



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Ingeniería

Doctorado en Ingeniería en Biosistemas

“Inducción de metabolitos bioactivos en *Apium graveolens* L. mediante la
aplicación de elicitores”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Doctora en Ingeniería de Biosistemas

Presenta

M. en C. Amanda Kim Rico Chávez

Dirigida por:

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Querétaro, Querétaro a 27 de noviembre de 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Inducción de metabolitos bioactivos en *Apium graveolens* L. mediante la aplicación de elicitores

por

Amanda Kim Rico Chávez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: IGDCC-127538



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Ingeniería

Doctorado en Ingeniería en Biosistemas

“Inducción de metabolitos bioactivos en *Apium graveolens* L. mediante la aplicación de elicitores”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Doctora en Ingeniería de Biosistemas

Presenta

M. en C. Amanda Kim Rico Chávez

Dirigida por:

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Presidente

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez
Secretaria

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez
Vocal

Dr. Irineo Torres Pacheco
Suplente

Dr. Enrique Rico García
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Querétaro.

Querétaro, Querétaro a 27 de noviembre de 2023, México.



I. DATOS GENERALES

Título del proyecto: “Inducción de metabolitos bioactivos en *Apium graveolens* L. mediante la aplicación de elicitores”
Nombre del alumno: Amanda Kim Rico Chávez
Número de expediente: **127538**

Programa: Doctorado en Ingeniería de Biosistemas
Director de Tesis: Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Lugar en donde realizará la investigación: Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ingeniería
Línea de Investigación: **Biosistemas**
Tipo de Investigación: **Aplicada**
Horario de trabajo: **Tiempo Completo**

M. en C. Amanda Kim Rico Chávez

Dr. Ramón Gerardo Guevara
González

Coordinador del Doctorado en
Ingeniería de Biosistemas

Dr. Juan Carlos Jáuregui Correa

Jefe de Investigación y Posgrado

A mis padres, por todo.

II. AGRADECIMIENTOS

Esta tesis presenta los resultados de un proyecto que fue posible concluir gracias a la colaboración de varias personas e instituciones a quienes les extiendo mi más sincero agradecimiento:

En primer lugar, al pueblo de México, el que, a través del CONAHCYT (CVU 636395), me otorgó una beca de manutención para poder realizar mis estudios de doctorado.

A la Universidad de Florida, al Dr. Juan Andrade y a la M. Sc. Nuria Castañeda por haberme recibido durante la estancia de investigación que realicé en el período 2022-2. Asimismo, agradezco al M.I. Oscar Armando Rico Galeana, la Biól. Gabriela Chávez Hidalgo y al Grupo Santander por ayudarme a financiar esta estancia.

A mis asesores, el Dr. Ramón Guevara, la Dra. Iza Pérez, la Dra. Angélica Feregrino, el Dr. Irineo Torres y el Dr. Enrique Rico por financiar el proyecto y por su dedicación a mi formación académica. Agradezco en particular la confianza que depositaron en mí, la calidez de la relación que me permitieron construir con cada uno, y todo el apoyo y la motivación que me brindaron de principio a fin.

A todas las personas que colaboraron en este proyecto, el M. en C. Miguel García, el Dr. Luis Miguel Contreras, la Dra. Katherine Witrick, el M. en C. Alexandro Escobar, el Dr. Fernando García, y, en especial, a la Ing. Esperanza Chávez y a la estudiante de Ing. A., Montserrat Ramírez quienes compartieron conmigo las muy arduas labores de trabajo en el invernadero.

A mis colegas y queridos amigos, la Dra. Betsie Martínez Cano por toda la ayuda que me brindó durante el proceso de titulación y al estudiante de Q.F.B. Yael López Díaz por revisar y corregir este documento.

Y finalmente, agradezco a mi familia y a Iván, quien también es parte de ella, por darme el apoyo y la estabilidad emocionales, y la comprensión que necesité constantemente durante este proceso.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| I. DATOS GENERALES | 3 |
| II. AGRADECIMIENTOS | 5 |
| III. INTRODUCCIÓN | 14 |
| IV. JUSTIFICACIÓN | 17 |
| V. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA | 18 |
| VI. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA | 19 |
| a. Hormesis y la respuesta fisiológica al estrés en las plantas | 19 |
| b. Generalidades de <i>Apium graveolens</i> | 25 |
| c. El cultivo de <i>A. graveolens</i> | 26 |
| d. Fitoquímica y propiedades farmacológicas de <i>A. graveolens</i> | 27 |
| e. Función fisiológica y biosíntesis de metabolitos en <i>A. graveolens</i> como respuesta a factores de estrés | 30 |
| VII. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 32 |
| a. Hipótesis | 32 |
| b. Objetivo general..... | 32 |
| c. Objetivos particulares..... | 33 |
| VIII. METODOLOGÍA | 33 |
| a. Establecimiento de las condiciones experimentales y obtención de material vegetal..... | 33 |
| b. Diseño y aplicación de tratamientos | 36 |
| c. Porcentaje de germinación, tiempo de germinación (t ₅₀) y desarrollo de las plántulas..... | 37 |
| d. Determinación del perfil metabólico..... | 38 |
| e. Cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales | 41 |

| | | |
|-----|---|----|
| f. | Determinación de la actividad antioxidante no enzimática..... | 42 |
| g. | Determinación de la actividad enzimática..... | 44 |
| h. | Análisis estadístico de los datos | 45 |
| IX. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 46 |
| a. | Experimento de elicitación de semillas | 46 |
| b. | Experimento de elicitación de plantas | 65 |
| X. | CONCLUSIONES | 84 |
| XI. | REFERENCIAS..... | 85 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Condiciones de temperatura y humedad dentro del invernadero durante el periodo de las pruebas. | 35 |
| Tabla 2. Condiciones de temperatura del horno para el análisis por CG-MS de las semillas..... | 40 |
| Tabla 3. Condiciones de temperatura del horno para el análisis por CG-MS de las plantas. | 41 |
| Tabla 4. Perfil metabólico de las semillas de apio (<i>Apium graveolens</i> L.). | 57 |
| Tabla 5. Perfil metabólico de las plantas de apio (<i>Apium graveolens</i> L.) tras la elicitación. | 70 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Respuesta metabólica de las plantas al estrés..... | 21 |
| Figura 2. La respuesta hormética dependiente de la dosis..... | 22 |
| Figura 3. Hojas, tallos y raíces de <i>A. graveolens</i> var. <i>dulce</i> | 26 |
| Figura 4. Estructuras químicas de algunos metabolitos bioactivos de <i>A. graveolens</i> | 30 |
| Figura 5. Invernadero experimental 4 en la Facultad de Ingeniería de la UAQ Campus Amazcala acondicionado para las pruebas. | 34 |
| Figura 6. Charola de germinación, transplante y sistema de cultivo final. | 36 |
| Figura 7. Porcentaje de germinación de las semillas elicidadas. | 47 |
| Figura 8. Curvas de germinación de las semillas de apio elicidadas. | 48 |
| Figura 9. Tiempo de germinación (t50) de las semillas de apio elicidadas. | 48 |
| Figura 10. Fotografías representativas del crecimiento de las plántulas provenientes de semillas elicidadas. | 50 |
| Figura 11. Crecimiento de las plántulas provenientes de semillas elicidadas..... | 51 |
| Figura 12. Peso seco y fresco de las plántulas provenientes de semillas elicidadas. | 52 |
| Figura 13. Contenido de ftálidos en semillas elicidadas. | 54 |
| Figura 14. Cromatograma obtenido por CG-MS del extracto de diclorometano de las semillas elicidadas. | 55 |
| Figura 15. Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos totales en las semillas elicidadas. | 60 |
| Figura 16. Actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL) en las semillas elicidadas. | 61 |
| Figura 17. Actividad antioxidante de las semillas elicidadas determinada mediante los ensayos de DPPH y ABTS. | 62 |

| | |
|--|----|
| Figura 18. Actividad de la catalasa (CAT) en las semillas elicidadas. | 64 |
| Figura 19. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en las semillas elicidadas. | 65 |
| Figura 20. Aspecto de las plantas 24 horas después de la aplicación foliar exógena de los elicitores. | 66 |
| Figura 21. Contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides en las plantas elicidadas..... | 78 |
| Figura 22. Actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL) en las plantas elicidadas. | 79 |
| Figura 23. Actividad antioxidante no enzimática en las plantas elicidadas determinada mediante los ensayos de DPPH y ABTS. | 81 |
| Figura 24. Actividad antioxidante enzimática de la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD). | 83 |

ABREVIATURAS Y SIGLAS

AS: ácido salicílico

BR: brasinoesteroides

CAT: catalasa

DAMP: patrón molecular asociado al daño

HAMP: patrón molecular asociado a herbívoros

ISR: resistencia sistémica inducida

MAMP: patrón molecular asociado a microorganismos

PAL: fenilalanina amonio liasa

PAMP: patrón molecular asociado a patógenos

PH: peróxido de hidrógeno

Q: quitosano

SAR: resistencia sistémica adquirida

SOD: superóxido dismutasa

RESUMEN

La elicitación controlada induce la biosíntesis de metabolitos y mejora la productividad de los cultivos al activar la defensa de las plantas en una forma dependiente de la dosis según el concepto de hormesis. Sin embargo, muchos factores influyen en la respuesta defensiva de las plantas, por lo que es imposible predecir las dosis a las que un elicitor concreto estimulará una respuesta deseable en un tejido vegetal específico. El apio es una especie ampliamente cultivada que sintetiza una gran variedad de compuestos bioactivos como ftálicos, furanocumarinas, otros compuestos fenólicos y terpenoides. Además, debido a su rica composición, las semillas de apio son valoradas como fitomedicamento en muchos países orientales. En este trabajo, analizamos la respuesta de las semillas y plantas de apio a la elicitación desde el enfoque de la hormesis. Las dosis 0,1, 1 y 10 mM de ácido salicílico y 15, 150 y 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de quitosano fueron evaluadas en la estimulación de las semillas y el peróxido de hidrógeno (2, 20 y 200 mM) se incluyó en la estimulación de las plantas. Un análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG/EM) reveló que el senkyunólido A es el principal compuesto del extracto diclorometano de semillas de apio. En la dosis más alta (10 mM), el ácido salicílico duplicó el contenido de senkyunólido A, aunque también perjudicó la germinación y el crecimiento de las plántulas en comparación con el control. El quitosano indujo una respuesta hormética en las variables de defensa antioxidante y desarrollo de las plántulas, aumentando 1,5 veces el contenido de senkyunólido A y mejorando el tiempo de germinación en 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en contraste con el control. En las plantas, los ftálicos también se estimularon junto con los compuestos fenólicos, especialmente tras las dosis 1 y 10 mM de ácido salicílico, 2 mM de peróxido de hidrógeno y 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de quitosano. Sin embargo, cambios significativos en el contenido de fitol y escualeno sugieren que estos compuestos, junto con los fitosteroles, también pueden considerarse marcadores de estrés, lo que constituye una perspectiva relevante para futuros trabajos.

Palabras clave: metabolismo especializado, estrés vegetal, hormesis

ABSTRACT

Controlled elicitation induces metabolite biosynthesis and enhances crop productivity by activating plant defense in a dose-dependent manner according to the concept of hormesis. However, many factors influence the defensive response of plants, making it impossible to predict the doses at which a particular elicitor will stimulate a desirable response in a specific plant cultivar or tissue. Celery is a widely cultivated species of the Apiaceae family that synthesizes a significant variety of bioactive compounds such as phthalides, furanocoumarins, other phenolic compounds and terpenoids. Moreover, due to their rich composition, celery seeds are valued as a phytomedicine in eastern countries. Here, we analyzed the response of celery seeds and plants to elicitation from the hormesis approach. We evaluated 0.1, 1, and 10 mM salicylic acid and 15, 150, and 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chitosan for seed elicitation and included hydrogen peroxide (2, 20, and 200 mM) for plant elicitation. A gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) analysis revealed that senkyunolide A is the major compound in celery seed dichloromethane extract. At the highest dose (10 mM), salicylic acid increased 2-fold senkyunolide A content, but it also impaired germination and seedling growth compared to the control. Chitosan induced a hormetic dose-response of antioxidant defense and seedling development variables, increasing 1.5-fold senkyunolide A content and improving germination time at 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ compared to the control. In plants, phthalides were also stimulated along with phenolic compounds especially after 1 and 10 mM salicylic acid, 2 mM hydrogen peroxide and 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chitosan. However, significant changes in phytol and squalene suggest that these compounds may also be considered stress markers, along with fitosterols, which constitutes a relevant perspective for future work.

Keywords: specialized metabolism, plant stress, hormesis

III. INTRODUCCIÓN

Las plantas son la base de la alimentación humana debido a que son nuestra principal fuente de carbohidratos, proteína y grasas. Adicionalmente, poseen una compleja composición química que las hace una fuente importante de nutrientes, como lo son las vitaminas y antioxidantes. No obstante, la alta disponibilidad y practicidad de los alimentos procesados ha provocado una disminución en el consumo de alimentos frescos de buena calidad nutricional, lo que, aunado al sedentarismo y la urbanización, incrementa la frecuencia del estado de enfermedad de las personas (OMS, 2018b). Por esta razón, resulta necesario que el desarrollo de tecnologías en la agroindustria se dirija a la producción de más, pero también mejores alimentos, que sean más asequibles, saludables, de mayor calidad nutricional y que posean propiedades funcionales y nutraceuticas. Estos dos términos se refieren a la capacidad que tiene un alimento de prevenir y tratar enfermedades (Yeung et al., 2018), la cual depende de la actividad biológica (bioactividad) que poseen los compuestos presentes en dicho alimento.

Los metabolitos bioactivos responsables de las propiedades funcionales y nutraceuticas de las plantas son llamados metabolitos especializados debido a que no participan directamente en las funciones de crecimiento y desarrollo de los organismos vegetales (Hounsome et al., 2008). Para las plantas, el metabolismo especializado es un recurso de adaptabilidad, debido a que, al no poderse mover de un lugar a otro, dependen de la producción de especies químicas para defenderse de los factores de estrés a los que están expuestas. Tales factores de estrés (estresores) pueden tener varios orígenes y por lo tanto se clasifican como bióticos (incluyendo herbívoros, microbios patógenos y señales químicas propias de la planta) y abióticos (Vázquez-Hernández et al., 2019). Éstos últimos se refieren a condiciones ambientales adversas como la sequía, salinidad, temperaturas extremas, entre otras.

En ese sentido, una práctica agrícola emergente consiste en exponer deliberadamente el organismo vegetal a condiciones de estrés para obtener

respuestas metabólicas positivas, idealmente sin afectar su crecimiento, productividad y características organolépticas. Con este método se ha logrado estimular la biosíntesis de una gran variedad de metabolitos en distintas especies, que incluyen terpenoides, flavonoides y fenilpropanoides, alcaloides y ácidos orgánicos (Thakur et al., 2019). Sin embargo, la respuesta al estrés de cada especie vegetal es compleja, pues depende de su identidad genética, etapa fenológica, estado nutricional e incluso de los eventos de estrés que ha experimentado durante su desarrollo. Además, debido a que el conocimiento que se tiene de las vías de señalización intracelular de las plantas es limitado, resulta imposible predecir cuál factor de estrés y con qué intensidad generará la respuesta deseada (Vasconsuelo & Boland 2007).

La respuesta adaptativa de la planta ante un estresor depende de la magnitud de la exposición a éste y no solamente de su naturaleza. Es decir, un estresor capaz de generar una respuesta positiva en determinada dosis o intensidad podría provocar toxicidad en una dosis mayor en el mismo modelo vegetal. Este fenómeno lleva el nombre de hormesis y se ha observado en la respuesta a cualquier factor de estrés, ya sea un elicitador, bioestimulante o un factor abiótico (Vázquez-Hernández et al., 2019). El comportamiento hormético de las respuestas al estrés es un punto de concurrencia que puede servir de base para generar tecnologías de elicitación, ya que se ha demostrado que es generalizable, es decir, ocurre con una magnitud semejante en todos los organismos vivos (Agathokleous et al., 2020). Por esa razón, estudiar el comportamiento hormético en una variedad de respuestas al estrés y en distintas especies agrícolas puede generar datos para modelar la relación entre dosis y respuesta, lo que podría permitir el desarrollo de tecnologías aplicables a distintos cultivos (Rico-Chávez et al., 2022).

Un cultivo relevante por su composición química es el apio (*Apium graveolens* L.), una planta aromática consumida en todo el mundo como ingrediente en platillos y como insumo de la industria alimentaria, así como reconocida y cultivada también por su uso medicinal (Meng-Yao et al., 2017). A partir de su descripción

etnofarmacológica, distintos extractos de la planta fueron estudiados demostrando bioactividad. El extracto hidroalcohólico de las hojas, por ejemplo, en el que el compuesto mayoritario es una flavona, llamada apiína posee actividad antiinflamatoria y antinociceptiva (Mencherini et al., 2007). Adicionalmente, este extracto puede disminuir los niveles de glucosa, triglicéridos, lipoproteína de baja densidad (LDL), colesterol e insulina en la sangre, lo cual puede atribuirse a los glucósidos de luteolina y apigenina que contiene (Khodaeifar et al., 2019). Los extractos de las hojas y raíces de apio también exhiben un efecto protector ante el estrés oxidativo en modelos in vivo (Popović et al., 2006).

La actividad biológica de los extractos de apio se debe a su riqueza fitoquímica. Además de flavonoides, el análisis fitoquímico de los tallos de *A. graveolens* L. reveló la presencia de otras familias de metabolitos secundarios bioactivos como furanocumarinas (Beier & Oertli, 1983), triterpenos (Zhou, 2009) y ftálicos (Bjeldanes & Kim, 1977). Estos últimos son un grupo de compuestos que se han descrito en 23 familias de plantas, entre las que destaca, por poseer la mayor variedad estructural, la familia Apiaceae (sin. Umbelliferae) (Lin et al., 2005). El potencial terapéutico de los ftálicos en su forma pura, como el 3-n-butilftálico, los senkyunólidos y el ligustílico, también ha sido evaluado encontrándose que poseen actividad antiinflamatoria, anticancerígena y protectora en contra de la isquemia cerebral, cardíaca y el daño oxidativo (Wang et al., 2023; Huang et al., 2023; Yin et al., 2023).

En el aspecto económico, el apio tiene importancia a nivel mundial. De acuerdo con las estadísticas en la Global TradePlatform de TRIDGE, en 2016 figuraron como primeros exportadores del producto fresco Estados Unidos con el 32,3 %, España con el 23,9 % y México con el 11,3 % del mercado global de exportaciones. En México se sembraron 1 561, 90 ha de apio en el 2018, lo que representa una producción de 66 276, 70 toneladas y una ganancia de 468 millones de pesos (SIAP, 2018). Sin embargo, el producto fresco no es la única presentación en la que esta planta se comercializa. Las semillas y su aceite son utilizados como saborizante en

la industria alimentaria y como aromatizante en esencias y perfumes, así como fitomedicamento debido a sus numerosas propiedades medicinales (González-Benito & Iriondo, 2002). El principal productor semillas de apio es India, que exportó 4 500 toneladas entre abril y diciembre del 2018, con un valor total de 135 millones de pesos (SBI, 2018) y produce el 49 % del total de aceite de semillas de apio producido mundialmente (Malhotra, 2012). México, en contraste, no figura entre los países productores y exportadores de productos de semillas de apio.

Existen en la actualidad pocos casos en los que se ha investigado la respuesta de plantas de apio a estresores. En 1985 Chaudhary reportó que durante el almacenamiento y con signos de infección fúngica la concentración de furanocumarinas aumentó de manera significativa. Más tarde, en 1996 Miksch y Boland comprobaron que un incremento similar puede obtenerse mediante la exposición de las hojas a ácido jasmónico (AJ) y metiljasmonato (MeJa), mientras que, en 1997, Stanjek y colaboradores explicaron de qué manera esta síntesis genera cambios fenotípicos. Adicionalmente, el AJ induce resistencia a la infestación por minadores de las hojas en plantas cultivadas (Black et al., 2003). Estudios recientes determinaron que el ácido salicílico (AS) aplicado a las plantas durante la floración provoca un aumento significativo del contenido de aceite esencial en la parte vegetativa del apio (Ahmed et al., 2018), mientras que la giberelina (GA) juega un papel determinante en la acumulación de lignina durante el desarrollo de las hojas (Duan et al., 2019).

Con este fundamento, se propuso exponer semillas y plantas de *A. graveolens* L. a condiciones de estrés controladas mediante la aplicación de los elicitores ácido salicílico, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y quitosano para inducir la síntesis de metabolitos bioactivos del tipo de los ftálicos y flavonoides.

IV. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer se encuentran entre las principales causas de muerte no solamente en México sino en todo el mundo.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2018b, 2017) en los últimos años han fallecido 17,7 millones de personas a causa de las enfermedades cardiovasculares, lo que representa un 31 % de todas las muertes registradas en el mundo. Por su parte, el cáncer ha sido responsable de 8,8 millones de defunciones anualmente, lo que lo hace la segunda causa de muerte a nivel mundial. Las nuevas tendencias para combatir estos grandes problemas de salud pública tienen base en la prevención del estado de enfermedad, lo que puede lograrse modificando el estilo de vida, principalmente la alimentación, mediante el consumo de alimentos saludables con propiedades funcionales.

Sin embargo, debido al constante aumento de la población y la consecuente limitación de los recursos naturales, la producción agrícola se enfoca en la obtención de mayores rendimientos, dejando a un lado el valor nutricional y la calidad de los productos. Esta situación se mantendrá en los próximos años puesto que de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2002) la población mundial se duplicó entre 1960 y el 2000, lo que representa un crecimiento anual medio de la demanda de productos agrícolas de un 2 % e incluso se estima que un 13 % de la población de los países en desarrollo viven ya con algún nivel de desnutrición.

En consecuencia, es necesario generar estrategias que permitan obtener un rendimiento elevado y, al mismo tiempo, incrementar el contenido de metabolitos bioactivos en los cultivos. Esto permitiría contribuir a erradicar los mayores problemas de salud pública sin afectar al desarrollo económico, a la productividad agrícola y sin generar impacto ambiental.

V. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Inducir una respuesta mediante la exposición de las plantas a distintos factores de estrés ha permitido mejorar la calidad, el rendimiento y la resistencia a plagas y enfermedades de varios cultivos de importancia comercial (Vazquez-Hernandez *et al.*, 2019, Mejía-Teniente *et al.*, 2019, Figueroa-Pérez *et al.*, 2019, Rodríguez-

Calzada *et al.*, 2019, Vega-Muñoz *et al.*, 2018, Vargas-Hernández *et al.*, 2017, Cardenas-Manríquez *et al.*, 2016). No obstante, la respuesta adaptativa al estrés de cada especie es única y los mecanismos moleculares por los que ocurre son aún en gran medida desconocidos, por lo que resulta imposible predecir cuál factor de estrés y en qué dosis puede generar una respuesta positiva para un caso en particular (Vasconsuelo & Boland, 2007).

En las plantas, la síntesis de metabolitos especializados está relacionada con la activación del sistema defensivo y se ha encontrado que la síntesis de fitoalexinas puede estimularse a partir de la aplicación exógena de elicitores del sistema inmune vegetal. El ácido salicílico es la principal fitohormona que regula la respuesta sistémica adquirida (SAR) (Ali *et al.*, 2018), mientras que el quitosano es un patrón molecular que activa rutas de señalización asociadas a la patogénesis (Xing *et al.*, 2014). A su vez, se ha descrito que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) funge como molécula de señalización ante respuestas de defensa en contra del daño oxidativo, un proceso relacionado con el estrés biótico y abiótico en los vegetales (Neill *et al.*, 2002).

Por esa razón, esta investigación propone la evaluación de la respuesta fisiológica y metabólica de las plantas y las semillas de *A. graveolens* que ocurren como consecuencia de su exposición a los elicitores ácido salicílico, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y quitosano, con el objetivo de contribuir a la dilucidación de la respuesta adaptativa al estrés del apio y promover el desarrollo de tecnologías de elicitación en esta especie.

VI. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

a. Hormesis y la respuesta fisiológica al estrés en las plantas

Debido a que los organismos vegetales carecen de movilidad, dependen de un sistema inmune altamente sensible que tiene su base en una señalización bioquímica. La respuesta al estrés en las plantas es única para cada individuo y excepcionalmente vasta. Esta respuesta está relacionada con la adaptabilidad ya

que es lo que le permite al individuo relacionarse exitosamente con el medio ambiente, defendiéndolo de los ataques de consumidores y plagas, así como de las condiciones ambientales adversas. Cuando una planta es expuesta a algún tipo de estrés, en sus células se activan distintas rutas de señalización, lo que finalmente provoca una alteración en el contenido de metabolitos especializados e incluso puede inducir la síntesis de metabolitos que no se encuentran en la planta sin estresar (Gorelick & Bernstein, 2014).

Contrario a lo que se consideró de manera histórica, la incidencia de estrés no siempre resulta en una respuesta adaptativa negativa. El estrés también puede promover el desarrollo vegetal y la productividad además de mejorar la tolerancia a otros estresores al estimular las defensas antioxidantes y aumentar la síntesis de metabolitos especializados. Esto se ha demostrado para compuestos de alto valor nutracéutico y farmacológico como terpenoides, flavonoides y fenilpropanoides (Vazquez-Hernandez, et al., 2019, Pandey et al., 2019, Mejía-Teniente et al., 2019, Figueroa-Pérez et al., 2019, Rodríguez-Calzada et al., 2019, Vega-Muñoz et al., 2018, Vargas-Hernández et al., 2017, Cardenas-Manríquez et al., 2016). Con base en esta observación, el estrés puede denominarse eustrés cuando éste provoca una respuesta favorable de la planta, que puede ser un aumento en el rendimiento, crecimiento, calidad, resistencia a plagas y enfermedades o tolerancia a otros factores abióticos de estrés (Vázquez-Hernández et al., 2019). En la figura 1 se ejemplifican casos específicos en los que la exposición de una planta al estrés estimuló su metabolismo como parte de su respuesta defensiva.

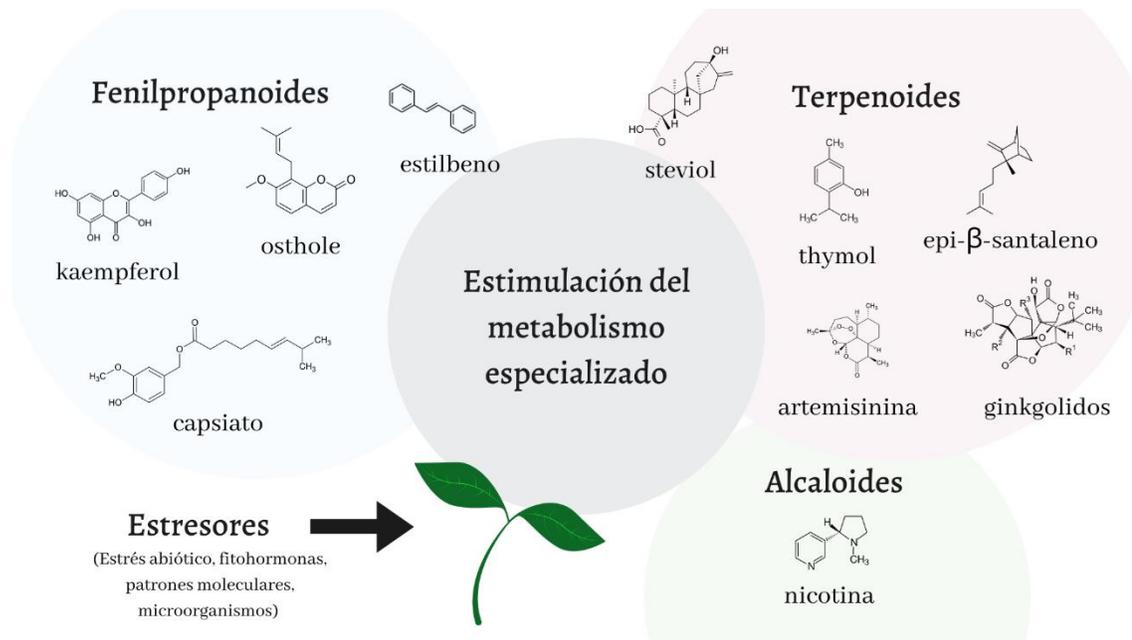


Figura 1. Respuesta metabólica de las plantas al estrés.

La percepción de estresores en los organismos vegetales estimula una respuesta defensiva que se traduce en la síntesis de metabolitos especializados. (Adaptado de Rico Chávez, et al., 2021).

El tipo de respuesta defensiva que ocurre en una planta no depende solamente de la naturaleza del factor de estrés, sino de la magnitud de la exposición del organismo a dicho factor o dosis. La respuesta adaptativa al estrés se comporta de acuerdo con la curva hormética, término frecuentemente usado en toxicología. La hormesis es la respuesta bifásica a un factor de estrés (estresor); es decir, que el estresor en dosis bajas provoca un efecto benéfico y en dosis altas provoca toxicidad o la muerte (Calabrese et al., 2007). El comportamiento característico de la respuesta adaptativa al estrés y su dependencia de la dosis o magnitud del estresor pueden observarse en la figura 2.

Existe una gran variedad de factores que provocan estrés en las plantas, por lo que para facilitar su estudio pueden ser clasificados de acuerdo con su origen, como lo proponen Vázquez-Hernández et al. en 2019. Se puede hablar de un grupo de estresores cuyo origen es biótico, entre los que se encuentran los bioestimulantes y los elicitores; estas dos definiciones pueden sobreponerse debido a que

comparten varias similitudes: los elicitores son compuestos de origen biológico que se generan ya sea fuera de las plantas, como lo son los Patrones Moleculares Asociados a Microbios y Patógenos (MAMPs y PAMPs por sus siglas en inglés) y los Patrones

Moleculares Asociados a Hervívoros (HAMPs), o dentro de ellas como los Patrones Moleculares Asociados al Daño (DAMPs) (Vega-Muñoz et al., 2018); por otra parte, los bioestimulantes son productos de origen biótico que mejoran la productividad de las plantas, pero no necesariamente por una estimulación de la respuesta a estrés. De esta manera, los bioestimulantes pueden o no ser elicitores y han sido ampliamente usados para mejorar el vigor, rendimiento, calidad y conservación post cosecha (Vázquez-Hernández et al., 2019).

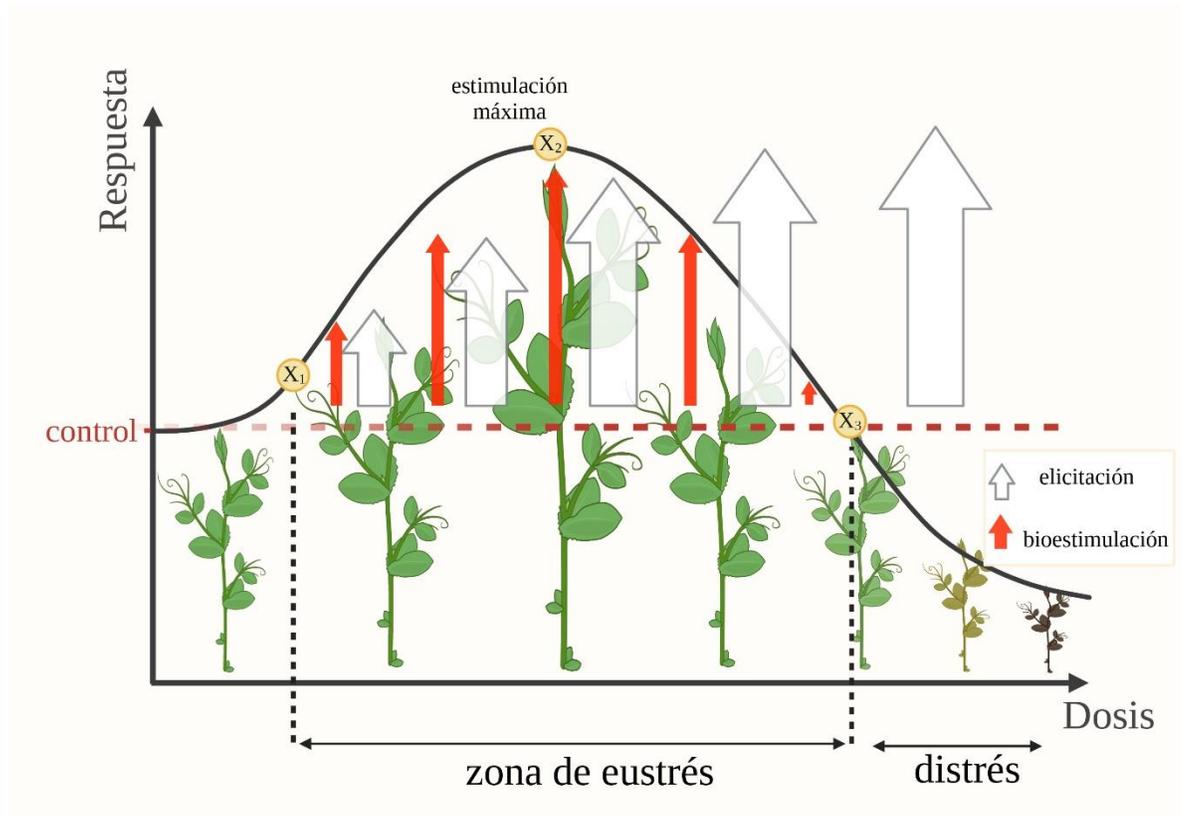


Figura 2. La respuesta hormética dependiente de la dosis. La incidencia del estrés puede evaluarse a partir de marcadores fenotípicos y moleculares. La bioestimulación existe cuando el nivel de ambos aumenta de manera proporcional. (Adaptado de Godínez-Mendoza et al., 2023).

Dentro del grupo de los elicitores bióticos, el uso de las fitohormonas y otros metabolitos especializados ha sido ampliamente propuesto para mejorar los rasgos agrícolas deseables en los cultivos, como el rendimiento y la calidad, pues son moléculas biológicamente diseñadas para modular las respuestas al estrés y las interacciones ecológicas (Zulfiqar et al., 2020). La aplicación exógena de jasmonatos y ácido salicílico, las dos fitohormonas centrales que modulan la inmunidad de las plantas, aumenta significativamente la biosíntesis de metabolitos especializados y estimula las defensas antioxidantes (Ali, 2021; Farhangi-Abriz & Ghassemi-Golezani, 2019). Aunque muchos autores sólo reportan las dosis de aplicación con mejores resultados, en estudios con fitohormonas que también incluyen dosis no óptimas, las variables de respuesta siguen el comportamiento hormético con mucha frecuencia (Dong et al., 2022; Zavala-Gómez et al., 2021). Además, se ha demostrado que hormonas del desarrollo como auxinas, giberelinas, citoquininas y brasinoesteroides también provocan respuestas defensivas e influyen en la biosíntesis de otras fitohormonas de forma hormética (Li et al., 2023; Guo et al., 2022; Zhang et al., 2021; Miglioli et al., 2020). Del mismo modo, los efectos horméticos del ácido abscísico aplicado de manera exógena también están respaldados por varios reportes científicos, una cuestión que Agathokleous et al. han revisado ampliamente en 2018 y que sigue surgiendo constantemente (Wang et al., 2022).

Los estresores que no tienen un origen biótico son compuestos químicos y factores físicos que también se comportan de acuerdo con los conceptos de hormesis y eustrés. Algunos ejemplos son la exposición a bajas temperaturas, radiación UV e incluso a ondas acústicas y electromagnéticas, así como la aplicación de sales minerales, metales pesados, gases y nanoestructuras (Vázquez-Hernández et al., 2019).

La estimulación en dosis bajas es un fenómeno conservado vinculado a la plasticidad biológica. Así, su base se ha rastreado hasta un mecanismo unificador común: el estrés oxidativo (Calabrese y Kozumbo, 2021). La adaptación redox es

un mecanismo citoprotector no específico, y los productos químicos de los procesos oxidativos que surgen en cualquier situación de estrés, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), son hormetinas (factores que inducen hormesis) ubicuas en los sistemas vegetales. El peróxido de hidrógeno funciona como una molécula de señalización en la concentración nanomolar que vincula las vías de señalización de las fitohormonas durante las respuestas al estrés, mientras que provoca daño oxidativo en dosis más altas, lo que en última instancia conduce a la muerte celular (Nazir et al., 2020). Además, esta molécula también provoca rasgos positivos en los cultivos agrícolas de forma dependiente de la dosis. Existen abundantes evidencias que demuestran que el peróxido de hidrógeno, aplicado in vitro, in planta y como tratamiento pregerminativo, estimula las defensas antioxidantes incrementando la biosíntesis de compuestos fenólicos, la capacidad antioxidante no enzimática y la actividad de enzimas antioxidantes, con importantes implicaciones en la calidad de los alimentos (Goncharuk et al., 2022; Delis-Hechavarría et al., 2021; Gómez-Velázquez et al., 2021). Sin embargo, como molécula de señalización de estrés oxidativo general, el peróxido de hidrógeno exógeno afecta a muchos otros puntos finales, como el crecimiento, la tasa fotosintética, la biosíntesis de fitohormonas, la biosíntesis de metabolitos especializados y la tolerancia cruzada al estrés (Hu et al., 2023; Singh et al., 2021; Jamaludin et al., 2020).

Otro tipo de estresor biótico que ha demostrado elicitar respuestas defensivas en las plantas que pueden utilizarse en el desarrollo de aplicaciones agrobiotecnológicas es el quitosano. El quitosano es un biopolímero que se obtiene a partir de la deacetilación de la quitina, un polisacárido formado por unidades de N-acetil-D-glucosamina, que se encuentra en los exoesqueletos de los crustáceos, insectos, y en la pared celular de algunos hongos y algas (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003). En agricultura, el quitosano ha sido utilizado para controlar enfermedades causadas por bacterias, hongos y virus. Debido a su baja toxicidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad, el quitosano es una alternativa segura a los pesticidas convencionales que actualmente representan un riesgo significativo para

el medio ambiente (Carvalho, 2017). El quitosano exhibe actividad antimicrobiana *in vitro*, la cual se ha descrito que ocurre debido a las interacciones electrostáticas que puede tener con las membranas de algunos patógenos, lo que conlleva un daño y aumenta su permeabilidad, haciendo imposibles los procesos vitales de los microorganismos (Xing et al., 2014). Sin embargo, el quitosano aplicado *in vivo* sobre los cultivos también es capaz de estimular las defensas antimicrobianas propias de la planta. La respuesta defensiva es elicitada mediante la activación de proteínas relacionadas con la patogénesis y otras enzimas que regulan la red de transducción de señales defensivas y finalmente aumentan la síntesis de metabolitos especializados en la planta y la protegen del estrés oxidativo (Xing et al., 2014).

La observación de la nutrición vegetal aunada al uso de elicitores u otros estresores es indispensable. De hecho, se ha comprobado que las plantas pueden dejar de presentar respuesta a la elicitación en condiciones de hidroponía, debido a que, ante la falta de algunos nutrientes no esenciales o raros, que sí suelen estar presentes en el suelo, la activación de la ruta biosintética puede no ocurrir, impidiendo así el aumento en la concentración de los metabolitos secundarios deseados. En contraste, el uso de elicitores como ácido jasmónico (AJ), metil jasmonato (MeJ) o ácido salicílico (AS) sí aumenta la concentración de metabolitos secundarios, pero también afecta al rendimiento del cultivo. Por esa razón, tanto el manejo de la nutrición vegetal como el uso de estresores debe realizarse de manera simultánea, siempre cuidando utilizar concentraciones de nutrientes no esenciales y raros de manera que no se transfieran a la parte comestible de la planta y que su aplicación no provoque un impacto negativo en el ambiente (Ávila-Juárez et al, 2017).

b. Generalidades de *Apium graveolens*

A. graveolens, mejor conocido por su nombre coloquial en español como apio, es una planta aromática de gran importancia a nivel mundial debido a su extendido consumo. Los primeros reportes del cultivo del apio aparecen en Italia y Francia,

desde donde fue llevado posteriormente a India, a la región de Punjab, en donde actualmente se produce a gran escala para el aprovechamiento de sus semillas (Malhotra, 2012).

A. graveolens es una planta perteneciente a la familia Apiaceae. Anual, bienal o perenne, su follaje puede variar de un tono amarillo claro al verde brillante y su altura va de los 60-90 cm. Sus tallos son ramificados y unidos de manera conspicua (Rzedowski y Rzedowski, 2001). Como puede observarse en la figura 3, las hojas son alternas, pinnadas, divididas en tres folíolos ovalados y dentadas en el ápice.



Figura 3. Hojas, tallos y raíces de *A. graveolens* var. *dulce*.

Las flores de apio son pequeñas, blancas y las inflorescencias forman umbelas. El fruto es un esquizocarpo con dos mericarpos, cada uno de los cuales contiene una semilla. El apio es diploide con un número de cromosomas $2n=22$ y aunque sus flores pueden auto fertilizarse, lo más común es que la fertilización suceda entre diferentes individuos con la ayuda de insectos polinizadores.

c. El cultivo de *A. graveolens*

Como lo describe Malhotra en su Manual de hierbas y especias (2012), la producción de apio es óptima cuando las temperaturas oscilan entre 16° y 21° C. Es sensible a las heladas, aunque tras un proceso de aclimatación puede soportarlas durante un corto período de tiempo. El sistema radicular del apio es

superficial y por lo tanto requiere un suelo rico en nutrientes y que pueda mantener la humedad. Aunque puede crecer en una gran variedad de suelos, los suelos de turba y arcillo-limosos resultan adecuados para su desarrollo. El apio es moderadamente sensible a la salinidad y crece mejor en un rango de pH de 6,0-6,6 en suelos minerales y de 5,5-6,0 en suelos orgánicos. La fertilidad adecuada del suelo se mantiene usualmente mediante la aplicación de fertilizantes comerciales, alrededor de 300 kg N, 75 kg P₂O₅ y 250 kg K₂O/ha se aplican en suelos minerales. El cultivo con propósito de producción exclusivamente de semillas requiere dosis de fertilizantes de 90 kg N, 40 kg P₂O₅ and 20 kg K₂O/ha para aquellos cultivares anuales. En las áreas con deficiencias de nutrientes menores se requiere también la aplicación de boro, calcio y magnesio para evitar desórdenes fisiológicos.

La germinación de las semillas y la emergencia de las plántulas de apio son lentas aun cuando las condiciones son favorables pues las semillas de apio tienen termodormancia, lo que resulta en una germinación incompleta o inexistente a temperaturas más altas de 25°C. Es recomendable sembrar las semillas superficialmente pues la exposición a la luz ayuda a superar esta dormancia. También se puede dar un tratamiento de remojo a 10°C usando reguladores de crecimiento como GA 4/7 o ethephon a 1000 ppm.

El apio puede creerse mediante trasplante o sembrando directamente en el campo. Mientras menor sea el espacio entre plantas, se obtiene un mejor rendimiento de semillas. El momento ideal de la siembra y trasplante depende de la variedad de la que se trate. Un espaciamiento de 40 cm entre los surcos ha entregado el mayor rendimiento de semillas.

El apio para consumir en fresco se recoge entre 90-120 días después del trasplante, según la variedad, cuando las plantas se han desarrollado por completo. En el caso del cultivo para la producción de semillas, el comportamiento es bienal en un clima templado y anual en un clima tropical o subtropical.

d. Fitoquímica y propiedades farmacológicas de *A. graveolens*

La recurrente mención del apio en la medicina tradicional ha motivado a la comunidad científica para buscar los compuestos activos que contiene y probar su efectividad medicinal mediante el análisis de sus propiedades farmacológicas.

La composición química del apio varía dependiendo de la parte de la planta de la que se trate. El compuesto mayoritario encontrado en el extracto hidroalcohólico de las hojas es una flavona, el glucósido de la apigenina, llamada apiína y este extracto polar, rico también en polifenoles, demostró tener actividad antiinflamatoria y antinociceptiva, causadas por la inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) (Mencherini et al., 2007). Adicionalmente, el extracto hidroalcohólico de hojas y tallos puede disminuir los niveles de glucosa, triglicéridos, lipoproteína de baja densidad (LDL), colesterol e insulina en la sangre, lo cual puede atribuirse a los glucósidos de luteolína y apigenina presentes en dicho extracto (Khodaeifar et al., 2019).

