacidad osmótica se ajusta a través de enzimas antioxidantes reguladoras durante la tolerancia a la sequía debido a la elicitación con H₂O₂. Sol et al. (2016) encontraron que la tolerancia a la sequía de las plántulas de pepino mejoró con la aplicación foliar de 1,5 mM de H₂O₂. En su estudio, la actividad de CAT aumentó significativamente en condiciones de sequía severa, pero no en condiciones de sequía moderada, a diferencia de las actividades de SOD y POD, que aumentaron

significativamente por el elicitor en condiciones de estrés por sequía media. De manera similar, la aplicación exógena al suelo de 5 mmol L⁻¹ H₂O₂ mejoró la tolerancia al estrés hídrico de plántulas de arroz al mismo tiempo que la actividad CAT permaneció inalterada en comparación con el control. Sin embargo, las actividades de APX y guayacol peroxidasa aumentaron significativamente (Sohag et al., 2020). En este trabajo, las plantas tratadas con UV-B + H₂O₂, siguieron una tendencia similar a las de las plantas tratadas con UV-B con respecto las actividades de PAL, CAT y SOD, lo que nuevamente confirmó la fuerte influencia que tuvo UV-B durante la combinación de factores. Con respecto a POD, ni el tratamiento con UV-B ni el tratamiento con H₂O₂ condujeron a ningún aumento en las actividades como resultado del tratamiento por sequía. Sin embargo, el tratamiento combinado UV-B + H₂O₂ condujo a un aumento sinérgico en la actividad POD que requería que ambos factores de tratamiento estuvieran presentes para la inducción de la respuesta.

Para determinar más a fondo la influencia de los rayos UV-B bajo los diferentes tratamientos, se midieron los cambios en la acumulación de transcritos de un conjunto de genes marcadores UV-B. Los genes NAC13 y BES1 mostraron mayor acumulación de transcritos en todos los tratamientos combinados con UV-B. Sin embargo, el tratamiento que mostró mayor acumulación de ambos genes fue UV-B + H₂O₂ en comparación con las plantas transgénicas L8. Aunque los niveles de transcripción de NAC13 disminuyeron entre los días 14 y 21, particularmente en plantas tratadas con UV-B+ H₂O₂, nuestros resultados sugieren que la sequía ayudó a mantener una expresión elevada de NAC13 en estas plantas. Por lo tanto, estos datos, junto con informes anteriores, indican que NAC13 ayudó a mediar respuestas al estrés en las plantas UV-B+ H₂O₂

BES1 es un factor de transcripción involucrado en las vías de señalización de los brasinoesteroides (BR) que indica que, cuando se activa, regula la expresión de miles de genes que responden a BR (Clouse 2011). En respuesta a UV-B, la expresión de BES1 en *Arabidopsis thaliana* L. parece depender de la naturaleza del tratamiento con UV-B. Si bien los niveles de UV-B en la luz solar natural (1,5 μmol m⁻² s⁻¹ durante 6 h) no afectaron la acumulación de transcripciones de *BES1* en plantas de tipo silvestre (Rai et al., 2020), la exposición al estrés UV-B proporcionada por UV en altas dosis (5 μmol m⁻²s⁻¹ durante 8 h por día por 10 días) reduce los niveles de transcripción de BES1 (Liang et al., 2020). Aquí mostramos que el tratamiento de bajo nivel de UV-B condujo a un aumento de los niveles de

transcripción de BES1 en las plantas de tabaco (Figura 5C). Además, las plantas expuestas a tratamientos con H₂O₂ o UV-B + H₂O₂ combinados mostraron un aumento aún mayor en el ARNm de BES1, lo que revela un papel importante del H₂O₂ en la inducción de la expresión de BES1. Estos datos están acordes a reportes recientes que han demostrado una regulación positiva de H₂O₂ de la señalización de BR. Tian y col. (2018) descubrieron un papel crítico del H₂O₂ en la señalización de BR en plantas de *Arabidopsis* a través de la oxidación del factor de transcripción homólogo BES1 BRASSINAZOLE-RESISTANT1 (BZR1), lo que lleva a su interacción con reguladores clave en el crecimiento celular y la vía de señalización de auxinas. En este trabajo, la abundancia de transcripciones de BES1 disminuyó del día 14 al 21 en plantas bien regadas expuestas a los tres tratamientos. Sin embargo, se mantuvieron cantidades significativas de ARNm de BES1 el día 21 en condiciones de sequía en plantas sometidas a los tres tratamientos diferentes. Estos hallazgos indican que BES1 en el tabaco está regulado transcripcionalmente por dosis bajas de UV-B y H₂O₂ exógena. La sequía también influyó en la expresión de BES1 inducida por el tratamiento con UV-B y H₂O₂, aunque la sequía como factor individual no pudo regular la transcripción de BES1.

Con respecto a la acumulación de transcritos de CHS, los resultados de este trabajo están de acuerdo con investigaciones anteriores que mostraron que UV-B mejora la acumulación de transcritos de este gen, lo que representa el primer paso comprometido de la vía de biosíntesis de flavonoides (Brown y Jenkins, 2008; Rai et al., 2020; Rodríguez-Calzada et al., 2019; Santin et al., 2020). Se ha reportado que el H₂O₂ juega un papel en la regulación de genes asociados con la biosíntesis de compuestos fenólicos, de los cuales CHS es uno (Nyathi y Baker, 2006). Los resultados también muestran que la sequía amplifica el patrón de expresión inducido particularmente por el tratamiento con UV-B en el tabaco, un resultado que coincide con un aumento de los niveles de flavonoides epidérmicos.

El estudio comparativo que se realizó entre la combinación de UV-B-H₂O₂ endógeno y UV-B-H₂O₂ exógeno, permitió deducir que si el tratamiento UV-B daña o beneficia a la planta de tabaco depende de los niveles de H₂O₂ endógeno. Considerando los resultados obtenidos del H₂O₂ endógeno y la respuesta al estrés que presentaron las plantas bajo los dos esquemas de aplicación de H₂O₂, se identificó una respuesta bifásica o de hórmesis. La Figura 5 muestra cómo los datos obtenidos permiten proponer un modelo dosis-respuesta de este modelo. Este

análisis permitió concluir que en el caso de *N. tabacum* Xanthi, la respuesta deseable de aclimatación al tratamiento de sequía ocurre cuando los niveles de H_2O_2 endógeno se encuentran en un rango entre aproximadamente 0.15 y 0.46 $nmol\ mg^{-1}$ tejido de hoja causando efectos aditivos en PAL y CAT, efecto sinérgico en POD y efecto antagónico sobre las actividades de SOD. En el caso del modelo transgénico, las respuestas deseables contra la sequía ocurren cuando los niveles endógenos producidos por la expresión de *CchGLP* permanecen inalterados. Sin embargo, el uso de un factor adicional, en este caso radiación UV-B, aumenta los niveles endógenos de H_2O_2 que pueden superar la capacidad de eliminar todas las ROS y causar efectos aditivos en POD, efectos sinérgicos en PAL y efectos antagónicos en SOD y CAT.

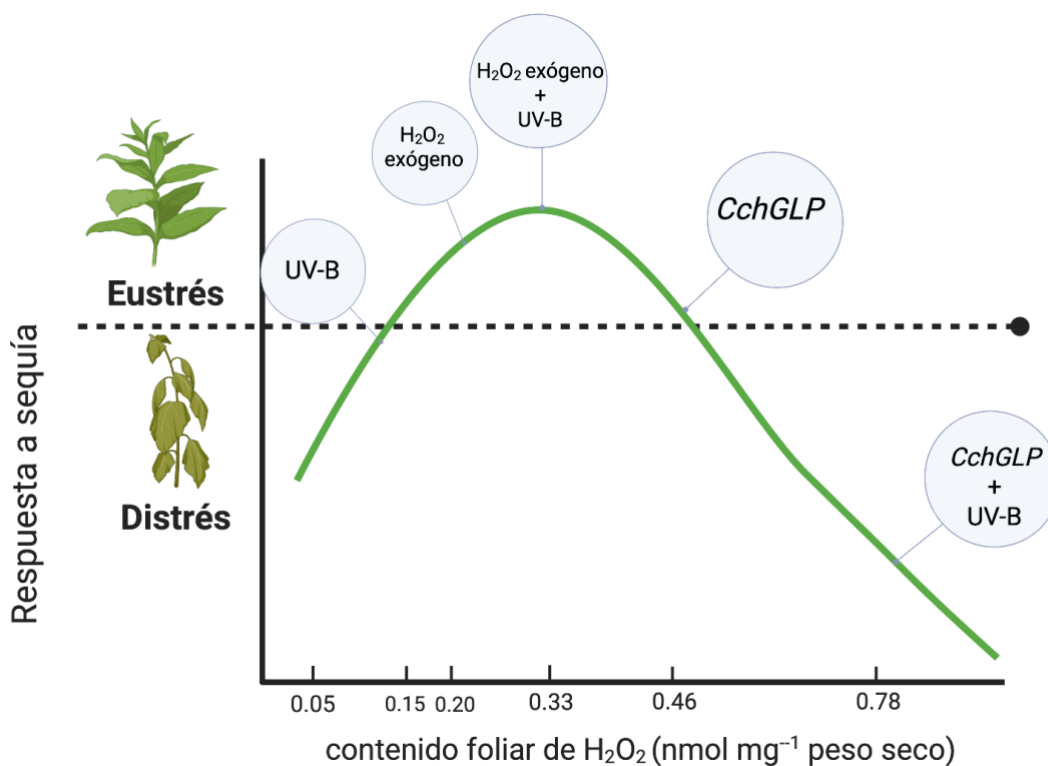


Figura 17. Modelo propuesto de dosis-respuesta de *N. tabacum* cv Xanthi que muestra la curva hormética de respuesta bifásica a condiciones de sequía moderada cuando el contenido de hojas de H_2O_2 oscila entre 0,05 y 0,78 $nmol\ mg^{-1}$ tejido de hoja.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos confirman que la hipótesis es parcialmente verdadera. La hipótesis refuta en el caso de la combinación de factores UV-B- H₂O₂ endógeno, ya que los cambios en el sistema antioxidante de la planta transgénica de *N. tabacum* cv Xanthi nc al gen *CchGLP*, generan una respuesta de distrés o estrés oxidativo frente a condiciones de sequía moderada. La hipótesis se confirma durante la interacción de los factores UV-B-H₂O₂ exógeno, ya que se generan efectos aditivos, sinérgicos y antagónicos en el sistema antioxidante de *N. tabacum* cv Xanthi nc que le confieren tolerancia a sequía moderada.

9. PERSPECTIVAS

Respecto a los hallazgos científicos de este proyecto se sugiere que experimentos posteriores utilizando plantas transgénicas con sobreexpresión de actividad Mn-SOD podrían confrontar dos hipótesis propuestas derivadas de los resultados obtenidos:

1. En *Nicotiana tabacum* se induce estrés oxidativo durante la interacción entre la producción de H₂O₂ mitocondrial y la derivada de las vías de señalización de UV-B.
2. Agregar un factor de elicitación adicional a la expresión de *CchGLP* para inducir tolerancia cruzada, supera la capacidad del modelo transgénico para eliminar los compuestos pro-oxidantes y ocasionar un desbalance en el sistema redox.

Por otra parte, los hallazgos tecnológicos del presente trabajo sugieren que un tratamiento de UV-B y elicitación con H₂O₂ tiene un efecto de sinergia en el sistema antioxidante no-enzimático y por lo tanto tiene potencial de ser utilizado como un sistema de mejoramiento en manejo de estrés hídrico o reducción del agua de riego. Sin embargo, bajo un escenario de producción hortícola, es necesario considerar que la respuesta morfológica conlleva a plantas más compactas.

10. REFERENCIAS

- Afiyanti, M., & Chen, H. J. (2014). Catalase activity is modulated by calcium and calmodulin in detached mature leaves of sweet potato. *Journal of Plant Physiology*, 171(2), 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.10.003>
- Agati, G., & Tattini, M. (2010). Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. In *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03269.x>
- Ajithkumar, I. P., & Panneerselvam, R. (2014). ROS Scavenging System, Osmotic Maintenance, Pigment and Growth Status of *Panicum sumatrense* Roth. Under Drought Stress. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 68(3), 587–595. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9746-x>
- Alonso, R., Berli, F. J., Bottini, R., & Piccoli, P. (2015). Acclimation mechanisms elicited by sprayed abscisic acid, solar UV-B and water deficit in leaf tissues of field-grown grapevines. *Plant Physiology and Biochemistry*, 91(1), 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.03.011>
- Amic, D., Davidovic-amic, D., Beslo, D., & Trinajstic, N. (2003). *Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids*. 76(1), 55–61.
- An, Y., Zhang, M., Liu, G., Han, R., & Liang, Z. (2013). Proline Accumulation in Leaves of *Periploca sepium* via Both Biosynthesis Up-Regulation and Transport during Recovery from Severe Drought. *PLoS ONE*, 8(7), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069942>
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Aphalo, P. J., Andreas, A., & Zentrum, H. (2015). *Beyond the Visible A handbook of best practice in* (Issue APRIL).
- Ávalos, A., & Pérez-Urria, E. (2009). <798-969-1-PB.pdf>. *Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.
- Bandurska, H., & Cieślak, M. (2013). The interactive effect of water deficit and UV-B radiation on salicylic acid accumulation in barley roots and leaves. *Environmental and Experimental Botany*, 94, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.03.001>
- Bandurska, H., Niedziela, J., & Chadzinikolaou, T. (2013). Separate and combined responses