El análisis fitoquímico de los tallos de *A. graveolens* también reveló la presencia de otros flavonoides como la quercetina y de varios triterpenos (Zhou, 2009). Los triterpenos son compuestos de 30 carbonos derivados del escualeno que han exhibido un amplio rango de bioactividad, por ejemplo, antiinflamatoria, antimicrobiana (efectivos contra la malaria y la leishmaniasis), anticarcinogénica e hipoglicémica (Topçu, 2006).

Extractos de *A. graveolens* de distintas polaridades obtenidos de las hojas y raíces también tuvieron un efecto protector ante el estrés oxidativo en modelos in vivo (Popović et al., 2006) que se atribuye a la presencia de flavonoides, pero también implica la bioactividad de compuestos menos polares, los cuales se concentran principalmente en los aceites esenciales. Los aceites esenciales pueden encontrarse en todas las partes de la planta; sin embargo, de las hojas y tallos es posible extraer hasta 1 % mientras que en las semillas el porcentaje es mayor, habiéndose extraído hasta el 7 % de aceite (Popović et al., 2006).

Los metabolitos mayoritarios hallados en el aceite de apio son terpenoides. En las hojas, el compuesto mayoritario es el β -felandreno, un monoterpeno, que conforma entre el 14 % y el 29 % en peso del aceite (Nemes \acute{e} s et al., 2018). En las semillas, se han reportado porcentajes de rendimiento en peso hasta del 60 % para el d-limoneno y del 20 % para el selineno (Sowbhagya, 2013). Del an \acute{a} lisis de una fracci \acute{o} n polar de estas semillas se obtuvo la presencia de varios gluc \acute{o} sidos de sesquiterpenos y de ft \acute{a} lidos (Kitajima et al., 2003). Los ft \acute{a} lidos son compuestos que pueden encontrarse en menor cantidad en el aceite de apio pero que son de gran importancia por su bioactividad. Estructuralmente son un grupo de lactonas arom \acute{a} ticas a las cuales se les han atribuido una variedad de efectos farmacol \acute{o} gicos, desde insecticida, antif \acute{u} ngico y antimicrobiano, hasta hipotensivo y relajante del m \acute{u} sculo liso. Adicionalmente, se ha comprobado que algunos ft \acute{a} lidos son capaces de inhibir las enzimas topoisomerasa I y II, mecanismo que les confiere propiedades anticancer \acute{g} enas (Beck & Chou, 2007). Se ha reportado que, entre otros, *A. graveolens* metaboliza el ft \acute{a} lido sedanen \acute{o} lido, el cual tiene un efecto sedante y anticonvulsivo (Lin et al., 2005).

Existe otro grupo de compuestos bioactivos que han sido detectados en peque \acute{n} as cantidades en las semillas de apio, pero que destacan por su importante actividad biol \acute{o} gica, las furanocumarinas. Estos compuestos son conocidos por su llamada fototoxicidad, que es la capacidad de sensibilizar los tejidos ante la luz solar lo cual provoca lesiones similares a quemaduras. Es posible que las furanocumarinas sean metabolitos de defensa contra herb \acute{v} oros y se ha demostrado tambi \acute{e} n que tienen actividad antif \acute{u} ngica, lo que podr \acute{a} estar dirigido a la preservaci \acute{o} n de las semillas (Zangerl, 1997). Se ha reportado la presencia de furanocumarinas lineares en las plantas de apio, tanto en las semillas (Ahluwalia, 1987) como en las partes a \acute{e} reas (Beier, 1983), lo cual, si bien puede representar un cierto nivel de toxicidad, tambi \acute{e} n representa potencial para su uso medicinal debido a la actividad citot \acute{o} xica de estos metabolitos.

La presencia de alcaloides también se ha detectado en *A. graveolens*; sin embargo, ninguno de ellos ha sido identificado (Shanmugapriya & Ushadevi, 2015). Algunas de las estructuras de metabolitos bioactivos más importantes de *A. graveolens* se muestran en la figura 4.

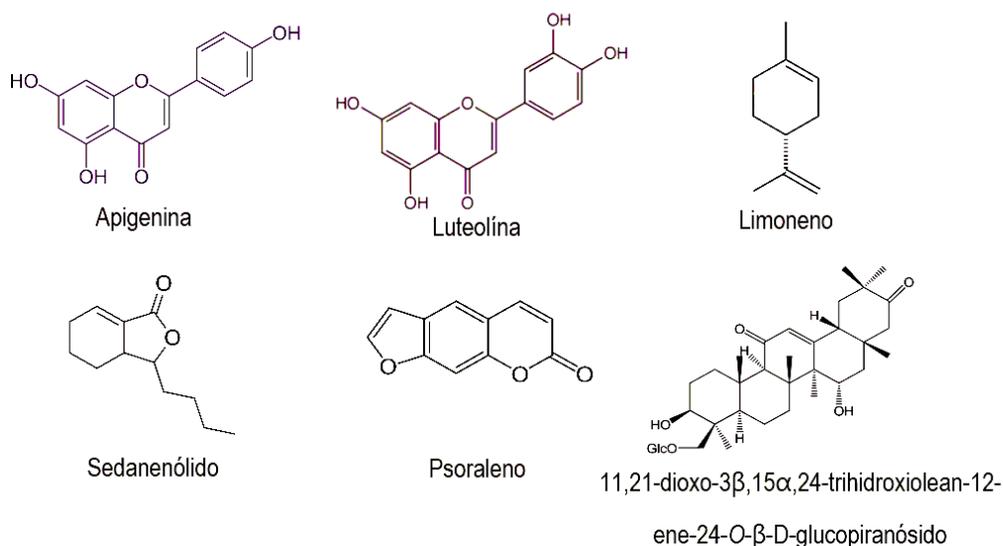


Figura 4. Estructuras químicas de algunos metabolitos bioactivos de *A. graveolens*.

e. Función fisiológica y biosíntesis de metabolitos en *A. graveolens* como respuesta a factores de estrés

Los mecanismos a partir de los cuales una planta puede sintetizar moléculas de señalización (como el AS, AJ, etileno, entre otras) y metabolitos secundarios como una respuesta al estrés habían sido poco estudiadas hasta las últimas décadas, por lo que aún son poco conocidas. Vasconsuelo y Boland en 2007 exponen los aspectos moleculares de la respuesta al estrés en plantas, que pueden resumirse como se describe a continuación.

En primer lugar, ocurre el reconocimiento del estímulo. Esta recepción de la señal ocurre principalmente mediante la interacción de los patrones moleculares asociados al factor de estrés con proteínas cinasas similares a receptores transmembranales (RLKs y RLPs por sus denominaciones en inglés Receptor Like Kinases y Receptor Like Proteins) o por proteínas R que pueden estar localizadas en la membrana plasmática o en el citoplasma como NLRs (Nucleotide-binding leucine-rich repeat proteins). La posterior transducción de las señales ocurre a través de la activación de proteínas G, MAPKs (Mitogen activated protein kinases), flujos de iones como el sistema mensajero de Ca^{2+} y la activación de segundos mensajeros (cAMP, DAG, IP3) que permiten translocar la señal al núcleo celular en donde ocurren la transcripción y la traducción de la señal que finalmente permite la síntesis -en el ribosoma- de las enzimas relacionadas con las rutas biosintéticas de los metabolitos que protegerán a la planta del estresor al que fue expuesta o activarán otras vías de señalización, incluso en individuos cercanos.

El tipo de inmunidad que se desencadena en una planta depende del tipo de estímulo que recibe. El reconocimiento de un patrón molecular asociado a un organismo biótrofo -que coloniza al hospedero mientras vive- está relacionado con la resistencia sistémica adquirida SAR (Systemic Acquired Resistance) la cual se basa en el AS e involucra la activación de genes relacionados a la patogénesis. En contraste, cuando se presenta una infección por un necrótrofo -organismo que mata las células del hospedero- ocurre una respuesta llamada resistencia sistémica inducida (ISR) que está relacionada con el AJ y la fitohormona etileno (Et). Esta ruta se ha observado como respuesta al herbivorismo y tiene un efecto antagónico a la ruta del AS, por lo que incluso algunos patógenos como *Fusarium oxysporum* sintetizan sus propias enzimas que estimulan la ruta del AJ para disminuir la actividad de la SAR en las plantas que infectan (Bürger & Chory, 2019).

Las furanocumarinas -presentes en *A. graveolens* L.- son fitoalexinas que protegen a la planta en el caso de una infección por bacterias, hongos e insectos (Beier & Oertli, 1983) y su síntesis se estimula cuando la planta se expone a metil jasmonato

(MeJA) (Miksch & Boland, 1996). Mientras que los ftálidos, sintetizados por la ruta de los policétidos mediante la vía del acetato, han sido estimulados usando un MAMP proveniente de un hongo sin haberse descrito más respecto a su función en la defensa de la planta (Hagemeier et al., 1999).

Por su parte, los flavonoides como la apigenina y otros compuestos fenólicos de estructuras relacionadas están relacionados con la respuesta a estrés oxidativo en las plantas (Winkel-Shirley, 2002) el cual puede ocurrir debido a la exposición a una variedad de estímulos que pueden generar especies reactivas de oxígeno, de las cuales podemos resaltar al anión superóxido (O_2^-) y al peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Éste último además ha demostrado funcionar en la célula como molécula de comunicación entre las distintas rutas de señalización (Neill et al, 2002).

La estrecha relación que existe entre los fenilpropanoides y la respuesta a distintas condiciones de estrés hace que aquellas enzimas que determinan su síntesis sean determinantes en el estudio de la defensa de las plantas. La ruta de los fenilpropanoides depende de la acción de varias enzimas como la fenilalanina-amonio liasa (PAL), chalcona sintasa (CHS), chalcona isomerasa (CHI), dihidroflavonol reductasa (DHFR), las flavonas sintasas (FS) y la antocianidina sintasa (ANS).

VII. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

a. Hipótesis

La aplicación exógena de ácido salicílico, quitosano y peróxido de hidrógeno estimulará una respuesta defensiva dependiente de la dosis, incrementando la actividad antioxidante y la concentración de metabolitos bioactivos, como ftálidos y compuestos fenólicos, en las hojas, tallos y provocando cambios en la germinación de las semillas de apio (*A. graveolens* L.) en contraste con un control de agua destilada.

b. Objetivo general

Analizar la respuesta fisiológica de las plantas y semillas de apio (*A. graveolens* L.) inducida por los elicitores ácido salicílico, quitosano y peróxido de hidrógeno.

c. Objetivos particulares

- Determinar el efecto de la aplicación de los elicitores ácido salicílico, quitosano y peróxido de hidrógeno en la germinación de las semillas de apio.
- Evaluar los cambios fenotípicos en las plántulas de semillas de apio elicidadas con ácido salicílico, quitosano y peróxido de hidrógeno.
- Analizar la respuesta metabólica de las plantas y las semillas de apio inducida por los elicitores ácido salicílico, quitosano y peróxido de hidrógeno.
- Cuantificar los cambios en la actividad antioxidante de las plantas y las semillas de apio provocados por los elicitores ácido salicílico, quitosano y peróxido de hidrógeno.

VIII. METODOLOGÍA

a. Establecimiento de las condiciones experimentales y obtención de material vegetal

En esta primera etapa buscamos las condiciones óptimas para las pruebas con la finalidad de homogeneizar las unidades experimentales y asegurar la mínima participación de variables distintas a las estudiadas en el modelo propuesto.

La primera parte consistió en remodelar el invernadero experimental, localizado en el Campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro en el municipio de El Marqués, Querétaro (20°42'19" N 100°15'32" W) a una altitud de 1921 msnm. El invernadero, que posee una estructura de acero galvanizado, se cubrió con plástico

lechoso de calibre 720 y se reinstaló la cobertura del suelo (ground cover) para evitar el crecimiento de maleza (figura 5).



Figura 5. Invernadero experimental 4 en la Facultad de Ingeniería de la UAQ Campus Amazcala acondicionado para las pruebas.

Las caras este y sur del invernadero fueron cubiertas con malla antiáfidos con el fin de controlar la temperatura dentro del invernadero, y se hizo un seguimiento de las variaciones de temperatura y humedad del espacio en el que se cultivaron las plántulas en dos períodos experimentales. Las mediciones se realizaron con un Data Logger Marca: Elitech, Modelo: GSP-6.

El primer periodo experimental corresponde al seguimiento de las plántulas del experimento de elicitación de semillas, mientras que el segundo corresponde al experimento de elicitación en plantas. El reporte general de condiciones ambientales que se registraron en dichos periodos experimentales se muestra en la tabla 1.

La radiación solar se controló mediante la colocación de una malla sombra del 50 % en la mitad este del invernadero y los fotoperiodos se mantuvieron naturales. La siembra se realizó en charolas de polipropileno sin cavidades sobre una mezcla de peatmoss y vermiculita 4:1 que se mantuvieron dentro de la cámara de germinación hasta la emergencia de las plántulas y posteriormente se colocaron a temperatura ambiente bajo un domo de policarbonato hasta su trasplante. El trasplante, a los

25 días después de la emergencia de la plántula, se realizó en charolas de 6 cavidades, cada una de 7 cm de diámetro y 10 cm de altura con una mezcla de suelo peatmoss : perlita (3:1 v/v). La fertilización se realizó mediante el riego con 1,25 g/L de la solución nutritiva para hidroponía adquirida de Hidroshiwa 10:8:18 (2-3 mS/cm; pH 5,5-6,5) (Hidroshiwa SA de CV, Querétaro, Qro. México).

Tabla 1. Condiciones de temperatura y humedad dentro del invernadero durante el periodo de las pruebas.

VARIABLES DE CONTROL: TEMPERATURA Y HUMEDAD

| Reporte General: condiciones del invernadero | | | |
|---|------------|------------|----------|
| | Inicio | Final | Total |
| Período 1 ¹ | 19/11/2021 | 02/03/2021 | 103 d |
| | Mínimo | Máximo | Promedio |
| Temperatura (°C) | -1,7 | 40,1 | 15,6 |
| Humedad (%) | 17 | 99,9 | 71,4 |
| Período 2 ¹ | 15/06/2022 | 20/08/2022 | 67 d |
| | Mínimo | Máximo | Promedio |
| Temperatura (°C) | 8,6 | 38,5 | 21,9 |
| Humedad (%) | 29,1 | 99,8 | 67,45 |

¹Los periodos corresponden a los experimentos de plántulas de semillas elicadas (1) y de elicitación de plantas (2) respectivamente.

El sistema de cultivo, como se observa en la figura 6, se colocó elevado para evitar contaminación, incidencia de plagas y facilitar la colocación de la malla antiheladas entre el 27 de diciembre y el 10 de enero en el primer período experimental.

El riego se realizó por inmersión permitiendo una aeración completa de las raíces cada 24 horas para evitar ahogamiento y pudrición mediante la reducción del volumen de riego cada tercer día.



Figura 6. Charola de germinación, transplante y sistema de cultivo final.

b. Diseño y aplicación de tratamientos

i. Experimento de elicitación de semillas

Para este experimento y con base en los resultados de las pruebas piloto (no incluidos en este reporte) se decidió probar únicamente los elicitors ácido salicílico y quitosano para permitir un análisis más minucioso de la relación entre dosis y respuesta de las semillas de apio al peróxido de hidrógeno en un proyecto derivado de éste. La aplicación de tratamientos en semillas se realizó con un diseño completamente al azar. La unidad experimental consistió en 4 g de semillas adquiridas comercialmente en La Semillería (Querétaro) las cuales se lavaron y desinfectaron con una solución al 0,5 % (w/v) de hipoclorito de sodio y se enjuagaron tres veces con agua destilada. Posteriormente cada muestra se sumergió en 50 mL de uno de siete tratamientos: tres concentraciones distintas de ácido salicílico (0,1, 1 y 10 mM) y quitosano (15, 1000 y 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o agua destilada como tratamiento control. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Después de 72 h, una parte del material vegetal se congeló en flash en sobres de aluminio usando nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C , una segunda parte se utilizó para las pruebas de germinación y la última se colocó en charolas de germinación para el seguimiento del crecimiento de las plántulas.

La mitad del material vegetal congelado se sometió a los análisis de actividad enzimática y la otra mitad se deshidrató en una liofilizadora (FreeZone 4.5,

Lanconco) y se molió finamente con un molino eléctrico (Krupps, GX4100). El polvo de las semillas resultante fue utilizado en las determinaciones de metabolitos y actividad antioxidante no enzimática.

ii. Experimento de elicitación de plantas

Para esta parte del estudio se probaron diez tratamientos, tres concentraciones de cada elicitor: ácido salicílico (0,1, 1 y 10 mM), peróxido de hidrógeno (2, 20 y 200 mM), quitosano (15, 1000 y 1500 µg/mL) y un tratamiento control de agua destilada. La unidad experimental consistió en 3 plantas y cada tratamiento se aplicó por sextuplicado, teniéndose un total de 180 plantas en un arreglo de bloques completos al azar dentro del invernadero descrito en la sección a. de esta metodología. La aplicación de los elicitores y el tratamiento control se realizó por aspersion en la parte aérea (Vazquez-Hernandez et al., 2019) en una sola aplicación en el día 60 después del trasplante. Veinticuatro (24) horas más tarde se realizó el muestreo, para el cual, los tallos y hojas de las plantas recolectadas de cada tratamiento fueron congeladas en nitrógeno líquido para evitar la actividad enzimática posterior a la cosecha. Una parte del material vegetal fue almacenado a -20 °C para el análisis de actividad enzimática, mientras que, el resto fue liofilizado (FreeZone 4.5, Lanconco) y molido con un molino para material vegetal (Krupps, GX4100).

c. Porcentaje de germinación, tiempo de germinación (t₅₀) y desarrollo de las plántulas.

i. Germinación

Se colocaron tres repeticiones de cincuenta semillas de apio en papel de filtro de 100 % celulosa dentro de placas Petri de poliestireno de 5 cm con 1,5 mL de agua destilada. Las placas se sellaron con Parafilm® y se colocaron dentro de una cámara de crecimiento a 15 °C sin exposición a la luz. Las semillas germinadas se contaron diariamente. Se consideró que había germinación cuando una radícula >2 mm era visible en un estereoscopio. El recuento se detuvo cuando no había semillas recién germinadas después de dos registros. Se cuantificó el porcentaje total de

germinación y los datos obtenidos de los conteos se modelaron mediante una función de regresión exponencial. Los resultados se expresaron como el tiempo para que se produzca el 50 % de germinación (t_{50}), según lo propuesto por Soltani et al. (2015).

ii. Desarrollo de las plántulas

Las semillas restantes se distribuyeron en bandejas de germinación que contenían una mezcla homogénea de musgo de turba y vermiculita (7:3 v/v). Las bandejas se mantuvieron a 15 °C sin luz hasta la germinación. Al comienzo de la fase de emergencia de las plántulas, la temperatura se fijó en 18 °C con un periodo de luz de 16 h hasta que todas las plántulas emergidas tuvieron cotiledones extendidos. Las plántulas se sometieron a un periodo de aclimatación de 10 días en condiciones de invernadero a una temperatura media de 20 °C durante el día y 12 °C durante la noche. El sustrato de cultivo se mantuvo hidratado mediante riego cada 24 horas. Tras el periodo de aclimatación, seis repeticiones de cada unidad experimental de 6 plántulas por tratamiento y el correspondiente grupo de control se trasladaron a macetas de polietileno de 7 cm de ancho y 10 cm de profundidad que contenían la mezcla peatmoss y perlita (7:3 v/v) y se trasladaron al invernadero en una disposición de bloques aleatorizados. El sistema de cultivo se regó con la solución hidropónica de Hidroshiwa. Las plántulas se cosecharon, midieron y pesaron 60 días después del trasplante (tallos y raíces). El material cosechado se secó a temperatura ambiente durante 10 días y, a continuación, se registró el peso seco (tallos y raíces).

d. Determinación del perfil metabólico

i. Experimento de elicitación de semillas

Las muestras del polvo de las semillas (100 mg) se extrajeron con diclorometano usando la proporción 1:10 (w/v) en tubos de microcentrífuga de 2 mL de capacidad. Los tubos se agitaron en un vortex por 1 min y posteriormente se colocaron dentro de un baño ultrasónico (40 kHz) durante 15 minutos. Posteriormente, los tubos se colocaron de manera horizontal y se mantuvieron en agitación sobre una placa de

agitación orbital Stuart modelo SSL1 a una velocidad de 140 rpm durante 2,5 h. Cada extracto se centrifugó a 12000 rpm (15120 RCF) por 10 min y se tomaron alícuotas de 100 µL del sobrenadante que se evaporaron hasta sequedad en un evaporador speedvac SAVANT SC210A de Thermo Scientific a temperatura ambiente. Los extractos se almacenaron cubiertos de la luz y en congelación a -20 °C hasta su análisis para evitar descomposición térmica e interacciones con la luz ambiental.

A los extractos obtenidos se les determinaron los perfiles metabólicos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS). Para el análisis de las semillas, la alícuota se resuspendió en 150 µL de agente derivatizante N,O-bis(trimetilsilyl)-trifluoroacetamida (BSTFA) + 1% trimetilclorosilano (TMCS) y se hizo pasar por una membrana de PTFE (politetrafluoroetileno) de 0,45 µm antes de la inyección. Los extractos se analizaron en un cromatógrafo de gases Agilent 5975 equipado acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolo (Agilent, 5975C) con la energía de ionización establecida en 70 eV y en un rango de detección de masa/carga (m/z) de 50–700. Para la separación se utilizó una columna HP-5MS (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm). La rampa de calentamiento se estableció de acuerdo con lo reportado por Figueroa-Pérez et al., 2014 y puede observarse en la Tabla 2. La temperatura del inyector fue 250 °C y el volumen de inyección de 1 µL. El gas de acarreo utilizado fue helio (He) con un flujo de 1 mL/min-y una relación de split de 1:10. Los espectros de masa de los picos obtenidos en el cromatograma fueron comparados con la base de datos del NIST Standard Reference Database (NIST 11) y se identificaron tentativamente los metabolitos en los extractos que presentaron un puntaje de similitud de al menos 80. El contenido relativo de cada compuesto se calculó utilizando el porcentaje de área bajo la curva con respecto al área total de los picos del cromatograma y el 3-n-butiltálido se cuantificó mediante el método de estándar externo realizando una curva de calibración de 5 puntos. El Senkyunólido A se semi cuantificó utilizando el factor de respuesta del estándar de 3-n-butiltálido (Malm et al., 2021).