- to water deficit and UV-B radiation. *Plant Science*, 213, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.09.003>
- Blum, A. (2017). Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. *Plant Cell and Environment*, 40(1), 4–10. <https://doi.org/10.1111/pce.12800>
- Brosché, M., & Strid, Å. (2003). Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants. In *Physiologia Plantarum* (Vol. 117, Issue 1, pp. 1–10). <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.1170101.x>
- Cardenas-Manríquez, G., Vega-Muñoz, I., Villagómez-Aranda, A. L., León-Galvan, M. F., Cruz-Hernandez, A., Torres-Pacheco, I., Rangel-Cano, R. ., Rivera-Bustamante, R. F., & Guevara-Gonzalez, R. . (2016). Proteomic and metabolomic profiles in transgenic tobacco (*N. tabacum xanthi nc*) to CchGLP from *Capsicum chinense* BG-3821 resistant to biotic and abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany*, 130, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.05.005>
- Cardenas-Manríquez, German, Cruz-Hernandez, A., Torres-Pacheco, I., Caballero-Pérez, J., González-Chavira, M. M., García-Ortega, L. F., & Guevara-González, R. G. (2018). Transcriptome profiling of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. *xanthi nc*) expressing CchGLP gene from *Capsicum chinense* Jacq. reveals gene expression associated with stress tolerance. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 93(6), 595–604. <https://doi.org/10.1080/14620316.2017.1421485>
- Cruz De Carvalho, M. H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. *Plant Signaling and Behavior*, 3, 156–165. <https://doi.org/10.4161/psb.3.3.5536>
- Cutler, G. J., Nettleton, J. A., Ross, J. A., Harnack, L. J., Jacobs, D. R., Scrafford, C. G., Barraji, L. M., Mink, P. J., & Robien, K. (2008). Dietary flavonoid intake and risk of cancer in postmenopausal women: The Iowa Women’s Health Study. *International Journal of Cancer*, 123(3), 664–671. <https://doi.org/10.1002/ijc.23564>
- Czégény, G., Le Martret, B., Pávkovics, D., Dix, P. J., & Hideg, É. (2016). Elevated ROS-scavenging enzymes contribute to acclimation to UV-B exposure in transplastomic tobacco plants, reducing the role of plastid peroxidases. *Journal of Plant Physiology*, 201, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.05.026>

- Davidson, R. M., Reeves, P. A., Manosalva, P. M., & Leach, J. E. (2009). Germins: A diverse protein family important for crop improvement. *Plant Science*, 177(6), 499–510. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.08.012>
- Dunwell, J. M., Gibbings, J. G., Mahmood, T., & Saqlan Naqvi, S. M. (2008). Germin and germin-like proteins: evolution, structure and function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27(5), 342–375. <https://doi.org/10.1080/07352680802333938>
- Dunwell, J. M., Khuri, S., & Gane, P. J. (2000). Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 64(1), 153–179. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.153-179.2000>
- Fahad, S., Bajwa, A. A., Nazir, U., Anjum, S. A., Farooq, A., Zohaib, A., Sadia, S., Nasim, W., Adkins, S., Saud, S., Ihsan, M. Z., Alharby, H., Wu, C., Wang, D., & Huang, J. (2017). Crop Production under Drought and Heat Stress: Plant Responses and Management Options. *Frontiers in Plant Science*, 8(June), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01147>
- Falcone, M. L., Rius, S. P., & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3(September), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., & Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: Effects, mechanisms and management. *Springer Netherlands*, 153–188. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_12
- Fina, J. P. (2017). *Estudio Del Efecto De La Radiación UV-B en Plantas*. 2–4.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 119(3), 355–364. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00223.x>
- Frohnmeier, H., & Staiger, D. (2003). Ultraviolet-B Radiation-Mediated Responses in Plants. Balancing Damage and Protection. *Plant Physiology*, 133, 1420–1428. <https://doi.org/10.1104/pp.103.030049>
- Gasca-González, M. R., Rivera-Herrera, R. F., & Torres-Pacheco, I. (2008). Estudio del transcriptoma en capsicum chinense jacq. resistente al virus huasteco vena amarilla del chile. *Agrociencia*.

- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *48*(12), 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Gitz, D. C., & Liu-Gitz, L. (2003). How do UV Photomorphogenic Responses Confer Water Stress Tolerance? *Photochemistry and Photobiology*, *78*(6), 529. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2003\)078<0529:hduprc>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2003)078<0529:hduprc>2.0.co;2)
- Guevara-Olvera, L., Ruíz-Nito, M. L., Rangel-Cano, R. M., Torres-Pacheco, I., Rivera-Bustamante, R. F., Muñoz-Sánchez, C. I., González-Chavira, M. M., Cruz-Hernandez, A., & Guevara-González, R. G. (2012). Expression of a germin-like protein gene (CchGLP) from a geminivirus-resistant pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) enhances tolerance to geminivirus infection in transgenic tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *78*, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.01.005>
- Gupta, A. S., Heinen, J. L., Holaday, A. S., Burke, J. J., & Allen, R. D. (1993). Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(4), 1629–1633. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.4.1629>
- Han, R. M., Zhang, J. P., & Skibsted, L. H. (2012). Reaction dynamics of flavonoids and carotenoids as antioxidants. *Molecules*, *17*(2), 2140–2160. <https://doi.org/10.3390/molecules17022140>
- Hayat, S., Ahmad, H., Ali, M., Ren, K., & Cheng, Z. (2018). Aqueous garlic extract stimulates growth and antioxidant enzymes activity of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Scientia Horticulturae*, *240*, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.011>
- He, F., Sheng, M., & Tang, M. (2017). Effects of rhizophagus irregularis on photosynthesis and antioxidative enzymatic system in robinia pseudoacacia L. Under drought stress. *Frontiers in Plant Science*, *8*(February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00183>
- Hernández, I., Alegre, L., & Munné-Bosch, S. (2004). Drought-induced changes in flavonoids and other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. *Tree Physiology*, *24*(11), 1303–1311. <https://doi.org/10.1093/treephys/24.11.1303>
- Hideg, É., Jansen, M. A. K., & Strid, Å. (2013). UV-B exposure, ROS, and stress: Inseparable companions or loosely linked associates? *Trends in Plant Science*, *18*(2), 107–115.

<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.09.003>

- Hoagland, D. R. (1920). Optimum Nutrient Solutions for Plants. *Science*, 52(1354), 562–564. <https://doi.org/10.1126/science.52.1354.562>
- Hossain, M. A., Bhattacharjee, S., Armin, S. M., Qian, P., Xin, W., Li, H. Y., Burritt, D. J., Fujita, M., & Tran, L. S. P. (2015). Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: Insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers in Plant Science*, 6(June). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00420>
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C. B., & Rahu, N. (2016). Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>
- Ishibashi, Y., Yamaguchi, H., Yuasa, T., Iwaya-Inoue, M., Arima, S., & Zheng, S. H. (2011). Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. *Journal of Plant Physiology*, 168(13), 1562–1567. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.02.003>
- Jansen, M. A. K., & Bornman, J. F. (2012). UV-B radiation: From generic stressor to specific regulator. *Physiologia Plantarum*, 145(4), 501–504. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01656.x>
- Jansen, M. A. K., Elfstrand, M., Heggie, L., Sitbon, F., Dix, P. J., & Thorneley, R. N. F. (2004). Over-expression of phenol-oxidising peroxidases alters the UV-susceptibility of transgenic *Nicotiana tabacum*. *New Phytologist*, 163(3), 585–594. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01132.x>
- Kavas, M., Baloğlu, M. C., Akça, O., Köse, F. S., & Gökçay, D. (2013). Effect of drought stress on oxidative damage and antioxidant enzyme activity in melon seedlings. *Turkish Journal of Biology*, 37(4), 491–498. <https://doi.org/10.3906/biy-1210-55>
- Khan, M. A. M., Ulrichs, C., & Mewis, I. (2011). Effect of water stress and aphid herbivory on flavonoids in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 84(2), 178–182.
- Kovács, V., Gondor, O. K., Szalai, G., Majláth, I., Janda, T., & Pál, M. (2014). UV-B radiation modifies the acclimation processes to drought or cadmium in wheat. *Environmental and Experimental Botany*, 100, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.12.019>
- Lang-Mladek, C., Xie, L., Nigam, N., Chumak, N., Binkert, M., Neubert, S., & Hauser, M.

- T. (2012). UV-B signaling pathways and fluence rate dependent transcriptional regulation of ARIADNE12. *Physiologia Plantarum*, 145(4), 527–539. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01561.x>
- Laxa, M., Liebthal, M., Telman, W., Chibani, K., & Dietz, K. J. (2019). The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/antiox8040094>
- Lee, Y. P., Kim, S. H., Bang, J. W., Lee, H. S., Kwak, S. S., & Kwon, S. Y. (2007). Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Reports*, 26(5), 591–598. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0253-z>
- León-galván, F., Joaquín-ramos, A. D. J., & Torres-pacheco, I. (2011). A *Germin-Like Protein Gene (CchGLP)* of *Capsicum chinense Jacq . Is Induced during Incompatible Interactions and Displays Mn-Superoxide Dismutase Activity*. 1200(July), 7301–7313. <https://doi.org/10.3390/ijms12117301>
- Lü, P., Kang, M., Jiang, X., Dai, F., Gao, J., & Zhang, C. (2013). RhEXPA4, a rose expansin gene, modulates leaf growth and confers drought and salt tolerance to Arabidopsis. *Planta*, 237(6), 1547–1559. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1867-3>
- Lyu, G. Z., Li, D. B., Liu, X. L., & Li, S. S. (2019). UV-B tolerant mutant arabidopsis RCD1-1 exhibits higher photosynthetic activity and less oxidative damage. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(5), 11813–11833. https://doi.org/10.15666/aeer/1705_1181311833
- Majer, P., Czégény, G., Sándor, G., Dix, P. J., & Hideg, É. (2014). Antioxidant defence in UV-irradiated tobacco leaves is centred on hydrogen-peroxide neutralization. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82, 239–243. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.06.011>
- Martínez-Lüscher, J., Morales, F., Delrot, S., Sánchez-Díaz, M., Gomés, E., Aguirreolea, J., & Pascual, I. (2013). Short- and long-term physiological responses of grapevine leaves to UV-B radiation. *Plant Science*, 213, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.08.010>
- Mátai, A., Nagy, D., & Hideg, É. (2018). UV-B strengthens antioxidant responses to drought in *Nicotiana benthamiana* leaves not only as supplementary irradiation but also as pre-

- treatment. *Plant Physiology and Biochemistry*, April, 0–1.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.09.014>
- Mejía-Teniente, L., Duran-Flores, F. de D., Chapa-Oliver, A. M., Torres-Pacheco, I., Cruz-Hernández, A., González-Chavira, M. M., Ocampo-Velázquez, R. V., & Guevara-González, R. G. (2013). Oxidative and molecular responses in capsicum annum L. after hydrogen peroxide, salicylic acid and chitosan foliar applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 10178–10196.
<https://doi.org/10.3390/ijms140510178>
- Mewis, I., Khan, M. A. M., Glawischnig, E., Schreiner, M., & Ulrichs, C. (2012). Water Stress and Aphid Feeding Differentially Influence Metabolite Composition in *Arabidopsis thaliana* (L.). *PLoS ONE*, 7(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048661>
- Mhamdi, A., & Van Breusegem, F. (2018). Reactive oxygen species in plant development. *Development (Cambridge)*, 145(15). <https://doi.org/10.1242/dev.164376>
- Mittler, R., & Zilinskas, B. a. (1994). Drought Stress and Following Recovery From Drought. *The Plant Journal*, 5(3), 397–405.
- Müller-Xing, R., Xing, Q., & Goodrich, J. (2014). Footprints of the sun: Memory of UV and light stress in plants. *Frontiers in Plant Science*, 5(SEP), 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00474>
- Nakabayashi, R., Yonekura-Sakakibara, K., Urano, K., Suzuki, M., Yamada, Y., Nishizawa, T., Matsuda, F., Kojima, M., Sakakibara, H., Shinozaki, K., Michael, A. J., Tohge, T., Yamazaki, M., & Saito, K. (2014). Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *Plant Journal*, 77(3), 367–379. <https://doi.org/10.1111/tpj.12388>
- Neugart, S., Zietz, M., Schreiner, M., Rohn, S., Kroh, L. W., & Krumbein, A. (2012). Structurally different flavonol glycosides and hydroxycinnamic acid derivatives respond differently to moderate UV-B radiation exposure. *Physiologia Plantarum*, 145(4), 582–593. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01567.x>
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L., & Foyer, C. H. (2002). Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: A predominant role for photorespiration? *Annals of Botany*, 89(SPEC. ISS.), 841–850.