Tabla 2. Condiciones de temperatura del horno para el análisis por CG-MS de las semillas.

| Tiempo (min) | Temperatura final (°C) | Tasa de aumento (°C/min) |
|--------------|------------------------|--------------------------|
| 1 | 100 | |
| - | 220 | 6 |
| 1,23 | 220 | - |
| - | 290 | 10 |
| - | 310 | 40 |
| 7,5 | 310 | - |

ii. Experimento de elicitación de plantas

La extracción y análisis del perfil metabólico del experimento de elicitación de plantas se realizó como parte de una estancia de investigación en las instalaciones del departamento de *Food Science and Human Nutrition* en la *University of Florida at Gainesville* (Universidad de Florida) durante el semestre 2022-2.

Para el análisis del experimento de elicitación de plantas, el polvo de las plantas (100 mg) se extrajo con diclorometano usando la proporción 1:10 (w/v) en tubos de microcentrífuga de 2 mL de capacidad. Los tubos se agitaron en un vortex por 1 min y posteriormente se colocaron dentro de un baño ultrasónico (Bransonic 2800, Emerson; 50-60 kHz) durante 15 minutos. Posteriormente, los tubos se colocaron de manera horizontal y se mantuvieron protegidos de la luz y en agitación sobre una placa de agitación (Compact Rocker; Labnet) a la velocidad nivel 6 durante 2,5 h. Cada extracto se centrifugó a 15120 RCF por 10 min a 4 °C y el sobrenadante se filtró a través de una membrana de PTFE de 0,45 µm. Una alícuota de 100 µL evaporó hasta sequedad en una campana de extracción a temperatura ambiente y el extracto seco se almacenó cubierto de la luz y en congelación a -20 °C hasta su análisis para evitar descomposición térmica e interacciones con la luz ambiental.

Los extractos se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS). La alícuota se resuspendió en 100 µL de agente derivatizante N,O-bis(trimetilsilyl)-trifluoroacetamida (BSTFA) + 1% trimetilclorosilano (TMCS). Los extractos se analizaron en un cromatógrafo de gases

Agilent 5975 equipado acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolo (Shimadzu GCMS-QP2010 SE) con la energía de ionización establecida en 70 eV y en un rango de detección de masa/carga (m/z) de 35–700. Para la separación se utilizó una columna ZB-5MS Plus (30 m × 0,25 mm, 0,25 μ m). La rampa de calentamiento puede observarse en la Tabla 3. La temperatura del inyector fue 250 °C y el volumen de inyección de 5 μ L. La inyección se realizó de manera manual. El gas de acarreo utilizado fue helio (He) con un flujo de 1,34 mL/min-y una relación de split de 1:5. Los espectros de masa de los picos obtenidos en el cromatograma fueron comparados con la base de datos del NIST Standard Reference Database (NIST 14) para identificar tentativamente los metabolitos en los extractos. El contenido relativo de cada compuesto se calculó utilizando el porcentaje de área bajo la curva con respecto al área total de los picos integrados del cromatograma.

Tabla 3. Condiciones de temperatura del horno para el análisis por CG-MS de las plantas.

| Tiempo de temperatura fija (min) | Temperatura final (°C) | Tasa de aumento (°C/min) |
|---|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 1 | 100 | - |
| - | 220 | 6 |
| 1 | 220 | - |
| - | 290 | 10 |
| 1,2 | 290 | - |
| - | 310 | 40 |
| 7,5 | 310 | - |

e. Cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales

Se transfirieron muestras liofilizadas y molidas de los experimentos de elicitación de semillas y plantas (0,05 y 0,025 g respectivamente) a tubos de centrífuga de 1,5 mL. Las muestras se extrajeron con etanol al 80 % (1 mL) en una placa de agitación orbital a 25°C durante 2 horas y se centrifugaron a 11050 RCF durante 10 min. El sobrenadante se utilizó para los ensayos de contenido total de compuestos fenólicos y contenido de flavonoides.

El contenido total de compuestos fenólicos de las muestras de semillas y plantas de apio se determinó según el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). Brevemente, se añadieron 25 μL del extracto etanólico diluido en 50 μL de agua a 37,6 μL de un reactivo Folin-Ciocalteu 1 M y 187,4 μL de una solución de carbonato sódico (5 %, p/v). Los tubos se dejaron a temperatura ambiente durante 120 min y se midieron las absorbancias a 765 nm. Los resultados se expresan en miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de semilla (mg/g).

El contenido de flavonoides se determinó según el método descrito por Oomah et al., 2005 con modificaciones como se describe a continuación. Alícuotas de 20 μL de cada extracto se diluyeron con 210 μL de agua. Las absorbancias se midieron a 404 nm tras la adición de 20 μL de 10 g/L de 2-aminoetil-difenilborato y se compararon con una curva estándar de rutina. Los resultados se expresan como miligramos de equivalentes de rutina por gramo de semilla (mg/g).

Preparación de las curvas estándar de ácido gálico y rutina

Se preparó una solución stock 0,1 mg/mL disolviendo 10 mg de ácido gálico o rutina en 10 mL de metanol y diluyendo 1 mL de esta solución en 10 mL de metanol. Luego se prepararon diluciones con rangos de concentración entre 0,0035 mg/mL y 0,1391 mg/mL para realizar las curvas de calibración.

f. Determinación de la actividad antioxidante no enzimática

Se analizó la capacidad antioxidante de los extractos de semillas y plantas mediante los métodos del DPPH (1-1-difenil-2-picrilhidrazilo) y del ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).

Para ello, se transfirieron muestras liofilizadas y molidas de semillas (0,05 g) a tubos de centrifuga de 1,5 mL. Las muestras se extrajeron con metanol (1 mL) en un agitador orbital a 25°C durante 2 horas. A continuación, los extractos se centrifugaron a 11050 RCF durante 10 minutos. El sobrenadante se utilizó para los ensayos.

La actividad antioxidante se determinó al someterse los extractos a los ensayos de reducción de los radicales DPPH y ABTS utilizando Trolox como estándar (Brand-Williams et al., 1995; Re et al., 1999). Para los ensayos, se mezclaron por separado 20 μ L de extracto etanólico, Trolox, a diferentes concentraciones, o metanol (control) con 230 μ L de solución 0,15 mM de DPPH o reactivo ABTS en los pozos de una microplaca de polietileno de 96 pozos. Las muestras se mantuvieron en la oscuridad durante 10 minutos y, a continuación, se midió la absorbancia frente al blanco (metanol) a 517 nm y 734 nm, respectivamente. Ambos ensayos se realizaron cuatro veces por cada repetición y los resultados se expresaron como mg/g de la actividad antioxidante equivalente de Trolox.

Preparación de las soluciones patrón

Para la preparación de la solución de radical DPPH se disolvieron 2 mg de DPPH Sigma Aldrich, en 100 mL de metanol grado analítico. La solución se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas en la oscuridad. Posteriormente fueron preparadas soluciones de trabajo hasta obtener una absorbancia de $0,750 \pm 0,030$ para todos los casos, a una longitud de onda de 517 nm.

La solución de ABTS se realizó en dos pasos. Primero, se disolvieron 19,2 mg de ABTS en un volumen final de 5 mL con agua destilada. Por otra parte, se preparó una solución que contuvo 189,2 mg de persulfato de potasio en un volumen final de 5 mL con agua destilada. Finalmente, se mezclaron 5 mL de la solución de ABTS y 88 μ L de persulfato de potasio en un recipiente protegido de la luz. Se dejó reposar entre 12-24 hrs a temperatura ambiente y se ajustó a una absorbancia de $0,7 \pm 0,020$ a 734 nm mezclando 500 μ L de la solución de ABTS con 20-25 mL de etanol al 96 %.

Para la preparación de la solución patrón de Trolox se preparó una solución stock 1 mM disolviendo 2,5 mg de Trolox en 10 mL de metanol. Luego se prepararon diluciones de concentraciones de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400 y 500 μ M con el fin de realizar la curva de calibración para ambos ensayos.

g. Determinación de la actividad enzimática.

i. Actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL)

La actividad PAL se analizó como la relación de conversión de L-fenilalanina en ácido trans-cinámico por el método de Dickerson et al. con algunas modificaciones. Un gramo (1 g) de cada muestra congelada se homogeneizó con nitrógeno líquido y se le agregó 1,5 mL de tampón borato trisódico 0,1 M en 2-mercaptoetanol al 0,1 % (v/v) (pH 8,8) a 4°C. El extracto se agitó en vórtex durante 2 min y luego se centrifugó a 13200 RCF durante 15 min. Se diluyó un volumen de 10 µL del sobrenadante (aproximadamente 0,02 unidades de enzima) con 10 µL de agua destilada y se añadió a 230 µL de tampón borato (pH 8,8) que contenía 10 mM de L-fenilalanina en microplacas de 96 pozos. La mezcla de reacción se incubó a 40 °C durante 60 min. Tras la incubación, la reacción se detuvo añadiendo 50 µL de HCl 1 N y se dejó durante 10 min. La absorbancia se midió a 290 y 310 nm, y los valores se compararon con una curva de calibración de ácido trans-cinámico de 7 puntos. Los resultados se expresaron como unidad/mg de proteína.

ii. Actividad de la catalasa (CAT)

La actividad de la catalasa se determinó según el método originalmente descrito por Aebi (1984) con algunas modificaciones. Las semillas se molieron minuciosamente con nitrógeno líquido, y luego 0,3 g de polvo se homogeneizaron en 2 mL de tampón Tris-HCl 100 mM que contenía 20 % (v/v) de glicerol, y 30 mM de 2-mercaptoetanol (pH 8). El homogeneizado se centrifugó durante 15 min a 13000 RCF a 4 °C y se añadieron 0,1 mL del sobrenadante (aproximadamente 0,01 unidades de enzima) a tubos de ensayo que contenían 2 mL de tampón fosfato acuoso 50 mM y 0,2 mL de H₂O₂ acuoso 100 mM. La disminución de la absorbancia de la mezcla de reacción se registró a 230 nm cada minuto durante 6 min. Una unidad de actividad CAT equivale a 1 µmol de H₂O₂ degradado en un minuto. Los resultados se expresaron como unidad/mg de proteína.

iii. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

La actividad SOD se determinó mediante un método modificado según Beauchamp y Fridovich. Las semillas tratadas se molieron minuciosamente con nitrógeno líquido y, a continuación, 0,3 g de polvo se homogeneizaron por separado en 2 mL de tampón fosfato acuoso 50 mM (pH 7,8). El homogeneizado se centrifugó durante 15 min a 13000 RCF a 4 °C, y 10 µL del sobrenadante (aproximadamente 0,01 unidades de enzima) se diluyeron en 20 µL de agua destilada y se añadieron a 270 µL de una mezcla de reacción acuosa que contenía tampón fosfato (50 mM), 0,01 mM de EDTA, 0,075 mM de cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT), 13 mM de metionina y 0,002 mM de riboflavina. A continuación, las muestras se expusieron a una luz blanca uniforme durante 20 minutos. La absorbancia se registró a 560 nm. Una unidad de SOD se expresó como la cantidad de proteína que provocaba una reducción del 50 % de NBT en la reacción, y la actividad enzimática se expresó como unidad/mg de proteína.

iv. Determinación de proteína

El contenido de proteínas se determinó para todos los extractos enzimáticos por el método de Bradford siguiendo las instrucciones del fabricante para el ensayo en microplaca (Bio-Rad). Brevemente, se tomaron alícuotas de 10 µL de los extractos y se colocaron en los pozos de una microplaca de 96 pozos. Se añadieron 200 µL de colorante diluido (50 % con agua destilada) y se dejaron reposar por 20 minutos a temperatura ambiente. Los ensayos se compararon contra una curva de calibración de albúmina bovina de 6 puntos entre 0,05 y 0,2 mg/mL. Se realizaron cuatro réplicas analíticas para todos los ensayos espectrofotométricos.

h. Análisis estadístico de los datos

Todos los datos en tablas y gráficos se muestran como el valor de la media \pm la desviación estándar. Los datos obtenidos de los conteos, determinaciones morfométricas, análisis químicos, el perfil metabólico, la cuantificación de metabolitos y las pruebas de actividad antioxidante enzimática y no enzimática, fueron sometidos a una prueba de normalidad, usando el estadístico de Saphiro-

Wilk ($p > 0,05$) y la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov ($p > 0,05$). La homogeneidad de las varianzas de los datos fue confirmada con una prueba de Levene ($p > 0,05$). Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una posterior prueba de medias de Tukey para determinar la significancia de las diferencias entre tratamientos ($p < 0,05$). Los datos de porcentaje fueron sometidos a una transformación de arcoseno para su análisis estadístico. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software STATGRAPHICS Centurion 18 (18.1.12).

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a. Experimento de elicitación de semillas

i. Germinación

Los cambios fisiológicos inducidos por la elicitación tuvieron un efecto considerable en la función germinativa de las semillas. La germinación es un proceso crucial en el ciclo vital de una planta, por lo que también es un factor determinante para la productividad de los sistemas agrícolas. En particular, las semillas de apio son latentes, lo que provoca que la emergencia de las plántulas se disperse en el tiempo y que el porcentaje global de germinación sea bajo, lo que representa una limitación en la productividad del cultivo. Recientemente, se ha descubierto que la latencia de las semillas de apio depende de las condiciones lumínicas y está regulada no sólo por las giberelinas sino también por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), una molécula señalizadora durante las respuestas al estrés, por lo que su función podría relacionarse con la aplicación de elicitores (Li et al., 2022). En este estudio, los elicitores en las dosis más altas (10 mM de ácido salicílico y 1500 $\mu\text{g/mL}$ de

quitosano) disminuyeron significativamente el porcentaje de germinación (figura 7) y aumentaron el tiempo de germinación (figura 9), lo cual es un indicador de estrés.

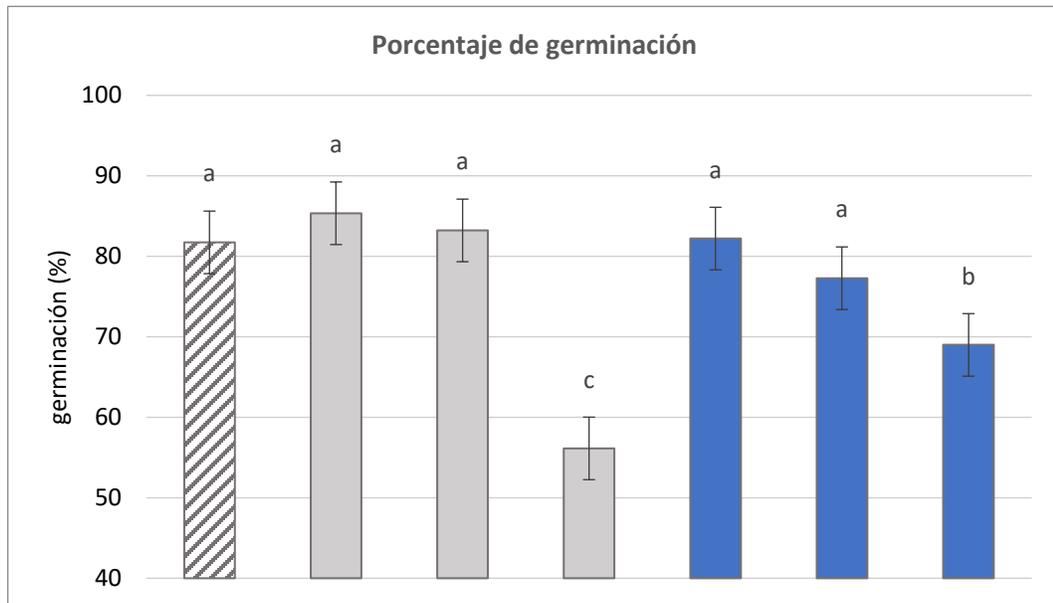


Figura 7. Porcentaje de germinación de las semillas elicadas.

Los tratamientos consistieron en distintas concentraciones de estresores (AS= ácido salicílico, Q=quitosano). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p < 0,05$).

En la figura 8 pueden observarse las curvas de germinación en el tiempo para los distintos tratamientos, entre las que destaca que, para el quitosano en la dosis más alta, la tasa de germinación es muy similar a la del ácido salicílico 10 mM antes del día 15, pero a partir de ese momento ambas se separan, aumentando en el caso del quitosano. Esto puede deberse a que un número mayor de semillas en el caso del ácido salicílico 10 mM murieron, mientras que, las tratadas con quitosano en 1500 µg/mL sólo se vieron afectadas, pero finalmente lograron superar la toxicidad provocada por el tratamiento.

Por el contrario, las dosis 0,1 y 1 mM de ácido salicílico y 15 µg/mL de quitosano redujeron significativamente el tiempo de germinación; lo que indica que dichas dosis en las condiciones evaluadas se encuentran dentro del rango de eustrés para las semillas de apio.

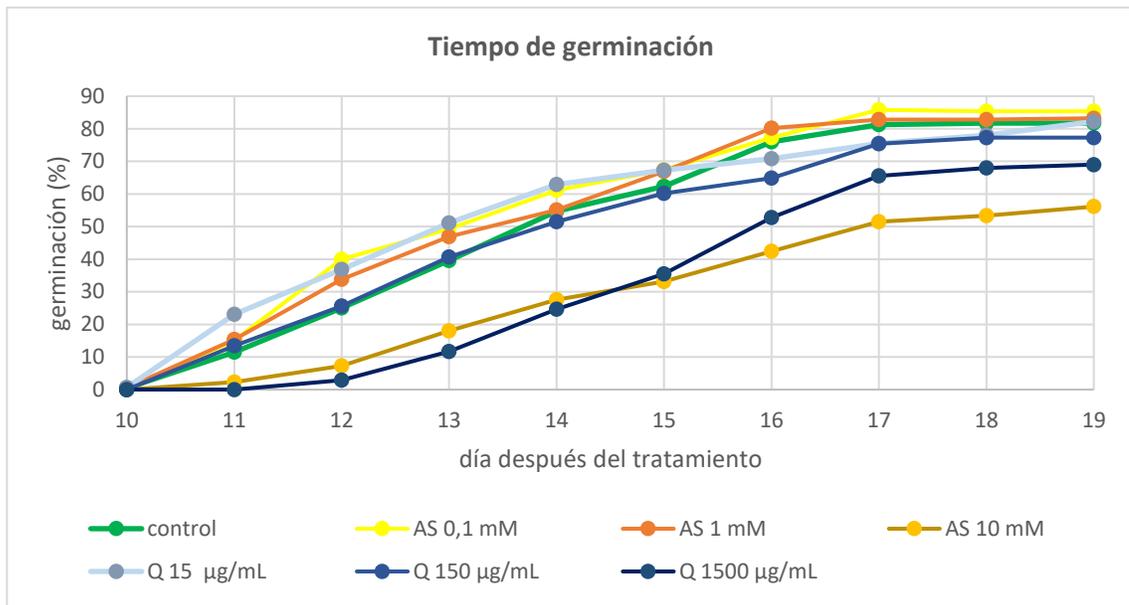


Figura 8. Curvas de germinación de las semillas de apio elicidadas. Los tratamientos consistieron en distintas concentraciones de estresores (AS=ácido salicílico, Q=quitosano). Los puntos representan las medias de tres repeticiones. La unidad experimental consistió en cincuenta semillas.

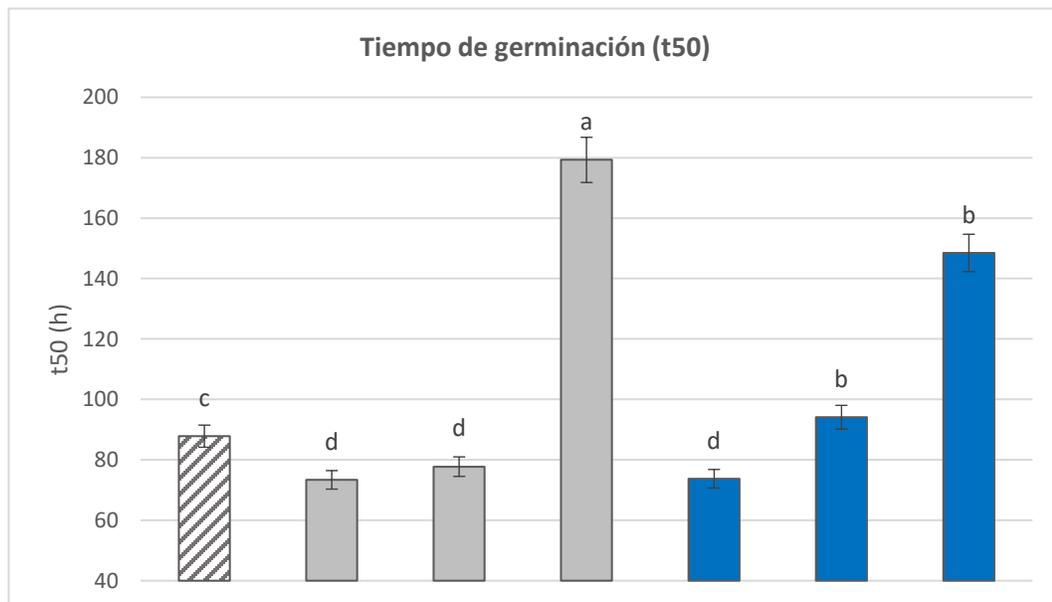


Figura 9. Tiempo de germinación (t50) de las semillas de apio elicidadas. Los tratamientos consistieron en las distintas concentraciones de estresores (AS=ácido salicílico, Q=quitosano). Los valores se calcularon a partir de las curvas de germinación mostradas en la Figura 8. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p < 0,05$).