<https://doi.org/10.1093/aob/mcf096>

- Parola-Contreras, I., Tovar-Perez, E. G., Rojas-Molina, A., Luna-Vazquez, F. J., Torres-Pacheco, I., Ocampo-Velazquez, R. V., & Guevara-González, R. G. (2020). Changes in affinin contents in *Heliopsis longipes* (chilcuague) after a controlled elicitation strategy under greenhouse conditions. *Industrial Crops and Products*, 148. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112314>
- Peer, W. A., Blakeslee, J. J., Yang, H., & Murphy, A. S. (2011). Seven things we think we know about auxin transport. *Molecular Plant*, 4(3), 487–504. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr034>
- Pirasteh-Anosheh, H., Saed-Moucheshi, A., Pakniyat, H., & Pessarakli, M. (2016). Stomatal responses to drought stress. *Water Stress and Crop Plants: A Sustainable Approach*, 1–2, 24–40. <https://doi.org/10.1002/9781119054450.ch3>
- Poulson, M. E., Boeger, M. R. T., & Donahue, R. A. (2006). Response of photosynthesis to high light and drought for *Arabidopsis thaliana* grown under a UV-B enhanced light regime. *Photosynthesis Research*, 90(1), 79–90. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9116-2>
- Quan, L. J., Zhang, B., Shi, W. W., & Li, H. Y. (2008). Hydrogen peroxide in plants: A versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(1), 2–18. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00599.x>
- Sáenz-de la O, D., Cedillo-Jimenez, C. A., García-Ortega, L. F., Martínez-Reséndiz, M., Arné-Robles, D., Cruz-Hernandez, A., & Guevara-Gonzalez, R. G. (2020). Response of transgenic tobacco overexpressing the CchGLP gene to cadmium and aluminium: phenotypic and microRNAs expression changes. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(1), 3–13. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00716-x>
- Schreiner, M., Mewis, I., Huyskens-Keil, S., Jansen, M. A. K., Zrenner, R., Winkler, J. B., O'Brien, N., & Krumbein, A. (2012). UV-B-Induced Secondary Plant Metabolites - Potential Benefits for Plant and Human Health. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(3), 229–240. <https://doi.org/10.1080/07352689.2012.664979>
- Segal, L. M., & Wilson, R. A. (2018). Reactive oxygen species metabolism and plant-fungal interactions. *Fungal Genetics and Biology*, 110(December 2017), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.12.003>

- Sevilla, F., Camejo, D., Ortiz-Espín, A., Calderón, A., Lázaro, J. J., & Jiménez, A. (2015). The thioredoxin/peroxiredoxin/sulfiredoxin system: Current overview on its redox function in plants and regulation by reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Experimental Botany*, *66*(10), 2945–2955. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv146>
- Shojaie, B., Mostajeran, A., & Ghannadian, M. (2016). Flavonoid dynamic responses to different drought conditions: Amount, type, and localization of flavonols in roots and shoots of *Arabidopsis thaliana* L. *Turkish Journal of Biology*, *40*(3), 612–622. <https://doi.org/10.3906/biy-1505-2>
- Silva, D. D., Kane, M. E., & Beeson, R. C. (2012). Changes in root and shoot growth and biomass partition resulting from different irrigation intervals for *Ligustrum japonicum* Thunb. *HortScience*, *47*(11), 1634–1640. <https://doi.org/10.21273/hortsci.47.11.1634>
- Sofa, A., Scopa, A., Nuzzaci, M., & Vitti, A. (2015). Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(6), 13561–13578. <https://doi.org/10.3390/ijms160613561>
- Sohag, A. A. M., Tahjib-Ul-Arif, M., Brestic, M., Afrin, S., Sakil, M. A., Hossain, M. T., Hossain, M. A., & Hossain, M. A. (2020). Exogenous salicylic acid and hydrogen peroxide attenuate drought stress in rice. *Plant, Soil and Environment*, *66*(1), 7–13. <https://doi.org/10.17221/472/2019-pse>
- Sun, Y., Wang, H., Liu, S., & Peng, X. (2016). Exogenous application of hydrogen peroxide alleviates drought stress in cucumber seedlings. *South African Journal of Botany*, *106*, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.05.008>
- Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E., & Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*, *203*(1), 32–43. <https://doi.org/10.1111/nph.12797>
- Teklemariam, T., & Blake, T. J. (2003). Effects of UVB preconditioning on heat tolerance of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Environmental and Experimental Botany*, *50*(2), 169–182. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(03\)00024-8](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(03)00024-8)
- Tezara, W. (2002). Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. *Journal of Experimental Botany*, *53*(375), 1781–1791. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf021>

- Toscano, S., Ferrante, A., Leonardi, C., & Romano, D. (2018). PAL activities in asparagus spears during storage after ammonium sulfate treatments. *Postharvest Biology and Technology*, *140*, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.02.010>
- Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: A review. *Environmental Chemistry Letters*, *4*(3), 147–157. <https://doi.org/10.1007/s10311-006-0068-8>
- Vaseghi, M. J., Chibani, K., Telman, W., Liebthal, M. F., Gerken, M., Schnitzer, H., Mueller, S. M., & Dietz, K. J. (2018). The chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin functions as thioredoxin oxidase in redox regulation of chloroplast metabolism. *ELife*, *7*, 1–28. <https://doi.org/10.7554/eLife.38194>
- Vazquez-Hernandez, C., Feregrino-Perez, A. A., Perez-Ramirez, I., Ocampo-Velazquez, R. V., Rico-García, E., Torres-Pacheco, I., & Guevara-Gonzalez, R. G. (2019). Controlled elicitation increases steviol glycosides (SGs) content and gene expression-associated to biosynthesis of SGs in *Stevia rebaudiana* B. cv. Morita II. *Industrial Crops and Products*, *139*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111479>
- Veluthakkal, R., & Dasgupta, M. G. (2015). Agrobacterium-mediated transformation of chitinase gene from the actinorhizal tree *Casuarina equisetifolia* in *Nicotiana tabacum*. *Biologia*, *70*(7). <https://doi.org/10.1515/biolog-2015-0114>
- Villagómez-Aranda, A. L., García-Ortega, L. F., Torres-Pacheco, I., & Guevara-González, R. G. (2021). Whole-genome dna methylation analysis in hydrogen peroxide overproducing transgenic tobacco resistant to biotic and abiotic stresses. *Plants*, *10*(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/plants10010178>
- Wang, F., Gao, Y., Liu, Y., Zhang, X., Gu, X., Ma, D., Zhao, Z., Yuan, Z., Xue, H., & Liu, H. (2019). BES1-regulated BEE1 controls photoperiodic flowering downstream of blue light signaling pathway in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, *223*(3), 1407–1419. <https://doi.org/10.1111/nph.15866>
- Wargent, J. J., & Jordan, B. R. (2013). *From ozone depletion to agriculture : understanding the role of UV radiation in sustainable crop production*. 1058–1076. <https://doi.org/10.1111/nph.12132>
- Wei, H., Li, L., & Wang, Y. (2013). Effects of Soil Drought Stress on the Accumulation of Alkaloids and Flavonoids in Motherwort. *International Journal of Advances in Information Sciences and Service Sciences*, *5*(6), 795–803.