Es posible que lo anterior se deba a que, en estas dosis bajas, el ácido salicílico y el quitosano estimulen las vías de señalización de la giberelina y el H₂O₂ en las semillas de apio, ya que se han descrito interacciones similares para estos elicitores en otros modelos vegetales, como es el caso del chile (*Capsicum annum*) (Mejía-Teniente et al., 2013).

ii. Desarrollo de las plántulas de semillas elicitadas

Los mecanismos fisiológicos de defensa desencadenados por la elicitación de semillas influyeron de forma persistente en el desarrollo de las plántulas, y pudieron observarse diferencias significativas en las plántulas incluso 60 días después del trasplante. Para ilustrar tales diferencias, la figura 10 muestra una plántula representativa proveniente de cada tratamiento. Resulta destacable que para el tratamiento de ácido salicílico 10 mM el desarrollo del tallo se vio limitado significativamente mientras que, para la raíz, la diferencia con respecto al control no fue significativa. Estos resultados pueden corroborarse con los resultados del análisis estadístico de los datos de peso seco y peso fresco que se presentan más adelante en esta sección (figura 12).

Los cambios fenotípicos son especialmente relevantes en el apio por ser un cultivo apreciado principalmente por sus pecíolos y para el que las variables de crecimiento, como la longitud y el peso, están estrechamente relacionadas con el rendimiento y el valor comercial. El uso de estresores puede estar asociado con la bioestimulación que suele observarse como un mayor crecimiento o un incremento de alguna otra característica fenotípica. Sin embargo, el estrés también puede asociarse a una elicitación, observada en cambios metabólicos que pueden llevar a una acumulación de metabolitos bioactivos o un aumento en la tolerancia a otros tipos de estrés. Por esta razón, un tratamiento de elicitación podría ajustarse a distintos objetivos de productividad, lo que dificulta aún más la generalización de las dosis para su aplicación en distintos cultivos.

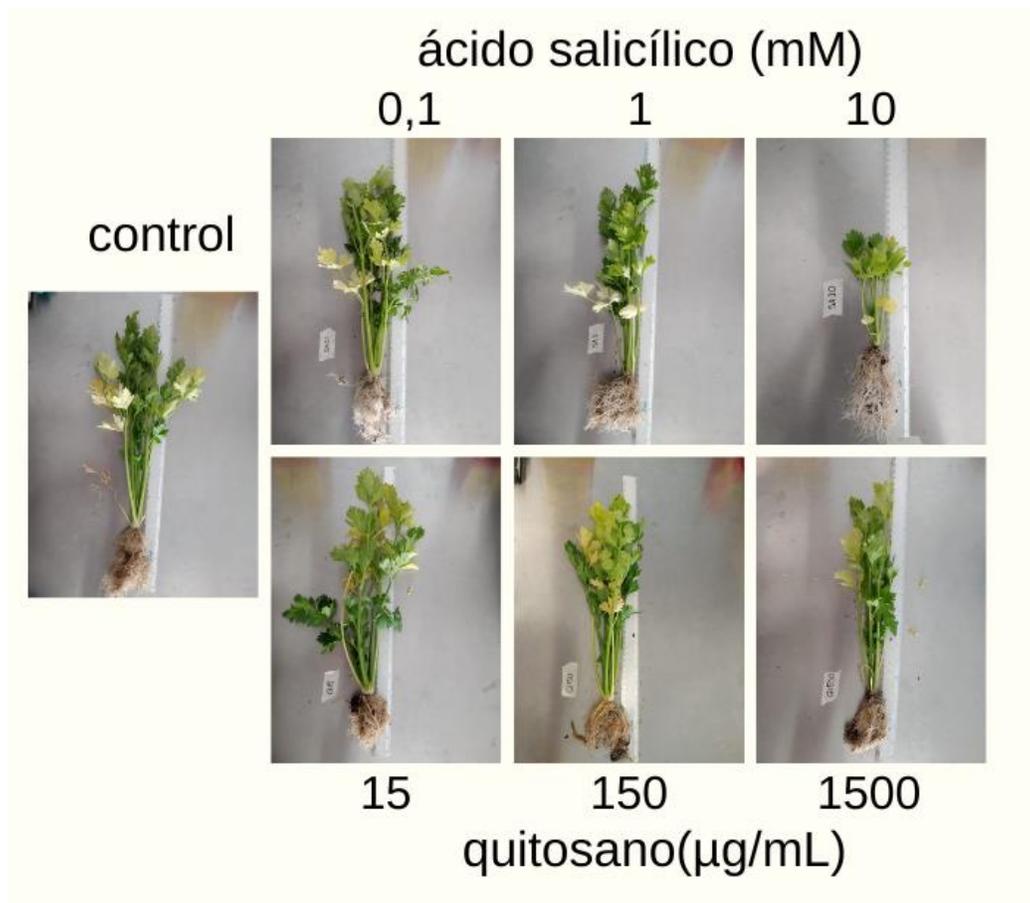


Figura 10. Fotografías representativas del crecimiento de las plántulas provenientes de semillas elicidadas.

La figura 11 muestra los efectos de la elicitación en el diámetro y la altura de las plántulas provenientes de las semillas tratadas. Las plántulas que emergieron de semillas tratadas con ácido salicílico 10 mM presentaron una altura y un diámetro reducidos, así como un menor peso fresco y seco de raíces y partes aéreas. En cambio, las semillas tratadas con 150 µg/mL de quitosano dieron lugar a plántulas más altas y pesadas que las tratadas con cualquier dosis de ácido salicílico, sin revelar diferencias significativas en comparación con el grupo de control (figura 12).

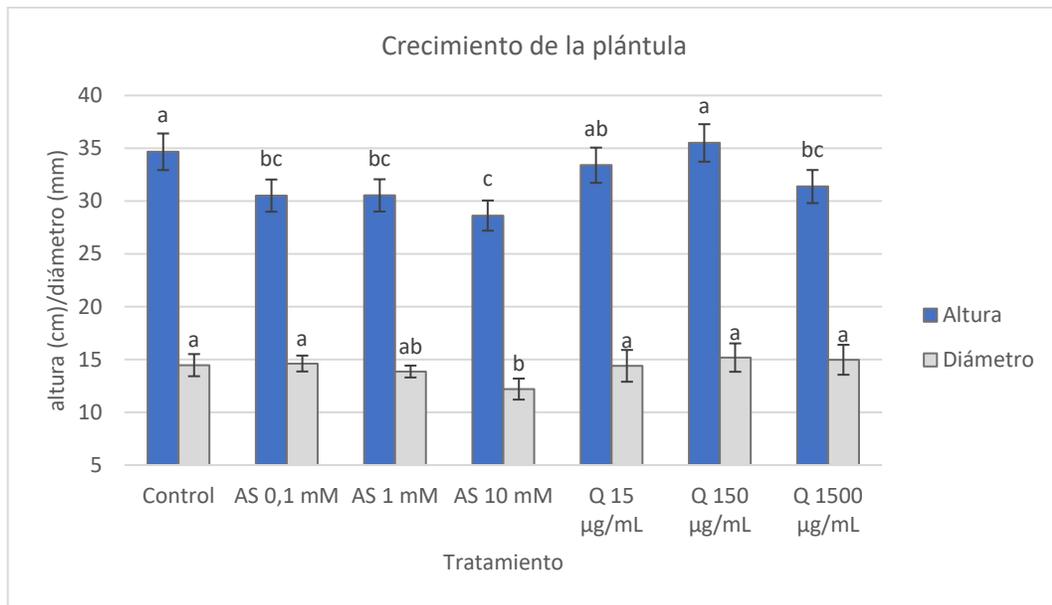


Figura 11. Crecimiento de las plántulas provenientes de semillas elicidadas. Los tratamientos consistieron en distintas dosis de estresores (AS=ácido salicílico, Q=quitosano). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p < 0,05$).

Estos resultados significan que el quitosano aplicado a las semillas en 15 $\mu\text{g/mL}$ reduce significativamente el tiempo de germinación sin afectar el desarrollo normal de las plántulas, por lo que puede afirmarse que tiene un efecto bioestimulante.

Los efectos observados para las dos dosis menores de quitosano (15 y 150 $\mu\text{g/mL}$) pueden ser ventajosos para el desarrollo de tecnologías de *priming* destinadas a estimular el metabolismo pregerminativo para mejorar la uniformidad de la germinación en campo y, al mismo tiempo, proteger las plántulas de condiciones adicionales de estrés. Sin embargo, aún es necesario describir el efecto de estas dosis en la tolerancia cruzada al estrés de las semillas de apio. Por lo anterior, una perspectiva a futuro es probar los tratamientos que generen mayores diferencias en modelos de sequía, el tipo de estrés que mayores pérdidas económicas representa para el cultivo de apio (Davis et al., 2022).

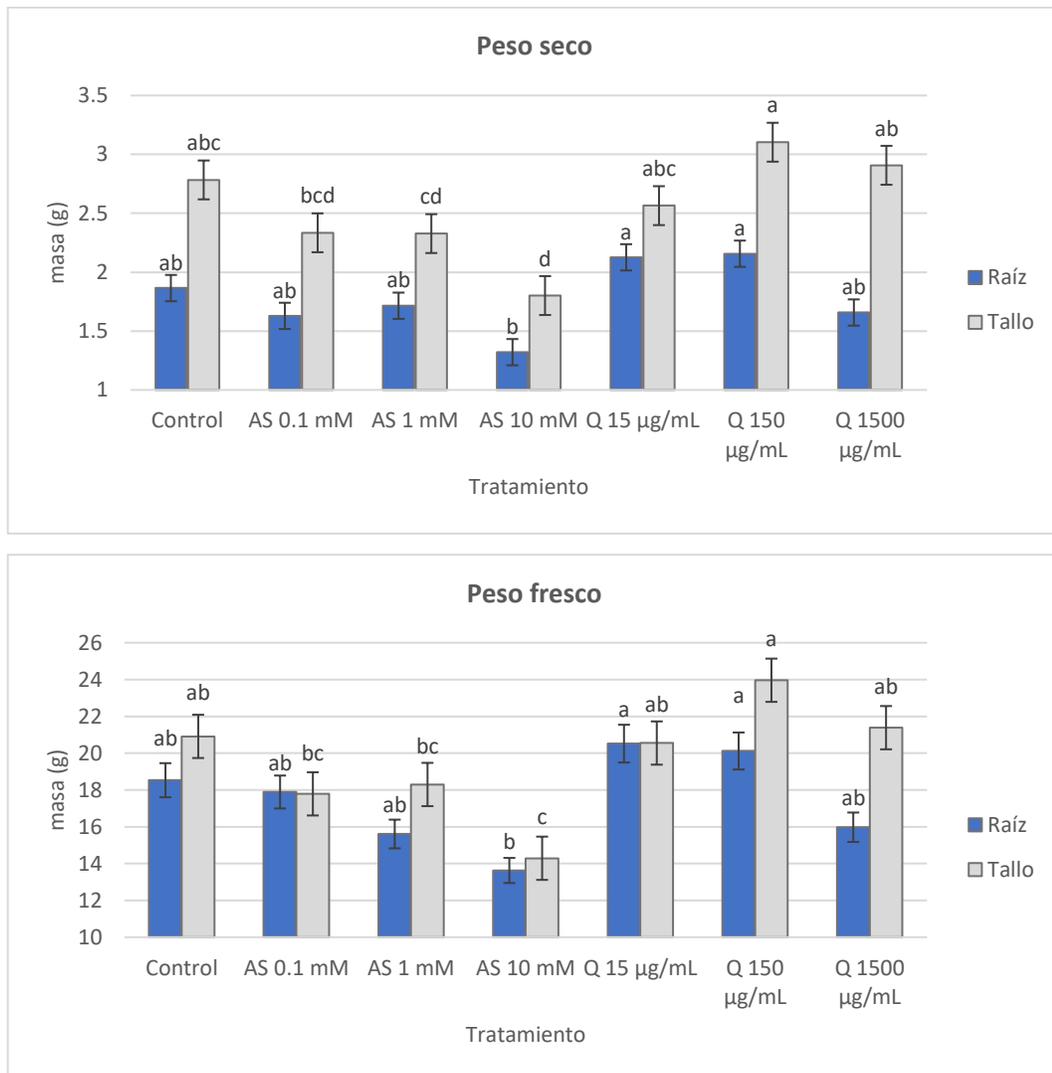


Figura 12. Peso seco y fresco de las plántulas provenientes de semillas elicidadas. Los tratamientos consistieron en distintas dosis de estresores (AS=ácido salicílico, Q=quitosano). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p < 0,05$).

iii. Perfil metabólico y cuantificación de ftálicos

Las semillas de apio poseen un alto contenido de ftálicos bioactivos que las hace importantes para la industria alimentaria y justifica su consumo como fitomedicamento. Los hallazgos de este trabajo demuestran que la elicitación estimula la biosíntesis de ftálicos en las semillas de apio, lo que refuerza el papel defensivo y la relevancia de estos metabolitos en la respuesta inmune de esta

especie. Se ha reportado que ftálicos poseen actividad antibacteriana, antifúngica e insecticida y que su acumulación correlaciona con la infección microbiana en *Angelica sinensis* (Oliv.) (Feng et al., 2021). Además, se descubrió que el Senkyunólido A (sedanenólido) es el metabolito principal responsable de la resistencia planta-huésped en el apio, un proceso en el que tanto el ácido salicílico como el quitosano desempeñan un papel importante. A partir de la cuantificación de 3-n-butilftálico y la semi-cuantificación de Senkyunólido A, con los resultados de este trabajo observamos que la acumulación de ftálicos en las semillas de apio tras la elicitación con ácido salicílico se comporta de una manera no lineal que corresponde a la curva de la hormesis. Es decir, existe una acumulación de igual magnitud ante la elicitación con la dosis más baja y alta probadas (0,1 y 10 mM), que no se observa para la dosis media (1 mM). Las diferencias fueron estadísticamente significativas para todos los tratamientos en comparación con el grupo de control, excepto para el 3-n-butilftálico tras el tratamiento con ácido salicílico 1 mM (figura 13). El contenido de Senkyunólido A aumentó al doble y el de 3-n-butilftálico fue 1,3 veces mayor que el del control tras los tratamientos con 0,1 y 10 mM de ácido salicílico.

Aumentar el contenido de ftálicos en las semillas de apio puede ser ventajoso para sus aplicaciones medicinales, ya que numerosos reportes atribuyen las principales actividades neuroprotectoras, antiinflamatorias, antimicrobianas y repelentes de insectos del extracto de semillas de apio al senkyunólido A y al 3-n-butilftálico (Marco-Contelles & Zhang, 2020; Powanda et al., 2015). Además, un mayor contenido en ftálicos también supone una ventaja para la comercialización de productos derivados de las semillas de apio, ya que estos metabolitos se utilizan como compuestos marcadores para estandarizar fitomedicamentos hipotensores producidos a partir de semillas de apio (Powanda et al., 2015). Por otra parte, el aumento en el contenido de ftálicos para la dosis de quitosano 15 µg/mL también es evidencia que contribuye a la afirmación de que este elicitor en tal dosis presenta

un efecto bioestimulante en *A. graveolens*, en el que tanto la defensa como el metabolismo primario se encuentran activados.

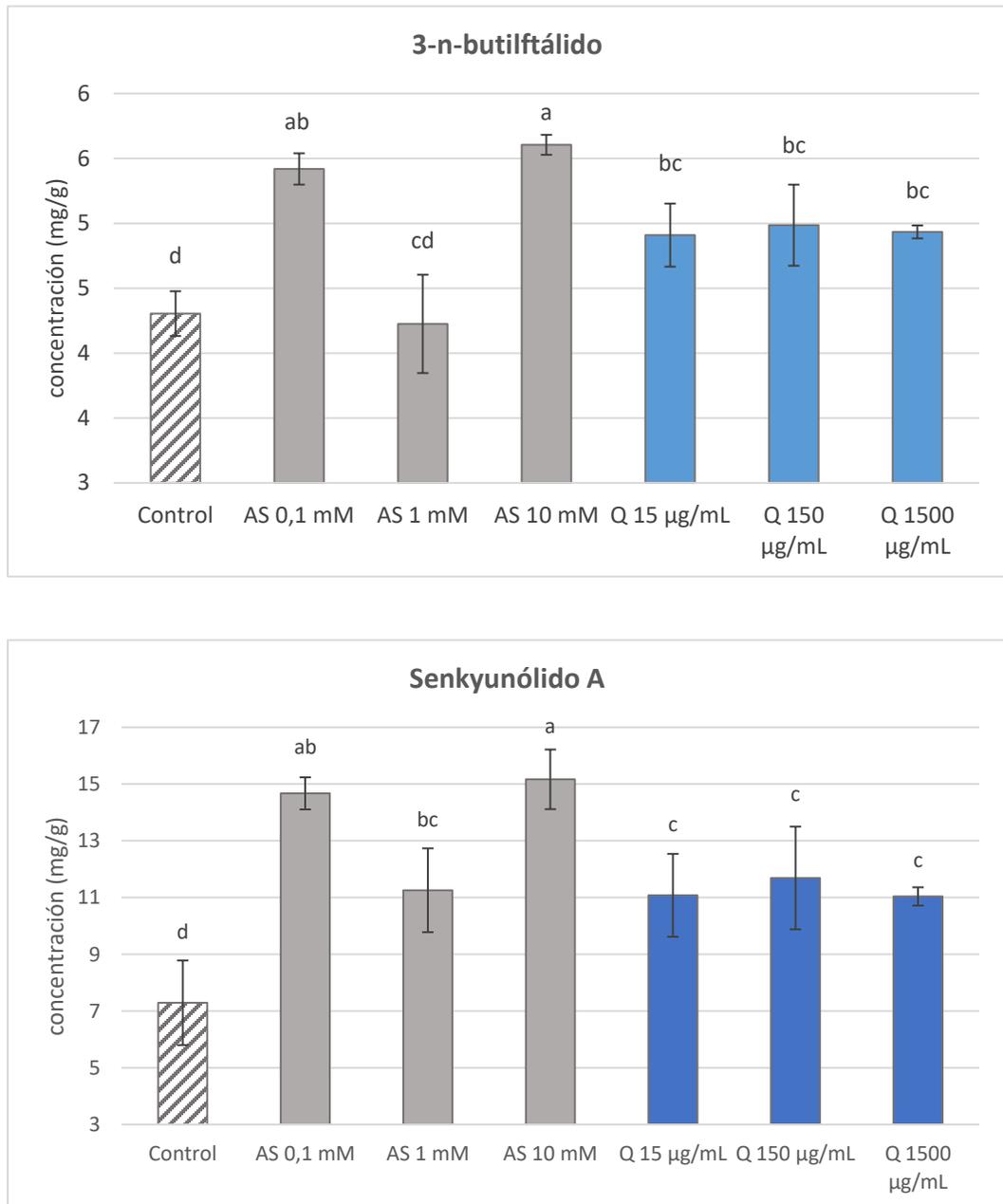


Figura 13. Contenido de ftálidos en semillas elicidadas.

Los tratamientos consistieron en distintas dosis de estresores (AS=ácido salicílico, Q=qitosano). La cuantificación se realizó por CG-MS. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p < 0,05$)

En la figura 14 se muestra el cromatograma de una de las muestras analizadas. En dicha figura, los picos que corresponden al senkyunólido A, el ftárido más abundante, y al 3-n-butilftárido se encuentran indicados con una flecha. La identificación del 3-n-butilftárido se realizó a partir de la comparación del tiempo de retención con la de un estándar analítico. A partir de la integración de los picos de los cromatogramas, se construyó el perfil de metabolitos del extracto diclorometano de las semillas para los grupos de tratamiento y control, el cual se muestra en la tabla 4. Un total de 25 compuestos fueron detectados en las muestras, de los cuales doce (12) pudieron identificarse tentativamente con una puntuación de similitud mayor al >86 % cuando se compararon con la base de datos de metabolitos NIST 11.

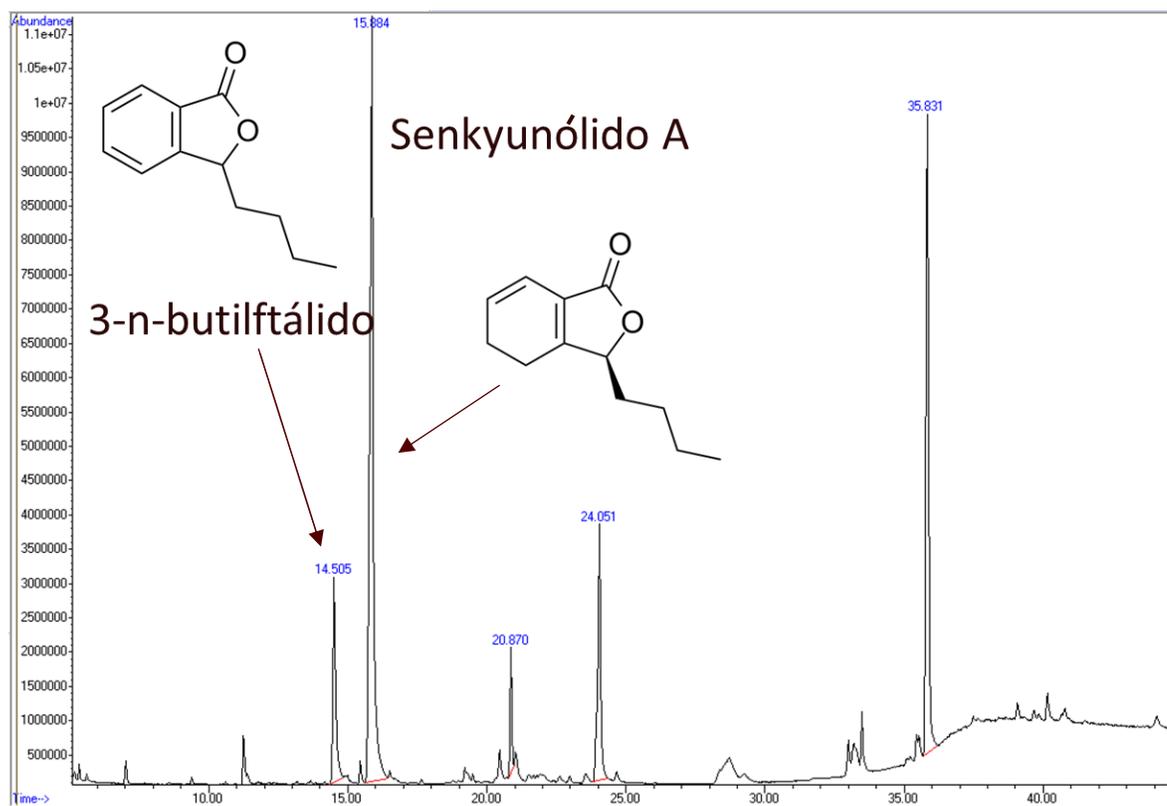


Figura 14. Cromatograma obtenido por CG-MS del extracto de diclorometano de las semillas elicidadas.