<https://doi.org/10.4156/AISS.vol5.issue6.94>

Wilson, P. B., Estavillo, G. M., Field, K. J., Pornsiriwong, W., Carroll, A. J., Howell, K. A., Woo, N. S., Lake, J. A., Smith, S. M., Harvey Millar, A., Von Caemmerer, S., & Pogson, B. J. (2009). The nucleotidase/phosphatase SAL1 is a negative regulator of drought tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 58(2), 299–317. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03780.x>

Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 218–223. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00256-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00256-X)

Zhang, J. Y., Cruz De Carvalho, M. H., Torres-Jerez, I., Kang, Y., Allen, S. N., Huhman, D. V., Tang, Y., Murray, J., Sumner, L. W., & Udvardi, M. K. (2014). Global reprogramming of transcription and metabolism in *Medicago truncatula* during progressive drought and after rewatering. *Plant, Cell and Environment*, 37(11), 2553–2576. <https://doi.org/10.1111/pce.12328>

11. APÉNDICES

Tabla 9. Resultados del análisis ANOVA de dos vías para los datos de la tabla 6

Variable	Factor	Suma de cuadrados	Diferencia	Media cuadrática	F	Valor-P
Largo del tallo	UV-B	153.6	1	153.6	276.9	P<.001 ***
	Genotipo	21.09	2	10.55	19.01	P<.001 ***
	Interacción	3.664	2	1.832	3.303	P=.051 ns
	Residual	16.64	30	0.5546		
Número de hojas	UV-B	3.361	1	3.361	12.87	P=.001 **
	Genotipo	14.39	2	7.194	27.55	P<.001 ***
	Interacción	16.72	2	8.361	32.02	P<.001 ***
	Residual	7.833	30	0.2611		
Diámetro del tallo basal	UV-B	2.778	1	2.778	17.94	P<.001 ***
	Genotipo	2.854	2	1.427	9.217	P<.001 ***
	Interacción	0.4350	2	0.2175	1.405	P=.261 ns
	Residual	4.645	30	0.1548		

Tabla 10. Resultados del análisis ANOVA de dos vías para los datos de la figura 8

Variable	Factor	Suma de cuadrados	Diferencia	Media cuadrática	F	Valor-P
Largo del tallo	H ₂ O ₂	23.40	1	23.40	26.41	P<.001 ***
	UV-B	31.97	1	31.97	36.08	P<.001 ***
	Interacción	2.734	1	2.734	3.085	P=.094 Ns
	Residual	17.72	20	0.8861		
Número de hojas	H ₂ O ₂	4.167	1	4.167	6.944	P=.016 **
	UV-B	4.167	1	4.167	6.944	P=.016 ***
	Interacción	1.500	1	1.500	2.500	P=.130 ns
	Residual	12.00	20	0.6000		
Diámetro del tallo basal	H ₂ O ₂	1.804	1	1.804	9.625	P=.006 ***
	UV-B	0.2053	1	0.2053	1.096	P=.308 ns
	Interacción	0.08167	1	0.08167	0.4357	P=.517 ns
	Residual	3.749	20	0.1874		

Tabla 11. Resultados del análisis ANOVA de tres vías para los datos de la tabla 7

Variable	Factor	Suma de cuadrados	Diferencia	Media cuadrática	F	Valor-P		
Contenido relativo de agua (RWC)	Sequía	4271	1	4271	1435	P<0.0001	****	
	Genotipos	3.345	2	1.673	0.5620	P=0.5774	ns	
	UV-B	101.0	1	101.0	33.94	P<0.0001	****	
	Interacción de factores							
	Genotipos × Sequía	12.06	2	6.032	2.027	P=0.1537	ns	
	Genotipos × UV-B	124.5	2	62.24	20.91	P<0.0001	****	
	Sequía × UV-B	128.8	1	128.8	43.29	P<0.0001	****	
	Genotipos × Sequía × UV-B	135.2	2	67.59	22.71	P<0.0001	****	
Residual	71.42	24	2.976					

Tabla 12. Resultados del análisis ANOVA de tres vías para los datos de la tabla 8

Variable	Factor	Suma de cuadrados	Diferencia	Media cuadrática	F	Valor-P		
Contenido relativo de agua (RWC)	H ₂ O ₂	396.8	1	396.8	126.6	P<.001	***	
	Sequía				F (1, 40)			
			2611	1	2611	= 833.2	P<.001	***
	UV-B					F (1, 40)		
			5.333	1	5.333	= 1.702	P=.199	ns
	Interacción de factores							
	H ₂ O ₂ × Sequía	752.1	1	752.1	240.0	P<.001	***	
	H ₂ O ₂ × UV-B	1.333	1	1.333	0.4255	P=.518	ns	
Sequía × UV-B	16.33	1	16.33	5.213	P=.028	*		
H ₂ O ₂ × Sequía × UV-B	5.333	1	5.333	1.702	P=.199	ns		
Residual	125.3	40	3.133					

Tabla 13. Resultados del análisis ANOVA de dos vías para los datos de la figura 11