De los metabolitos presentes en las muestras, los ftáridos, los ácidos grasos y los sesquiterpenos son los grupos funcionales mayoritarios. Los compuestos más

abundantes en los extractos fueron el senkyunólido A, el estearato de glicerilo, un monoéster del ácido esteárico y el 3-n-butilftálido, que representaron una media del $45,9\pm 4,5$ %, $13,7\pm 6,1$ % y $10,3\pm 0,6$ %, respectivamente, del área porcentual total de todas las muestras. De la composición encontrada en este estudio, destaca el elevado porcentaje de ftálidos ($56,2\pm 5,1$ %) y la ausencia de monoterpenos. Lo anterior porque se han reportado perfiles metabólicos obtenidos por CG-MS en los que el limoneno, el α -terpineno y el α -tujeno conforman alrededor del 20 % de los extractos de semillas de apio obtenido por métodos de extracción por solventes (Sellami et al., 2012) y por destilación (Dąbrowska et al., 2020; Teixeira et al., 2013). El porcentaje de rendimiento de ftálidos obtenido en esta investigación indica que la extracción con diclorometano asistida por ultrasonido es un método eficiente para obtener una fracción enriquecida de ftálidos a partir de semillas de apio, en comparación con resultados obtenidos a partir de la extracción con otros solventes (Sellami et al., 2012).

Respecto a los sesquiterpenos, el perfil de metabolitos de las semillas también muestra la presencia de α - y β -selineno ($6,3\pm 2,1$ %), cuyas proporciones en las muestras variaron significativamente tras la elicitación. El contenido relativo de ambos sesquiterpenos aumentó en las semillas sumergidas en la solución de ácido salicílico 0,1 mM en comparación con el grupo de control. Cabe destacar que el aumento fue significativo con respecto al valor observado para el ácido salicílico 1 mM, pero no así con respecto al ácido salicílico 10 mM; es decir, la dosis más baja de ácido salicílico estimula la biosíntesis de terpenoides en una medida similar a la dosis más alta probada. Este aumento es relevante ya que los terpenoides son marcadores de calidad que contribuyen al perfil aromático y a la bioactividad de los extractos de semillas de apio (Kokotkiewicz, A. & Luczkiewicz, 2016).

Tabla 4. Perfil metabólico de las semillas de apio (*Apium graveolens* L.).

| clase | compuesto tentativo | TR ¹ (min) | área (%) | | | | | | |
|---------------|---------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| | | | control | ácido salicílico (mM) | | | quitosano (µg/mL) | | |
| | | | | 0,1 | 1 | 10 | 15 | 150 | 1500 |
| terpenoides | β-selineno | 11,2 | 3,4±1,9 ^b | 8,1±0,6 ^a | 3,0±1,2 ^b | 5,2±1,6 ^{ab} | 4,9±0,9 ^{ab} | 5,3±1,5 ^{ab} | 5,6±1,0 ^{ab} |
| | α-selineno | 11,4 | 0,9±0,6 ^b | 2,0±0,1 ^a | 0,6±0,3 ^b | 1,0±0,3 ^b | 1,3±0,3 ^{ab} | 1,5±0,3 ^{ab} | 1,3±0,2 ^{ab} |
| ftálicos | 3-n-butilftálico | 14,5 | 10,9±0,8 ^a | 10,0±2,4 ^a | 10,0±2,8 ^a | 11,1±1,9 ^a | 10,7±0,8 ^a | 9,8±0,2 ^a | 9,6±0,1 ^a |
| | senkyunólido A | 15,8 | 48,1±3,1 ^{bc} | 48,5±2,7 ^{ab} | 45,1±5,5 ^c | 55,3±2,2 ^a | 50,3±1,3 ^{abc} | 50,1±1,6 ^{abc} | 48,6±1,3 ^{bc} |
| ácidos grasos | ácido palmítico | 20,8 | 2,9±0,5 ^a | 1,4±0,3 ^c | 1,7±0,1 ^{bc} | 2,0±0,2 ^{abc} | 1,9±0,5 ^{bc} | 1,7±0,0 ^{bc} | 2,5±0,1 ^{ab} |
| | ácido petroselinico | 24,0 | 5,6±1,0 ^a | 3,4±0,7 ^b | 2,9±0,3 ^b | 4,3±0,6 ^{ab} | 4,3±0,3 ^{ab} | 4,3±0,5 ^{ab} | 5,4±0,1 ^a |
| | gliceril palmitato | 33,5 | 3,3±0,7 ^a | 1,3±0,9 ^{bc} | 3,8±0,4 ^a | 0,9±0,2 ^c | 2,0±0,4 ^{abc} | 2,5±0,8 ^{abc} | 2,9±0,2 ^{ab} |
| | gliceril estearato | 35,8 | 10,8±5,1 ^b | 8,5±0,2 ^b | 28,16±6,9 ^a | 8,6±1,3 ^{ab} | 14,2±3,5 ^b | 15,84±3,6 ^{ab} | 11,8±0,7 ^b |

¹ TR: tiempo de retención.

Los resultados muestran la media de tres repeticiones ± la desviación estándar. Diferentes letras indican una diferencia estadística significativa de acuerdo con una prueba de Tukey, $p < 0,05$.

Al mismo tiempo, el ácido salicílico 0,1 mM mostró la menor proporción de ácidos grasos. El contenido relativo de estos compuestos, que comprenden el $22,7 \pm 9,4$ % de la composición porcentual de todas las muestras, también fluctuó en respuesta a los tratamientos con elicitores. El ácido petroselínico representó una mayor proporción en las semillas tratadas con 1500 $\mu\text{g/mL}$ de quitosano en contraste con las dos dosis más bajas de ácido salicílico, mientras que no difirió significativamente del ácido salicílico 10 mM.

Del mismo modo, el contenido relativo de ácido palmítico es menor en las dos dosis más bajas de ácido salicílico y quitosano que en el grupo de control. En cambio, se observa lo contrario para los monoacilgliceroles. Estos metabolitos representan una mayor proporción del extracto obtenido del tratamiento con ácido salicílico 1 mM, la dosis intermedia, un comportamiento hormético que también puede observarse para el estearato de glicerilo en respuesta al quitosano. Nuestras observaciones sugieren que la activación de la vía biosintética de los ácidos grasos juega un papel relevante en la respuesta de las semillas de apio al estrés, tal y como se ha propuesto previamente para otros modelos vegetales (He & Ding, 2020). Sin embargo, la defensa no es la única función de los lípidos en las semillas, ya que está bien documentado que, durante la imbibición de las semillas, la disposición de los lípidos proporciona a las membranas la capacidad de ajustar su fluidez y permeabilidad, además de permitir las funciones propias de canales y receptores para iniciar la germinación (Doria et al., 2019). Por lo tanto, el futuro análisis cuantitativo adicional del perfil completo de ácidos grasos de las semillas de apio proporcionaría valiosas pruebas adicionales para apoyar y detallar esta observación.

iv. Compuestos fenólicos, flavonoides y actividad de PAL

La respuesta de las semillas de apio a la elicitación también pudo observarse en la acumulación de flavonoides. Los flavonoides son metabolitos especializados, y su papel en la fisiología de las semillas está bien documentado (Lepiniec et al., 2006). El contenido de flavonoides encontrado en este estudio varió de 12,25 a 15,44 mg/g de semillas secas, correspondiendo a lo que ha sido reportado en otros trabajos de

investigación (Nguyen Thu et al., 2021; Lin et al., 2007). Aquí, encontramos que el contenido de flavonoides aumentó significativamente en respuesta a 1 y 10 mM de ácido salicílico en comparación con el grupo control (figura 15). Sin embargo, la respuesta al estrés en las semillas de apio en las condiciones de este ensayo no se caracterizó por la acumulación de compuestos fenólicos, ya que el ensayo no reveló diferencias estadísticas entre los tratamientos para el contenido total de compuestos fenólicos (figura 15).

Por otra parte, la tendencia observada para el contenido de compuestos fenólicos está respaldada por los resultados relativos a la PAL y a las actividades antioxidantes no enzimáticas. La PAL cataliza la transformación de L-fenilalanina en ácido trans-cinámico en el primer paso de la vía de los fenilpropanoides. De ahí que su activación se correlacione positivamente con la biosíntesis de compuestos fenólicos. Nuestros resultados muestran que no existían diferencias estadísticas significativas para la actividad PAL entre los tratamientos y el grupo de control (figura 16). Esta observación podría estar relacionada con el hecho de que la PAL se activa normalmente en las semillas durante las primeras etapas de la germinación para producir tanto ácidos fenólicos libres como compuestos fenólicos estructurales unidos a las matrices de las paredes celulares (Cho & Lim, 2018). No obstante, una diferencia significativa se observó en la actividad enzimática para el ácido salicílico 10 mM en comparación con el ácido salicílico 1 mM, 15, y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de quitosano, lo que indica que las dosis angustiosas más altas fuerzan la biosíntesis de fenilpropanoides defensivos en las semillas de apio, probablemente debido a la acumulación de especies reactivas del oxígeno.

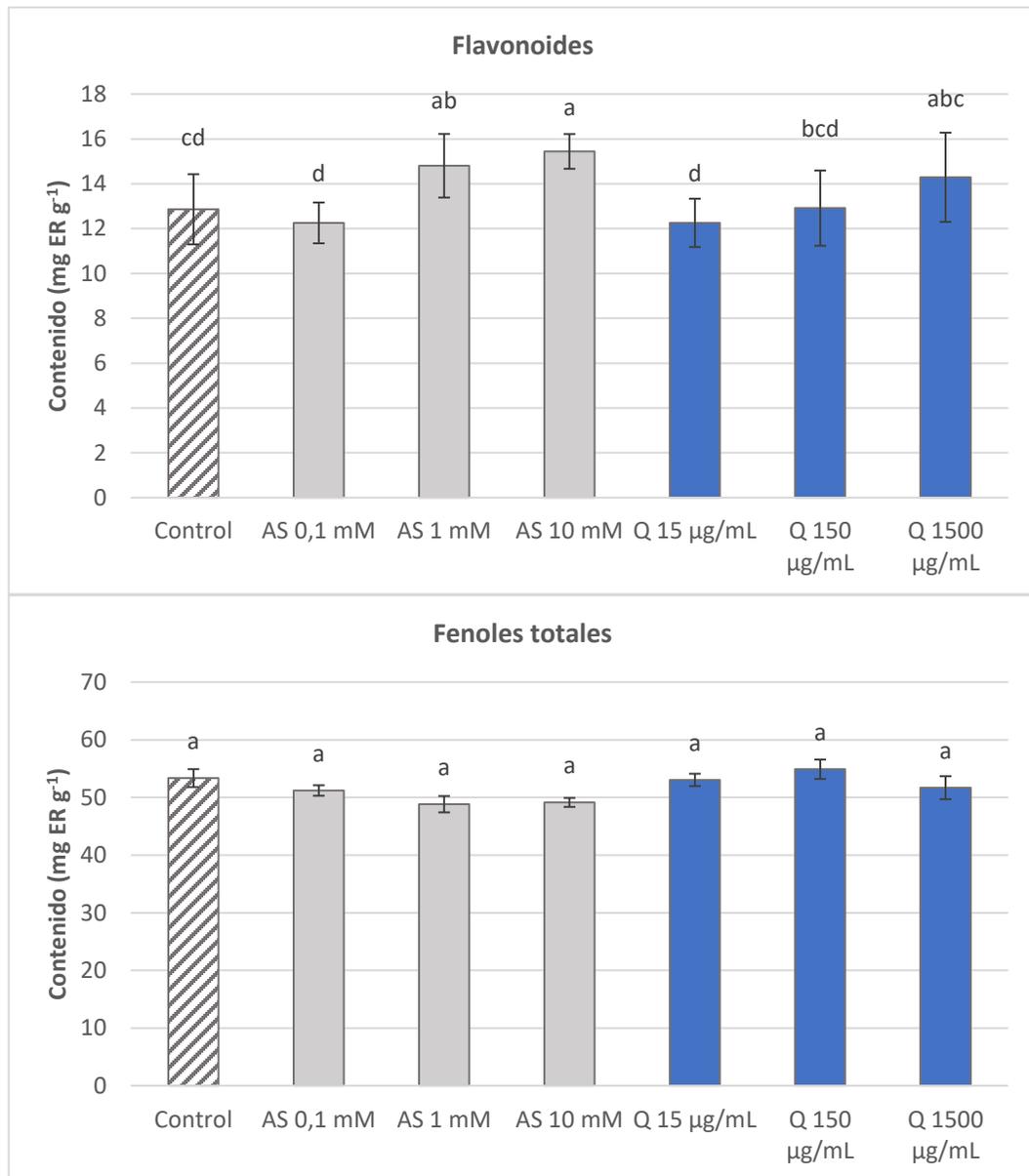


Figura 15. Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos totales en las semillas elicitadas.

Los tratamientos consistieron en distintas dosis de estresores (AS=ácido salicílico, Q=quitosano). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p < 0,05$).

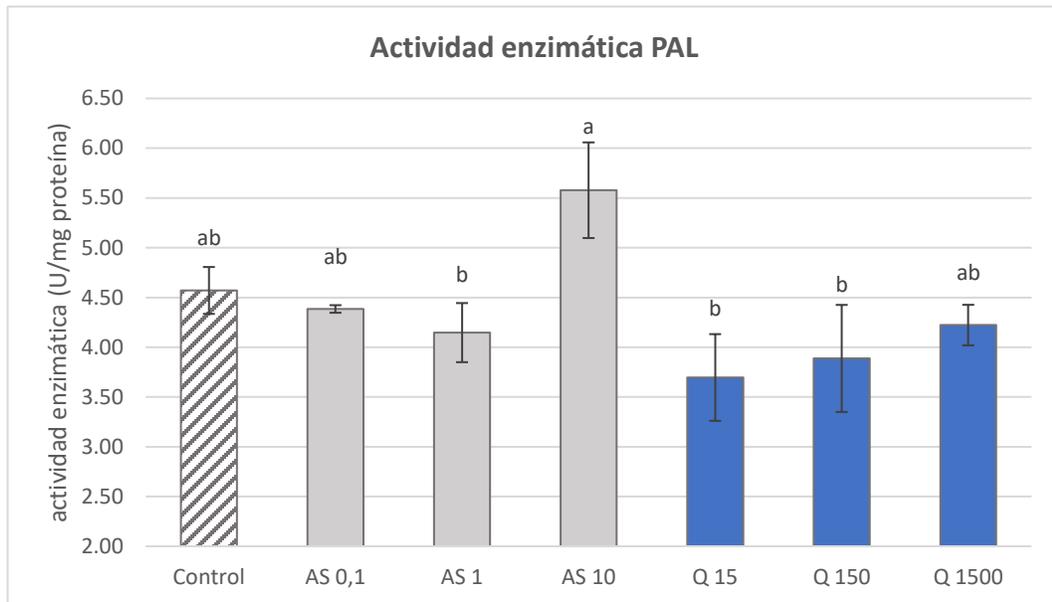


Figura 16. Actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL) en las semillas elicidadas. Los tratamientos consistieron en distintas dosis de estresores (AS=ácido salicílico, Q=quitosano). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p < 0,05$).

v. Actividad antioxidante no enzimática

La actividad antioxidante no enzimática no mostró, por un lado, diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos y el grupo de control en el ensayo DPPH. Por otro lado, la actividad antioxidante determinada mediante el método de ABTS fue significativamente mayor en magnitud y mostró un aumento en la dosis más alta de ácido salicílico (10 mM) (figura 17).

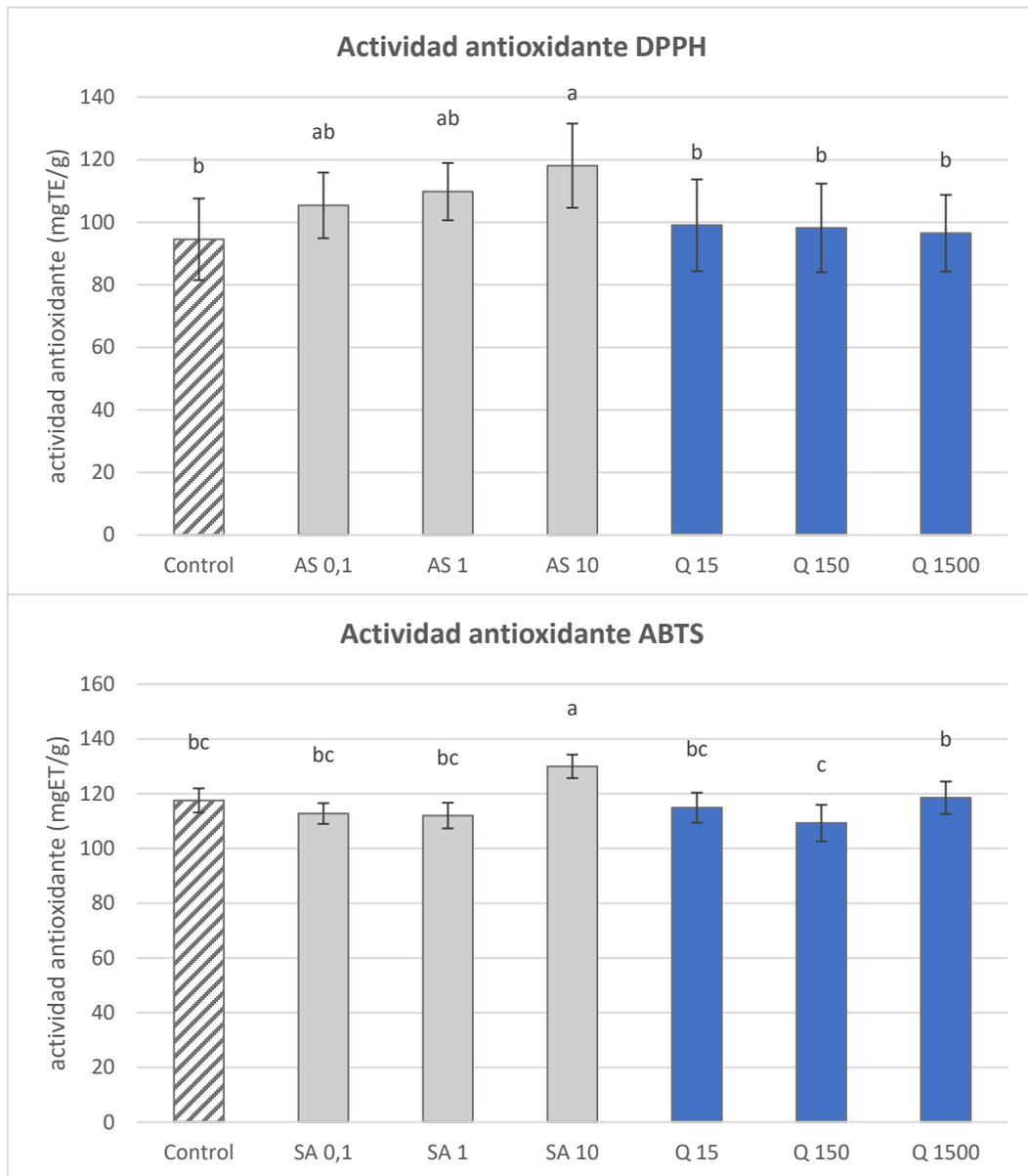


Figura 17. Actividad antioxidante de las semillas elicadas determinada mediante los ensayos de DPPH y ABTS.

Los tratamientos consistieron en distintas dosis de estresores (AS=ácido salicílico, Q=qitosano). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p < 0,05$).

Este contraste entre ensayos puede explicarse a través de los hallazgos de Floegel et al. (2011) considerando el alto contenido de compuestos medianamente polares en las semillas de apio que se observó en el análisis del perfil metabólico. Sus resultados sugieren que el ensayo ABTS refleja la actividad antioxidante ejercida

por mezclas complejas de metabolitos hidrofílicos y lipofílicos con mayor precisión que el ensayo DPPH, que correlaciona principalmente con el contenido de compuestos fenólicos y otros compuestos altamente hidrofílicos. Aunque la extracción para los ensayos de actividad antioxidante no enzimática se realiza con metanol, mientras que el perfil metabólico analizado fue el del extracto diclorometánico, existe un efecto de cosolvatación cuando una muestra compleja se extrae. Es decir, un solvente más polar es capaz de extraer metabolitos menos polares cuando estos se encuentran juntos en la muestra en comparación con un estado puro (Young et al., 2010).

vi. Actividad antioxidante enzimática

La elicitación también afectó significativamente a la actividad de las enzimas antioxidantes en las semillas de apio las cuales funcionan como marcadores de estrés oxidativo (figuras 18 y 19).

En el caso de la CAT (figura 18), la actividad enzimática aumentó tras la exposición a ácido salicílico 0,1 y 1 mM, mientras que se observó una disminución de la actividad para las dosis más altas del elicitor en comparación con las dosis medias (ácido salicílico 1 mM y 150 µg/mL de quitosano). La CAT es una enzima que cataliza la reducción de H₂O₂ a agua y oxígeno molecular para evitar el daño oxidativo, y tiene un papel activo en la respuesta de la planta al estrés (Mhamdi et al., 2010). Sin embargo, también se ha reportado una disminución en la actividad de la CAT bajo altos niveles de estrés oxidativo, por lo que su disminución puede ser considerada evidencia de estrés (Shim et al., 2003).