Variable	Factor	Suma de cuadrados	Diferencia	Media cuadrática	F	Valor-P	
TEAC	UV-B	0.004122	1	0.004122	160.5	P<.001	***
	Genotipos	0.001443	2	0.0007213	28.09	P<.001	***
	Interacción	1.433e-005	2	7.163e-006	0.2790	P=.766	ns
	Residual	0.0009314	12	7.762e-005			
H ₂ O ₂	UV-B	0.09125	1	0.09125	1055	P<.001	***
	Genotipos	0.7206	2	0.3603	4165	P<.001	***
	Interacción	0.03132	2	0.01566	181.0	P<.001	***
	Residual	0.0005190	6	8.650e-005			
PAL	UV-B	5050	1	5050	1128	P<.001	***
	Genotipos	1193	2	596.6	133.2	P<.001	***
	Interacción	258.8	2	129.4	28.89	P<.001	***
	Residual	53.74	12	4.479			
SOD	UV-B	0.05038	1	0.05038	0.5257	P=.482	ns
	Genotipos	33.13	2	16.57	172.9	P<.001	***
	Interacción	0.1382	2	0.06912	0.7213	P=.506	ns
	Residual	1.150	12	0.09583			
CAT	UV-B	453.8	1	453.8	13.64	P=.003	**
	Genotipos	2564	2	1282	38.54	P<.001	***
	Interacción	1830	2	915.1	27.51	P<.001	***
	Residual	399.2	12	33.26			
POD	UV-B	802.0	1	802.0	62.06	P<.001	***
	Genotipos	1249	2	624.4	48.32	P<.001	***
	Interacción	7.220	2	3.610	0.2794	P=.766	ns
	Residual	77.54	6	12.92			
Absorbancia UV epidérmica	UV-B	0.9900	1	0.9900	790.3	P<.001	***
	Genotipos	0.01496	2	0.007478	5.969	P=.007	**
	Interacción	0.004200	2	0.002100	1.676	P=.204	ns
	Residual	0.03758	30	0.001253			

Tabla 14. Resultados del análisis ANOVA de tres vías para los datos de la figura 12

Variable	Factor	Suma de cuadrados	Diferencia	Media cuadrática	F	Valor-P	
TEAC	Sequía	0.01064	1	0.01064	137.1	P<.001	***
	Genotipos	0.0002061	2	0.0001030	1.328	P=.301	ns
	UV-B	0.002895	1	0.002895	37.30	P<.001	***
	Interacción de factores						
	Genotipos × Sequía	0.002245	2	0.001123	14.46	P<.001	***
	Genotipos × UV-B	0.0006873	2	0.0003436	4.427	P=.036	*
	Sequía × UV-B	9.375e-006	1	9.375e-006	0.1208	P=.734	ns
	Genotipos × Sequía × UV-B	1.200e-005	2	6.000e-006	0.07730	P=.926	ns
	Residual	0.0009314	12	7.762e-005			
	PAL	Sequía	126290	1	126290	3584	P<.001
Genotipos		5636	2	2818	79.98	P<.001	***
UV-B		30522	1	30522	866.3	P<.001	***
Interacción de factores							
Genotipos × Sequía		7929	2	3964	112.5	P<.001	***
Genotipos × UV-B		4161	2	2080	59.04	P<.001	***
Sequía × UV-B		24116	1	24116	684.4	P<.001	***
Genotipos × Sequía × UV-B		10009	2	5005	142.0	P<.001	***
Residual		845.6	24	35.23			
SOD		Sequía	262.0	1	262.0	104.1	P<.001
	Genotipos	585.0	2	292.5	116.3	P<.001	***
	UV-B	12.90	1	12.90	5.129	P=.033	*
	Interacción de factores						
	Genotipos × Sequía	91.95	2	45.98	18.28	P<.001	***
	Genotipos × UV-B	4.302	2	2.151	0.8550	P=.438	ns
	Sequía × UV-B	4.618	1	4.618	1.836	P=.188	ns

CAT	Genotipos × Sequía × UV-B	33.77	2	16.88	6.711	P=.005	**	
	Residual	60.38	24	2.516				
	Sequía	3084	1	3084	1109	P<.001	***	
	Genotipos	363.5	2	181.7	65.37	P<.001	***	
	UV-B	39.82	1	39.82	14.33	P<.001	***	
Interacción de factores								
POD	Genotipos × Sequía	4.785	2	2.392	0.8606	P=.436	ns	
	Genotipos × UV-B	34.32	2	17.16	6.172	P=.007	**	
	Sequía × UV-B	12.95	1	12.95	4.658	P=.041	*	
	Genotipos × Sequía × UV-B	72.80	2	36.40	13.09	P<.001	***	
	Residual	66.72	24	2.780				
	Sequía	9969	1	9969	310.2	P<.001	***	
	Genotipos	3849	2	1924	59.87	P<.001	***	
	UV-B	1486	1	1486	46.24	P<.001	***	
	Interacción de factores							
	Absorbancia UV epidérmica	Genotipos × Sequía	225.3	2	112.7	3.506	P=.063	ns
Genotipos × UV-B		1131	2	565.3	17.59	P<.001	***	
Sequía × UV-B		42.27	1	42.27	1.315	P=.274	ns	
Genotipos × Sequía × UV-B		1510	2	755.0	23.49	P<.001	***	
Residual		385.7	12	32.14				
Sequía		0.4994	1	0.4994	337.3	P<.001	***	
Genotipos		0.007339	2	0.003669	2.478	P=.105	ns	
UV-B		0.4715	1	0.4715	318.5	P<.001	***	
Interacción de factores								
		Genotipos × Sequía	0.01184	2	0.005919	3.998	P=.032	*
	Genotipos × UV-B	0.006072	2	0.003036	2.051	P=.151	ns	
	Sequía × UV-B	0.06934	1	0.06934	46.84	P<.001	***	

Genotipos × Sequía × UV-B	0.003772	2	0.001886	1.274	P=.298 ns
Residual	0.03553	24	0.001481		

Tabla 15. Resultados del análisis ANOVA de tres vías para los datos de la figura 13

Variable	Factor	Suma de cuadrados	Diferencia	Media cuadrática	F	Valor-P	
PAL	H ₂ O ₂	7.993	1	7.993	1.343	P=0.2635 ns	
	Sequía	11810	1	11810	1985	P<0.0001 ****	
	UV-B	3511	1	3511	590.1	P<0.0001 ****	
	Interacción de factores						
	H ₂ O ₂ × Sequía	1106	1	1106	185.9	P<0.0001 ****	
	H ₂ O ₂ × UV-B	285.5	1	285.5	47.98	P<0.0001 ****	
	Sequía × UV-B	4769	1	4769	801.5	P<0.0001 ****	
	H ₂ O ₂ × Sequía × UV-B	255.1	1	255.1	42.88	P<0.0001 ****	
	Residual	95.20	16	5.950			
	CAT	H ₂ O ₂	19.32	1	19.32	2.862	P=0.1100 ns
Sequía		1290	1	1290	191.1	P<0.0001 ****	
UV-B		17.03	1	17.03	2.522	P=0.1318 ns	
Interacción de factores							
H ₂ O ₂ × Sequía		273.6	1	273.6	40.53	P<0.0001 ****	
H ₂ O ₂ × UV-B		8.327	1	8.327	1.233	P=0.2831 ns	
Sequía × UV-B		54.57	1	54.57	8.083	P=0.0117 *	
H ₂ O ₂ × Sequía × UV-B		157.2	1	157.2	23.29	P=0.0002 ***	
Residual		108.0	16	6.751			
POD		H ₂ O ₂	108.4	1	108.4	17.27	P=0.0032 **
	Sequía	2000	1	2000	318.5	P<0.0001 ****	
	UV-B	1657	1	1657	264.0	P<0.0001 ****	

Interacción de factores								
SOD	H ₂ O ₂ × Sequía	256.8	1	256.8	40.92	P=0.0002	***	
	H ₂ O ₂ × UV-B	631.8	1	631.8	100.7	P<0.0001	****	
	Sequía × UV-B	229.9	1	229.9	36.63	P=0.0003	***	
	H ₂ O ₂ × Sequía × UV-B	2561	1	2561	408.0	P<0.0001	****	
	Residual	50.22	8	6.277				
	H ₂ O ₂	0.01260	1	0.01260	0.01787	P=0.8953	ns	
	Sequía	78.30	1	78.30	111.0	P<0.0001	****	
	UV-B	10.84	1	10.84	15.37	P=0.0012	**	
	Interacción de factores							
	H ₂ O ₂ × Sequía	0.01353	1	0.01353	0.01919	P=0.8915	ns	
H ₂ O ₂ × UV-B	0.5922	1	0.5922	0.8398	P=0.3731	ns		
Sequía × UV-B	6.816	1	6.816	9.666	P=0.0068	**		
H ₂ O ₂ × Sequía × UV-B	0.2341	1	0.2341	0.3319	P=0.5725	ns		
Residual	11.28	16	0.7052					

Tabla 16. Resultados del análisis ANOVA de tres vías para los datos de la figura 14

Variable	Factor	Suma de cuadrados	Diferencia	Media cuadrática	F	Valor-P	
Absorbancia	H ₂ O ₂	0.01170	1	0.01170	8.617	P=.010	**
UV epidérmica	Sequía	0.2035	1	0.2035	149.8	P<.001	***
	UV-B	0.2542	1	0.2542	187.1	P<.001	***
Interacción de factores							
	H ₂ O ₂ × Sequía	0.0002042	1	0.0002042	0.1503	P=.703	ns
	H ₂ O ₂ × UV-B	0.01654	1	0.01654	12.17	P=.003	**
	Sequía × UV-B	0.04770	1	0.04770	35.12	P<.001	***

H ₂ O ₂ × Sequía ×						
UV-B	0.007704	1	0.007704	5.672	P=.030	*
Residual	0.02173	16	0.001358			

Tabla 17. Resultados del análisis ANOVA para los datos de la figura 15 (ANOVA de dos vías para TEAC día 14 y ANOVA de tres vías para TEAC día 21)

Variable	Factor	Suma de cuadrados	Diferencia	Media cuadrática	F	Valor-P		
TEAC día 14	UV-B	0.001590	1	0.001590	54.07	P=0.0018	**	
	H ₂ O ₂	9.680e ⁻⁰⁰⁶	1	9.680e ⁻⁰⁰⁶	0.3291	P=0.5969	ns	
	Interacción	8.450e⁻⁰⁰⁷	1	8.450e⁻⁰⁰⁷	0.02872	P=0.8736	ns	
	Residual	0.0001177	4	2.942e ⁻⁰⁰⁵				
TEAC día 21	H ₂ O ₂	0.0006113	1	0.0006113	5.349	P=.049	*	
	Sequía	0.006910	1	0.006910	60.46	P<.001	***	
	UV-B	0.0007604	1	0.0007604	6.653	P=.033	*	
	Interacción de factores							
	H ₂ O ₂ ×							
	Sequía	0.003089	1	0.003089	27.02	P<.001	***	
	H ₂ O ₂ × UV-B	0.0001898	1	0.0001898	1.660	P=.234	ns	
	Sequía × UV-	1.871e-						
	B	005	1	1.871e-005	0.1637	P=.696	ns	
	H ₂ O ₂ ×							
	Sequía × UV-	1.463e-						
	B	005	1	1.463e-005	0.1280	P=.730	ns	
	Residual	0.0009143	8	0.0001143				

Tabla 18. Resultados del análisis ANOVA de dos vías para los datos de la figura 16

Variable	Factor	Suma de cuadrados	Diferencia	Media cuadrática	F	Valor-P	
UVR8	Pre-tratamiento	0.3193	3	0.1064	0.1556	P=0.9232	ns
	Sequía	0.1056	1	0.1056	0.1544	P=0.7046	ns
	Interacción	0.4286	3	0.1429	0.2089	P=0.8875	ns
	Residual	5.473	8	0.6841			
	Pre-tratamiento	2035	3	678.4	77.16	P<0.0001	****
	Tiempo	2917	2	1458	165.9	P<0.0001	****
	Interacción	4064	6	677.3	77.02	P<0.0001	****
	Residual	105.5	12	8.793			
NAC13	Pre-tratamiento	2255	3	751.8	73.97	P<0.0001	****
	Sequía	384	1	384	37.79	P<0.0001	****
	Interacción	1603	3	534.4	52.58	P<0.0001	****
	Residual	162.6	16	10.16			
	Pre-tratamiento	7127	3	2376	77.97	P<0.0001	****
	Tiempo	5344	2	2672	87.69	P<0.0001	****
	Interacción	12549	6	2092	68.64	P<0.0001	****
	Residual	731.3	24	30.47			
BES1	Pre-tratamiento	12385	3	4128	14.27	P<0.0001	****
	Sequía	5943	1	5943	20.54	P=0.0003	***
	Interacción	13222	3	4407	15.23	P<0.0001	****
	Residual	4629	16	289.3			
	Pre-tratamiento	2252688	3	750896	68.77	P<0.0001	****
	Tiempo	4468354	2	2234177	204.6	P<0.0001	****
	Interacción	4787815	6	797969	73.08	P<0.0001	****
	Residual	262050	24	10919			
CHS	Pre-tratamiento	4245	3	1415	298.8	P<0.0001	****

Sequía	3564	1	3564	752.6	P<0.0001	****
Interacción	4347	3	1449	306.0	P<0.0001	****
Residual	75.77	16	4.736			
Pre-tratamiento	1.319E+09	3	439669297	9.516	P=0.0003	***
Tiempo	2.628E+09	2	1314081256	28.44	P<0.0001	****
Interacción	2.627E+09	6	437799120	9.475	P<0.0001	****
Residual	1.109E+09	24	46203591			