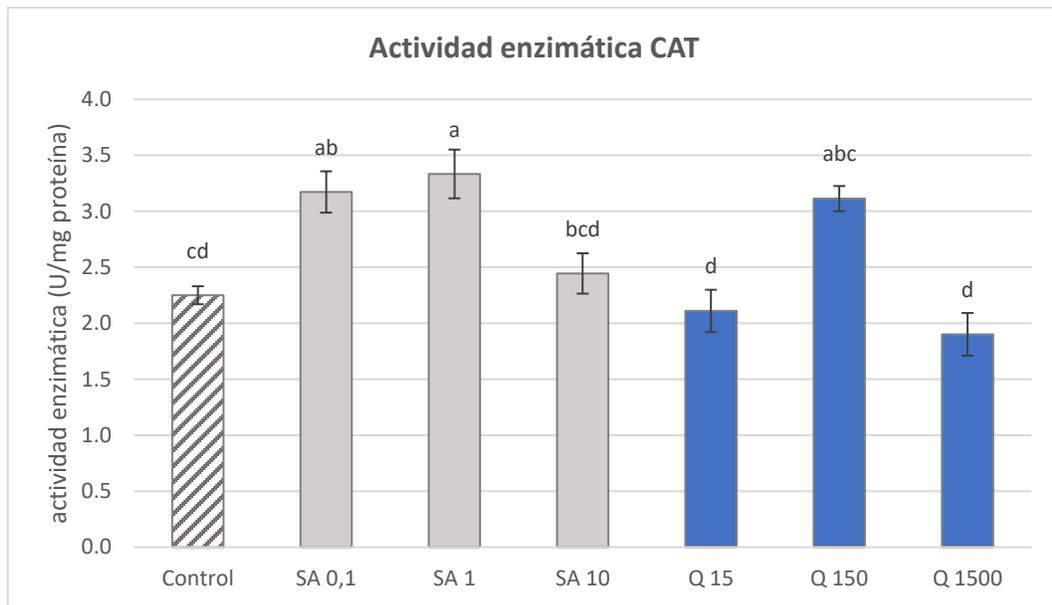


Figura 18. Actividad de la catalasa (CAT) en las semillas elicidadas.

Los tratamientos consistieron en distintas dosis de estresores (AS=ácido salicílico, Q=quitosano). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p < 0,05$).

El efecto distresante del ácido salicílico 10 mM fue reforzado por los resultados del ensayo de actividad SOD (figura 19), que también mostró un comportamiento no lineal con respecto a la dosis. En contraste con lo observado para la actividad de la CAT, en las semillas tratadas con ácido salicílico 10 mM se observó un aumento en la actividad de SOD en comparación con el grupo control y las dos dosis intermedias (ácido salicílico 1 mM y quitosano 150 $\mu\text{g/mL}$). Esta observación resulta esperada, pues un aumento en la actividad de SOD está relacionado con altos niveles de estrés, lo que también se ha descrito en otros cultivos modelo, como es el caso de *Brassica juncea* L., también llamada mostaza castaña o mostaza china (Gupta et al., 2009).

De hecho, la SOD es considerada la primera línea de defensa vegetal en contra del estrés en general y un componente principal del sistema que protege a las plantas del estrés oxidativo. Cuando las especies reactivas de oxígeno se acumulan, la SOD cataliza la dismutación del radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

y oxígeno (O_2), especies menos reactivas, disminuyendo así el posible daño a biomoléculas funcionales (Mishra et al., 2023).

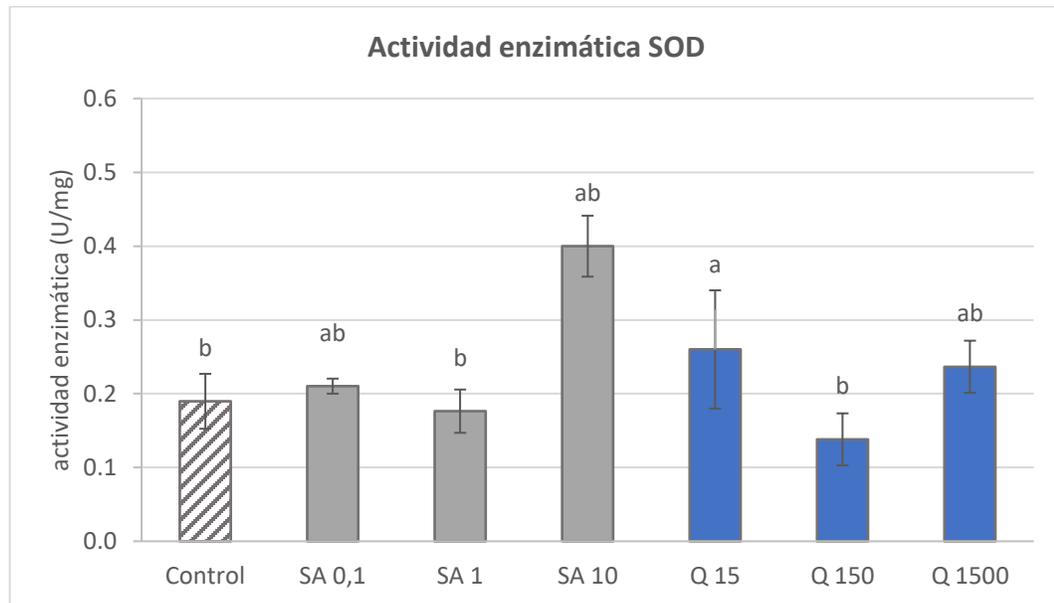


Figura 19. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en las semillas elicidadas. Los tratamientos consistieron en distintas dosis de estresores (AS=ácido salicílico, Q=quitosano). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p < 0,05$).

b. Experimento de elicitación de plantas

Existen muchas variables que moldean la respuesta fisiológica al estrés de los cultivos; por esa razón, el diseño de un protocolo de elicitación debe considerar cuidadosamente variables adicionales a la dosis como la etapa fenológica o de desarrollo en la que se encuentra la planta, el modo de aplicación de los elicitors y el objetivo de la elicitación (Godínez-Mendoza et al., 2023). En esta investigación, planteamos el objetivo de estimular la síntesis de metabolitos especializados para mejorar la calidad del apio y productos derivados de valor comercial, como sus semillas. Por ello, propusimos aplicar los tratamientos a plantas jóvenes, que suelen tener una respuesta fisiológica más rápida e intensa que las plantas adultas debido a que han experimentado menos eventos estresantes que aumenten su adaptabilidad (Patricia et al., 2016). La figura 20 muestra fotografías de las plantas ensayadas.

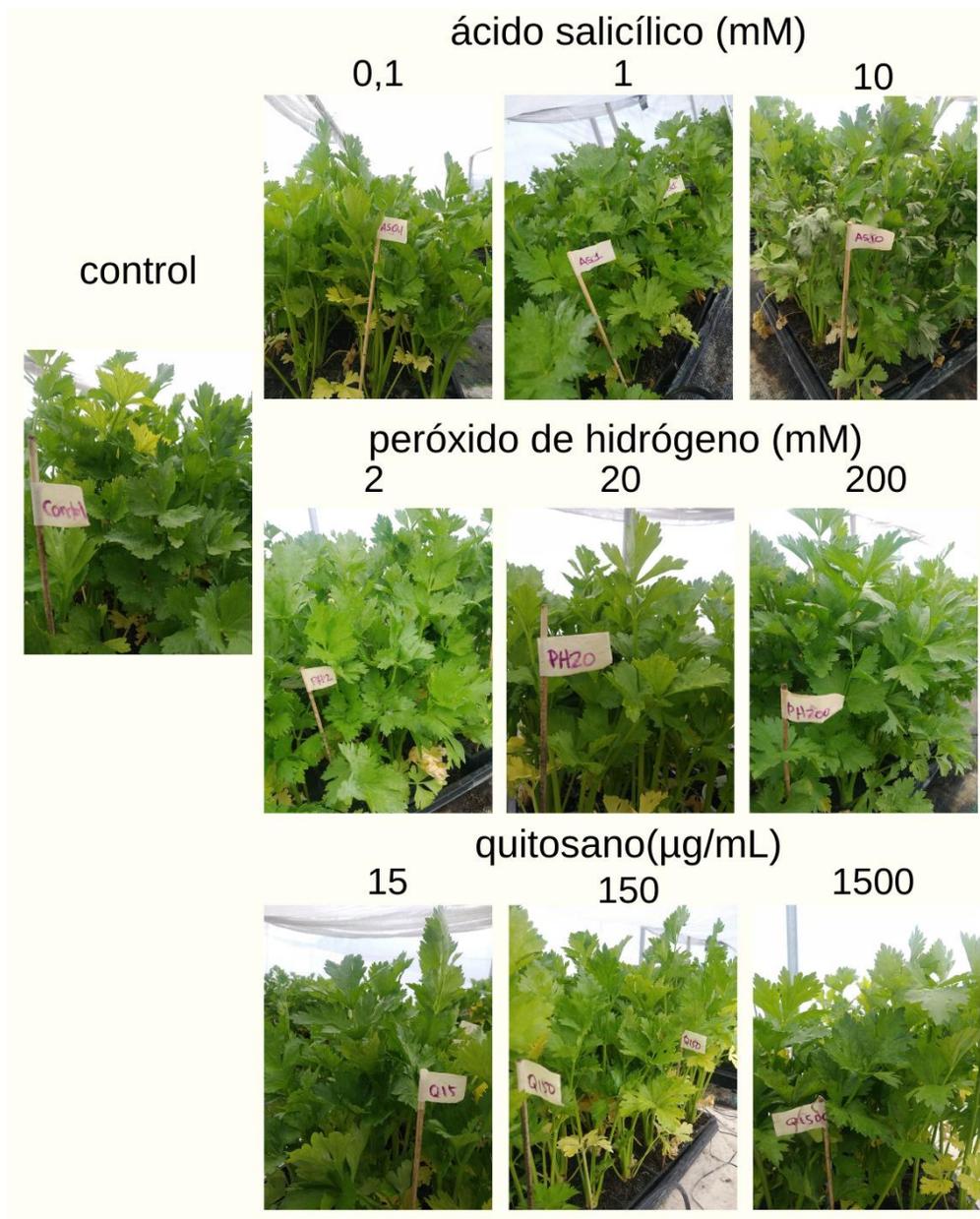


Figura 20. Aspecto de las plantas 24 horas después de la aplicación foliar exógena de los elicitores.

El apio es una planta bienal que alcanza la madurez aproximadamente a los 120 días después del transplante, fecha en la que usualmente es cosechada. Con ese antecedente se planteó llevar a cabo la aplicación de los tratamientos en el día 60 después del transplante y muestrear tanto tallos como hojas por ser las partes de la planta que más se consumen. El tiempo de muestreo fue establecido en 24 horas

después de la aplicación de los tratamientos con base en un experimento piloto realizado previamente (datos no reportados). En ese tiempo, los efectos de la aplicación de los elicitores pudieron observarse a simple vista (figura 20).

Aunque la presencia de algunas hojas descoloridas fue parte del aspecto normal de las plantas desde antes de la aplicación de los tratamientos, un color en general más claro pudo observarse para los tratamientos de quitosano 150 y 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el peróxido de hidrógeno en 20 y 200 mM. Sin embargo, el efecto más destacable fue provocado por el ácido salicílico 10 mM que provocó la muerte de varias hojas, las cuales pudieron apreciarse enrolladas, sin turgencia y de un color verde cenizo (figura 20). En el caso de los tratamientos con las menores dosis, ácido salicílico 0,1 mM, peróxido de hidrógeno 2 mM y quitosano 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no hubo diferencias observables con respecto al control.

i. Análisis de metabolitos de bajo peso molecular

El análisis de metabolitos permitió identificar 97 metabolitos, de los cuales 36 se encontraron presentes en todas las muestras. A partir de éstos se construyó el perfil metabólico que se presenta en la tabla 5. Los metabolitos mayoritarios identificados en el extracto de diclorometano pertenecen a los grupos químicos de los ácidos grasos, terpenoides, incluyendo fitoesteroles y ftálicos. En menor abundancia también se identificó la presencia de furanocumarinas, como el isobergaptén.

Las furanocumarinas son un grupo de metabolitos especializados que está directamente relacionado con el sistema defensivo de las plantas de la familia *Apiaceae* y se ha reportado que, en el apio, se acumulan diferencialmente en hojas y peciolo durante la interacción planta-patógeno (Stanley-Horn, 1999; Ataga et al., 1993). Las furanocumarinas también pueden hallarse en apio sano, aunque en menor concentración, entre 0,1 y 1 $\mu\text{g}/\text{g}$ de peso seco (Najda, et al., 2015). En este estudio, el isobergaptén, bergaptén y la isopimpinlina fueron identificados, sin embargo, solamente el primero pudo analizarse cuantitativamente por estar presente en todas las muestras, aunque no se observaron diferencias significativas

en su contenido debidas a los tratamientos. Además, cabe contrastar que ninguna furanocumarina fue detectada en las semillas de apio. Aunque las furanocumarinas presentan bioactividad, lo que les confiere un posible uso terapéutico contra una variedad de enfermedades (Krishnan, 2023), la estimulación de la biosíntesis de furanocumarinas puede resultar poco ventajosa en el caso del apio para consumo en fresco. Esto se debe a que estos compuestos pueden reaccionar con las bases nucleicas del ADN ante la radiación UV-A provocando fototoxicidad, lo que resulta en lesiones en la piel y un aumento del riesgo de padecer cáncer (Christensen, 2018). Por esa razón, una extracción y análisis selectivos de las furanocumarinas es indispensable para poder proponer un protocolo de elicitación seguro para *Apium graveolens* u otros cultivos de la familia Apiaceae.

Por su parte, los ftálidos también se presentaron en mayor variedad en las hojas y peciolo, aunque en menor abundancia que en las semillas. En total pudieron identificarse cinco ftálidos que se encontraron en todas las muestras: el 3-n-butilftálido, la lactona del ácido sedanónico, el senkyunólido A, también denominado sedanenólido, el 3-isobutiliden ftálido y el ligustílido. Todos estos ftálidos ya habían sido descritos en plantas de apio, y en este trabajo, solamente el 3-n-butilftálido y el senkyunólido A pudieron identificarse en las semillas. Resulta destacable que en ninguno de los dos análisis pudo identificarse el sedanólido (3-butil tetrahydroftálido) que se ha reportado como el ftálido mayoritario en otros casos (MacLeod et al., 1988). Sin embargo, existen dos posibles explicaciones a esta observación. En primer lugar, esto puede deberse al origen de las semillas y plantas analizadas, pues se ha demostrado que el perfil metabólico varía significativamente de acuerdo con su origen geográfico (Turner et al., 2021). Alternativamente, el sedanólido podría estar presente en forma de la lactona del ácido sedanónico, la cual se ha reportado que puede convertirse en sedanólido por tratamiento con base acuosa (Bjeldanes & Kim, 1976).

La aplicación de elicitores en las plantas provocó diferencias en el contenido de ftálido que se relacionaron con la dosis y el elicitor. El ácido salicílico 1 mM provocó

un aumento significativo con respecto al control en el contenido de 3-n-butilftálido, lactona del ácido sedanónico, senkyunólido A y el 3-isobutiliden ftálido mientras que, este efecto pudo ser observado solamente en la lactona del ácido sedanónico, el senkyunólido A y el 3 isobutiliden ftálido para el ácido salicílico 10 mM. Sin embargo, es posible que esta falta de correlación para el 3-n-butilftálido se deba al bajo contenido del metabolito que se encontró en los extractos, lo que limita su estimación. Por otra parte, el peróxido de hidrógeno en las tres concentraciones probadas (2, 20 y 200 mM) provocó un aumento significativo en el contenido de la lactona del ácido sedanónico y el senkyunólido A, que solamente pudo observarse con la dosis más alta (200 mM) en el caso de los ftálidos menos abundantes. Finalmente, el análisis también mostró que el quitosano en 150 µg/mL también estimuló la síntesis de los tres ftálidos más abundantes: la lactona del ácido sedanónico, el senkyunólido A y el 3 isobutiliden ftálido. La acumulación de ftálidos observada en este experimento de elicitación en plantas corresponde a los hallazgos reportados en el experimento de las semillas y refuerza la función de los ftálidos en la defensa vegetal.

En los extractos analizados se encontraron tres compuestos que pudieron identificarse como neofitadieno, lo que es correspondiente con la literatura, ya que este diterpeno acíclico es un alqueno que posee tres isómeros estructurales, los cuales se han reportado como metabolitos vegetales (Aboaba et al., 2016). En el apio, el contenido de neofitadieno ha sido relacionado con la actividad antifúngica del aceite esencial, lo que sugiere una función como fitoalexina, aunque la abundancia de este metabolito dependió en gran medida del origen geográfico de la muestra (Marongiu et al., 2013).

Tabla 5. Perfil metabólico de las plantas de apio (*Apium graveolens* L.) tras la elicitación.

| | | % área | | | | | | | | | |
|------------------------------------|-------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------|
| | | ácido salicílico (mM) | | | peróxido de hidrógeno (mM) | | | quitosano (µg/mL) | | | |
| | TR (min) | Control | 0,1 | 1 | 10 | 2 | 20 | 200 | 15 | 150 | 1500 |
| ácido málico | 10,6 | 0,3±0,2 ab | 0,2±0,1 ^b | 0,3±0,1 ab | 0,3±0,1 ab | 0,3±0,2 ab | 0,3±0,1 ab | 0,5±0,3 ^a | 0,5±0,2 ab | 0,4±0,1 ab | 0,4±0,2 ab |
| 3-n-butiltálido | 14,0 | 0,1±0,0 ^{bc} | 0,1±0 ^c | 0,2±0,1 ^a | 0,2±0,1 abc | 0,1±0,1 abc | 0,1±0,1 abc | 0,2±0,1 ^a | 0,1±0,1 abc | 0,1±0,1 abc | 0,1±0,0 abc |
| lactona del ácido sedanónico | 14,5 | 0,1±0,1 ^d | 0,2±0,1 bcd | 0,5±0,3 ^a | 0,3±0,1 abc | 0,2±0,1 abc | 0,2±0,3 ab | 0,4±0,2 abc | 0,3±0,3 abcd | 0,3±0,1 abc | 0,3±0,2 abc |
| senkyunólido A | 15,2 | 0,9±0,5 ^{bc} | 0,8±0,4 ^c | 1,8±0,9 ^a | 1,4±0,5 ^a | 1,4±1,2 ^a | 1,2±1,4 ^a | 1,9±0,6 ^a | 1,4±1,1 ^a | 1,6±0,2 ^a | 1,1±0,9 abc |
| 3-isobutiliden ftálido | 15,4 | 0,3±0,2 ^c | 0,3±0,2 ^c | 0,9±0,2 ab | 0,8±0,5 ab | 0,7±0,5 ab | 0,5±0,4 ^{bc} | 1,1±0,4 ^a | 0,6±0,5 ab | 0,7±0,2 ab | 0,7±0,3 ab |
| ligustílido | 15,5 | 0,02±0,0 a | 0,02±0,0 a | 0,08±0,1 a | 0,06±0,1 a | 0,05±0,0 a | 0,03±0,0 a | 0,07±0,1 a | 0,05±0,0 a | 0,05±0,0 a | 0,06±0,0 a |

| | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| neofitadieno (1) | 17,4 | 3,8±0,6 ^b | 3,2±1,6 ^{ab} | 4,1±0,4 ^{ab} | 4,3±0,9 ^{ab} | 4,0±0,5 ^{ab} | 3,9±0,8 ^{ab} | 3,8±0,9 ^b | 3,1±1,6 ^{ab} | 3,8±0,7 ^{ab} | 4,6±0,8 ^a |
| ácido mirístico | 17,6 | 0,6±0,1 ^{ab} | 0,5±0,3 ^b | 0,8±0,1 ^{ab} | 0,7±0,1 ^{ab} | 0,7±0,1 ^{ab} | 0,7±0,1 ^{ab} | 0,6±0,3 ^{ab} | 0,5±0,3 ^b | 0,8±0,1 ^{ab} | 0,5±0,3 ^b |
| neofitadieno (2) | 17,8 | 0,5±0,1 ^b | 0,5±0,2 ^b | 0,6±0,1 ^{ab} | 0,4±0,2 ^b | 0,5±0,1 ^b | 0,5±0,2 ^b | 0,6±0,2 ^b | 0,5±0,3 ^{ab} | 0,6±0,1 ^b | 0,6±0,3 ^a |
| neofitadieno (3) | 18,2 | 1,0±0,2 ^{ab} | 0,9±0,2 ^b | 1,0±0,1 ^{ab} | 1,1±0,3 ^{ab} | 1±0,2 ^{ab} | 1±0,2 ^{ab} | 0,9±0,2 ^b | 0,9±0,2 ^b | 0,9±0,2 ^b | 1,2±0,3 ^a |
| ácido α - linolénico (1) | 20,5 | 1,5±0,3 ^a | 1,5±0,4 ^a | 1,2±1,0 ^a | 1,5±0,7 ^a | 1,5±0,2 ^a | 1,4±0,3 ^a | 1,5±0,1 ^a | 1,3±0,2 ^a | 1,2±0,9 ^a | 1,4±0,3 ^a |
| isobergaptén | 20,8 | 0,2±0,1 ^a | 0,2±0,1 ^a | 0,3±0,2 ^a | 0,3±0,1 ^a | 0,3±0,1 ^a | 0,2±0,1 ^a | 0,3±0,2 ^a | 0,2±0,1 ^a | 0,2±0,1 ^a | 0,3±0,2 ^a |
| ácido palmítico | 21,0 | 6,2±0,8 ^{ab} | 5,6±2,9 ^b | 5,6±1,0 ^b | 6,1±0,4 ^{ab} | 6,1±0,7 ^{ab} | 5,9±0,6 ^{ab} | 6,6±1,2 ^a | 5,3±2,6 ^{ab} | 6,2±0,9 ^{ab} | 6,2±0,8 ^{ab} |
| fitol | 23,1 | 0,6±0,3 ^c | 0,7±0,2 ^{bc} | 1,0±0,2 ^a | 1,1±0,2 ^a | 0,9±0,1 ^{abc} | 0,9±0,2 ^{abc} | 1,0±0,3 ^a | 0,7±0,4 ^{abc} | 0,7±0,4 ^{abc} | 1,0±0,2 ^a |

| | | | | | | | | | | | |
|---|------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| ácido 9-12- octadecadieni- co (1) | 23,7 | 10,1±5,1 ^a | 10,4±5,4 ^a | 7,6±5,9 ^a | 11,3±1,4 ^a | 10,9±0,9 ^a | 10,4±1,0 ^a | 8,6±4,3 ^a | 9,4±4,6 ^a | 9,5±4,9 ^a | 10,7±1,3 ^a |
| ácido α- linolénico (2) | 23,8 | 9,9±1,1 ^a | 11±1,3 ^a | 8,0±4,3 ^a | 9,6±1,6 ^a | 10,8±1,1 ^a | 9,7±1 ^a | 9,8±1,6 ^a | 11±1,7 ^a | 6,5±5,4 ^a | 10,2±1,3 ^a |
| ácido esteárico | 24,2 | 1,5±0,8 ^a | 1,9±1,0 ^a | 1,2±1 ^a | 1,7±0,9 ^a | 1,9±0,3 ^a | 1,9±0,3 ^a | 2,3±0,5 ^a | 1,7±0,9 ^a | 1,7±1,0 ^a | 2±0,4 ^a |
| ácido 9-12- octadecadieni- co (2) | 24,4 | 0,3±0,2 ^a | 0,4±0,2 ^a | 0,2±0,1 ^a | 0,3±0,1 ^a | 0,3±0,1 ^a | 0,3±0,2 ^a | 0,2±0,1 ^a | 0,3±0,2 ^a | 0,4±0,2 ^a | 0,3±0 ^a |
| ácido 9-12- octadecadieni- co (3) | 25,0 | 0,5±0,1 ^a | 0,6±0,2 ^a | 0,5±0,1 ^a | 0,5±0,1 ^a | 0,6±0,4 ^a | 0,4±0,2 ^a | 0,4±0,3 ^a | 0,4±0,2 ^a | 0,4±0,2 ^a | 0,4±0,1 ^a |
| ácido eicosanoico | 28,3 | 0,9±0,6 ^a | 0,8±0,5 ^a | 0,8±0,6 ^a | 0,5±0,4 ^a | 1,0±1,0 ^a | 1,6±0,4 ^a | 0,8±1,1 ^a | 1,2±0,6 ^a | 1,2±0,7 ^a | 0,8±0,8 ^a |
| ácido behénico | 28,5 | 0,9±0,5 ^a | 1,0±0,5 ^a | 1,1±0,3 ^a | 1,3±0,2 ^a | 1,3±0,3 ^a | 1,3±0,2 ^a | 1,2±0,2 ^a | 1,2±0,8 ^a | 1,3±0,3 ^a | 1,3±0,3 ^a |
| ácido α- linolénico (3) | 28,7 | 0,8±0,4 ^a | 0,9±0,2 ^a | 1,1±0,4 ^a | 0,9±0,5 ^a | 1,0±0,6 ^a | 1,0±0,5 ^a | 1,5±0,3 ^a | 1,0±0,5 ^a | 1,2±0,6 ^a | 1,1±0,2 ^a |

| | | | | | | | | | | | |
|---------------------|------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 2-linoleoilglicerol | 29,2 | 0,8±0,2 ^a | 0,9±0,3 ^a | 0,7±0,4 ^a | 0,9±0,2 ^a | 0,9±0,3 ^a | 0,8±0,1 ^a | 1,0±0,2 ^a | 0,9±0,3 ^a | 0,7±0,3 ^a | 0,9±0,2 ^a |
| escualeno | 30,2 | 0,3±0,2 ^b | 0,6±0,2 ^{ab} | 0,6±0,3 ^{ab} | 0,7±0,2 ^a | 0,3±0,2 ^b | 0,4±0,1 ^{ab} | 0,4±0,2 ^{ab} | 0,6±0,3 ^{ab} | 0,6±0,5 ^{ab} | 0,6±0,3 ^{ab} |
| ácido lignocérico | 30,4 | 1,4±0,2 ^a | 1,5±0,2 ^a | 1,1±0,4 ^a | 1,8±0,4 ^a | 1,4±0,4 ^a | 1,5±0,3 ^a | 1,5±0,3 ^a | 1,3±0,4 ^a | 1,3±0,6 ^a | 1,5±0,2 ^a |
| ácido hexacosanoico | 31,2 | 1,6±0,8 ^a | 1,1±0,3 ^a | 0,8±0,4 ^a | 1,1±0,2 ^a | 1,1±0,3 ^a | 1,1±0,3 ^a | 1,0±0,2 ^a | 1,1±0,4 ^a | 2,1±2,2 ^a | 0,9±0,1 ^a |
| 1-hexacosanol | 31,3 | 5,4±1,3 ^a | 6,4±1,6 ^a | 6,8±1,5 ^a | 7,4±1,6 ^a | 5,8±1,2 ^a | 5,5±1,5 ^a | 5,7±1 ^a | 5,1±2,3 ^a | 5,3±2,3 ^a | 6,6±1,1 ^a |
| γ-tocoferol | 31,7 | 1,4±0,5 ^a | 1,3±0,4 ^a | 1,3±0,2 ^a | 1,1±0,4 ^a | 1,5±0,3 ^a | 1,6±0,4 ^a | 1,4±0,3 ^a | 2,3±2,7 ^a | 3,3±3,8 ^a | 1,2±0,4 ^a |
| 1-octacosanol | 33,0 | 10,0±1,4 ^a | 10,4±2,4 ^a | 9,6±1,0 ^a | 9,8±1,8 ^a | 9,2±1,2 ^a | 9,1±1,4 ^a | 9,3±0,9 ^a | 8,1±2,9 ^a | 8,7±2,4 ^a | 9,4±1,2 ^a |
| 2-dipalmitin | 33,7 | 3,1±1,7 ^a | 2,8±2,7 ^a | 5,0±3,0 ^a | 4,0±1,9 ^a | 3,7±1,9 ^a | 4,8±1,8 ^a | 3,5±2,1 ^a | 5,5±3,3 ^a | 4±2,9 ^a | 3,4±1,2 ^a |
| desmosterol | 34,1 | 0,7±0,6 ^a | 0,7±0,5 ^a | 0,8±0,6 ^a | 1,0±0,6 ^a | 0,6±0,5 ^a | 1,2±0,7 ^a | 1,0±0,4 ^a | 1,2±0,7 ^a | 1,4±1,1 ^a | 0,8±0,7 ^a |

| | | | | | | | | | | | |
|------------------------|------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| campesterol | 34,2 | 3,7±2,9 ^a | 2,5±1,1 ^a | 2,6±0,7 ^a | 2,2±0,6 ^a | 2,5±1,0 ^a | 3,2±0,9 ^a | 2,6±1,0 ^a | 2,5±1,1 ^a | 5,5±5,3 ^a | 2,6±0,9 ^a |
| estigmasterol | 34,5 | 15,9±1,2 ^{ab} | 16,1±1,9 ^{ab} | 17,1±1,2 ^{ab} | 18,1±1,1 ^a | 15,8±1,9 ^{ab} | 16,1±1,1 ^{ab} | 16,1±1,7 ^{ab} | 13,1±4,5 ^b | 14,3±4,7 ^{ab} | 16,3±1,9 ^{ab} |
| β-sitosterol (1) | 35,2 | 8,8±1,1 ^a | 9,5±1,6 ^a | 9,6±0,8 ^a | 5,3±0,4 ^b | 9,3±0,5 ^a | 8,8±1,2 ^a | 6,3±1,8 ^{ab} | 10,5±3,2 ^a | 7,2±4,2 ^a | 8,6±1,1 ^a |
| β-sitosterol (2) | 35,5 | 0,9±0,5 ^a | 0,5±0,3 ^a | 0,6±0,4 ^a | 0,7±0,3 ^a | 0,7±0,7 ^a | 0,8±0,4 ^a | 0,6±0,4 ^a | 0,6±0,4 ^a | 1,0±0,8 ^a | 0,6±0,3 ^a |
| ergost-5-eno-3-25-diol | 35,7 | 0,6±0,7 ^a | 0,2±0,1 ^a | 0,3±0,2 ^a | 0,4±0,4 ^a | 0,4±0,2 ^a | 0,5±0,4 ^a | 0,4±0,3 ^a | 0,4±0,2 ^a | 0,8±0,7 ^a | 0,4±0,3 ^a |
| δ-ergostenol | 36,0 | 3,2±1,3 ^a | 2,4±1,2 ^a | 2,9±0,6 ^a | 2,3±0,6 ^a | 3,0±0,6 ^a | 3,0±0,7 ^a | 2,9±0,6 ^a | 2,6±0,3 ^a | 2,3±1,2 ^a | 3,1±0,7 ^a |

¹ TR: tiempo de retención.

Los resultados muestran la media de tres repeticiones ± la desviación estándar. Diferentes letras indican una diferencia estadística significativa de acuerdo con una prueba de Tukey, $p < 0,05$.

En este estudio, se observó un aumento significativo de los tres isómeros del neofitadieno tras la elicitación con quitosano 1500 µg/mL que no se observó para los demás tratamientos. Dado que se ha demostrado que el neofitadieno es un diterpeno cuya síntesis depende de la ruta del ácido jasmónico (Boland et al., 1995), esta observación permite sugerir que, efectivamente, el quitosano, a diferencia del ácido salicílico y el peróxido de hidrógeno, activan los mecanismos de resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés) (El Arroussi et al., 2018). La ISR está relacionada con las interacciones de las plantas con insectos herbívoros, y dado que la quitina puede encontrarse en los exoesqueletos de éstos, resulta plausible que el quitosano pueda percibirse como un PAMP o HAMP y activar las rutas de defensa mediadas por jasmonatos (Ngaki et al., 2020). Si bien se ha reportado que tanto el ácido salicílico como el ácido jasmónico juegan un papel en la ISR aún pueden diferenciarse ambas rutas metabólicas en la defensa vegetal (Yu et al., 2022).

Otro metabolito relevante que pudo analizarse en los perfiles metabólicos fue el fitol. El fitol es otro diterpeno acíclico que en su forma libre es un componente minoritario en el cloroplasto, ya que principalmente es un producto de la hidrólisis de la clorofila, por lo que se encuentra directamente relacionado con las respuestas al estrés y los procesos de senescencia (Gutbrod et al., 2021). Además, este terpenoide es un precursor en la síntesis de tocoferol y filoquinona (vitamina E y K1) que son un compuesto con importante función antioxidante y un acarreador de electrones del fotosistema I, respectivamente (Gutbrod et al., 2019). En este trabajo, se encontró un contenido porcentual de fitol significativamente mayor que el control en las dosis más altas tratadas de todos los elicitores (AS 0,1 mM, PH 200 mM y Q 1500 µg//mL) así como para el AS 1 mM. Esta observación, aunado a los recientes hallazgos respecto al metabolismo de este compuesto en las plantas y su ubicuidad permiten sugerir que podría utilizarse como un marcador de estrés en futuros análisis. Por esa razón, el desarrollo y validación de un método de cuantificación de fitol es una

perspectiva con posible aplicación en el modelado de respuestas defensivas y la hormesis.

Un terpenoide más para el que se observó una diferencia estadísticamente significativa tras el tratamiento con AS 10 mM fue el escualeno. Esta variación en el contenido del metabolito de 40 carbonos resulta interesante porque éste es un precursor de los fitoesteroles, que a su vez son precursores de los brasinoesteroides (BR), un tipo de fitohormonas que también tienen función reguladora durante las respuestas al estrés. En relación con este metabolito, otros fitoesteroles pueden observarse en el perfil metabólico de las muestras. De hecho, el compuesto más abundante en los extractos fue el estigmasterol seguido del β -sitosterol y, en menor proporción también se encontraron el campesterol, δ -ergostenol, desmosterol, un isómero del β -sitosterol y el ergost-5-eno-3-25-diol. Este perfil corresponde con lo reportado en otros trabajos (Saini et al., 2021). En respuesta a la elicitación de las plantas de apio con AS 10 mM, también se observó un aumento en el contenido porcentual del estigmasterol y una aparentemente paradójica disminución del contenido de β -sitosterol, sin que el resto de los esteroides presentara fluctuaciones significativas. Sin embargo, estas evidencias también son un indicador metabólico de estrés. Recientemente se ha propuesto que el estigmasterol es una molécula relacionada con la señalización celular en condiciones de estrés debido a que se han observado cambios en su concentración en tales condiciones. Además, se sabe que el estigmasterol es sintetizado a partir del β -sitosterol (Aboobucker & Suza, 2019), lo que explica la disminución de su contenido observada en esta investigación. Estas evidencias han llevado a considerar la relación de β -sitosterol/estigmasterol un marcador metabólico útil para explicar relaciones entre plantas y patógenos (Cabianca et al., 2021).

Finalmente, los componentes restantes en el extracto de diclorometano de los tallos y hojas de apio fueron los ácidos y alcoholes grasos. Un total de 16 compuestos que pueden clasificarse en este grupo fueron identificados, entre los que se encontraron tres formas isoméricas del ácido α -linolénico y tres isómeros del ácido

9-12-octadecadienoico, los cuales están diferenciados en la tabla mediante un número entre paréntesis. Se ha reportado que los ácidos grasos presentan actividad antioxidante y tienen funciones protectoras en contra del estrés oxidativo (De Bigault & Cacas, 2016). Si bien, en este experimento no se observaron diferencias estadísticamente significativas para ningún compuesto graso como consecuencia de la elicitación en contraste con lo que se observó para las semillas. Es conveniente destacar, además, que entre los ácidos grasos que fueron identificados en las plantas no se encontró el ácido petroselínico, que es uno de los ácidos grasos mayoritarios en las semillas. Esto se debe a que el ácido petroselínico es un ácido graso con una función de almacenamiento de energía, a diferencia del ácido linolénico que es parte de la membrana plasmática (Cahoon & Ohlrogge, 1994). Por esta razón, es plausible que la movilización de los depósitos de ácido petroselínico sea una primera respuesta metabólica en condiciones de estrés de las semillas de las Apiaceae, pero que las fluctuaciones en ácidos grasos de las plantas no ocurran en una primera instancia. Por estas razones, para mejorar el análisis de las fluctuaciones que la elicitación provoca en los niveles de ácidos grasos de las plantas, sería necesario analizarlos a lo largo del tiempo y con un método selectivo que permita su cuantificación.

ii. Compuestos fenólicos, flavonoides y actividad de PAL

Los compuestos fenólicos son los metabolitos más ubicuos entre las especies del reino vegetal. Su función como metabolitos especializados en la defensa está bien descrita (Caretto et al., 2015). Sin embargo, resulta destacable que el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides encontrado en las plantas de apio fue cerca del doble que el encontrado en las semillas. Adicionalmente, la elicitación con AS 0,1 y 1 mM, así como con PH 20 mM sí provoca la acumulación de compuestos fenólicos totales y flavonoides en las plantas con respecto al control (figura 21). Además, el PH 2 mM y el quitosano en las dosis 150 y 1500 µg/mL también provocaron una acumulación de flavonoides con respecto al control, si bien en el caso de los

compuestos fenólicos totales las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

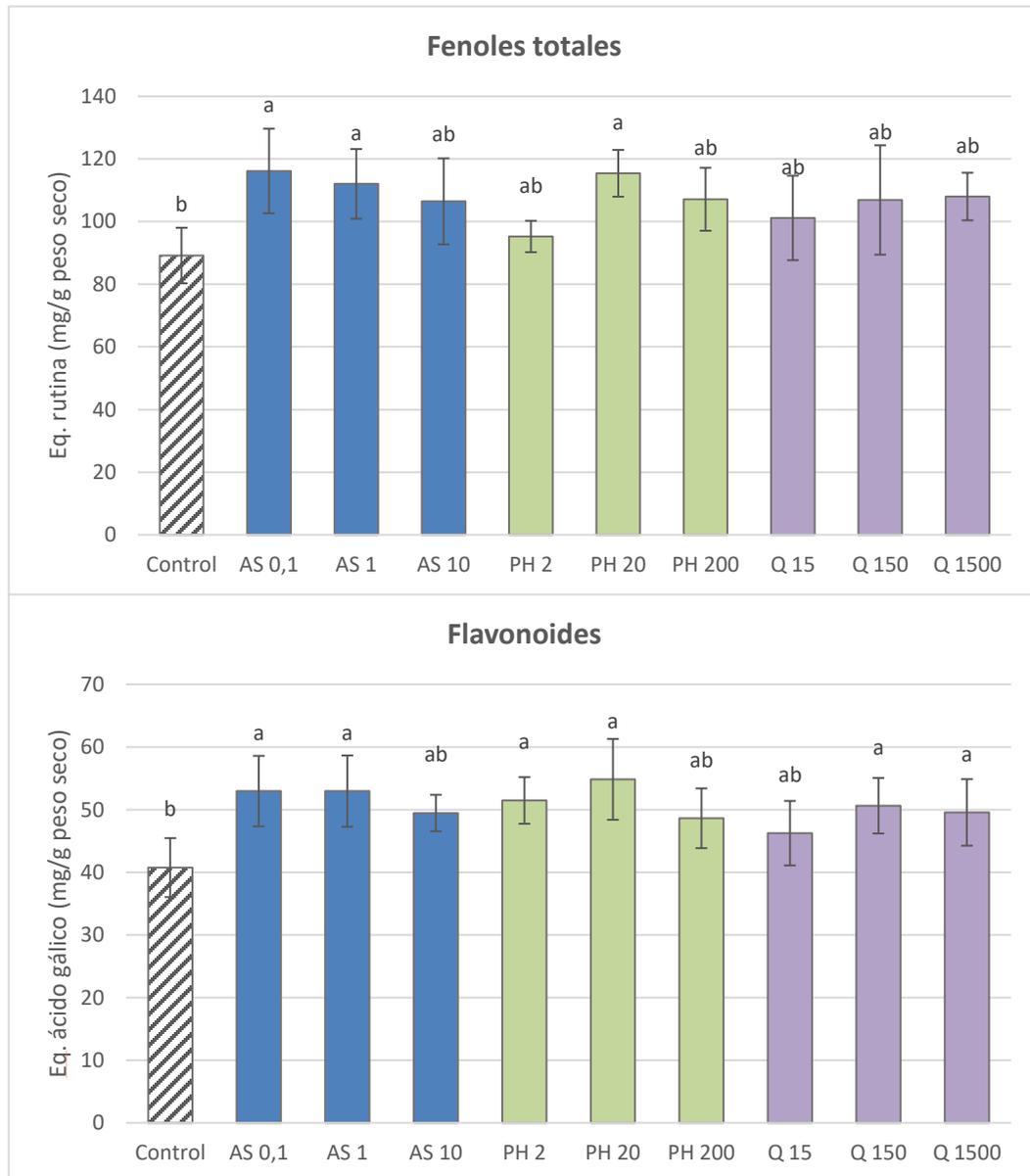


Figura 21. Contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides en las plantas elicidadas.

Los tratamientos consistieron en distintas dosis de estresores (AS=ácido salicílico, PH=peróxido de hidrógeno, Q=quitosano). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p < 0,05$).

Resulta destacable que el cambio de concentración con respecto a la dosis, tanto en los compuestos fenólicos totales y los flavonoides, presenta un comportamiento hormético en las dosis probadas de ácido salicílico y peróxido de hidrógeno. Este comportamiento puede observarse como un aumento significativo en la cantidad de metabolitos seguido por una disminución en una dosis inmediata mayor. No ocurre así para el quitosano, lo que sugiere que aún podrían probarse dosis más altas en búsqueda de la mayor estimulación.

Los resultados para los compuestos fenólicos pueden relacionarse con la actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL) (figura 22). En esta determinación, un aumento significativo con respecto al control fue observado en los tratamientos de AS 1 y 10 mM, así como para Q 150 y 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; sin mostrar, sin embargo, un comportamiento hormético.

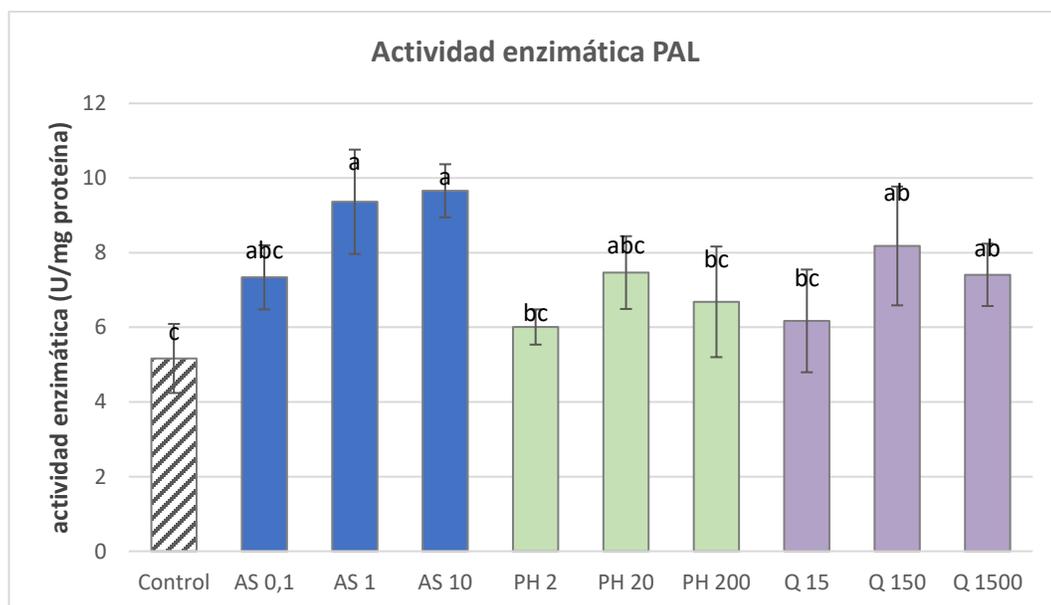


Figura 22. Actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL) en las plantas elicidadas. Los tratamientos consistieron en distintas dosis de estresores (AS=ácido salicílico, PH=peróxido de hidrógeno, Q=quitosano). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p < 0,05$).

Resulta interesante observar que la desviación estándar debida a los tratamientos es grande con respecto al valor de la media, lo cual puede estar reflejando una

variación debida al error, que podría deberse a una interferencia de matriz. Por esa razón, una perspectiva de este trabajo es la realización de un análisis de interferencias en diversas matrices vegetales para la determinación espectrofotométrica de la actividad de PAL.

iii. Actividad antioxidante no enzimática

Con respecto a la actividad antioxidante no enzimática pueden destacarse algunas observaciones que corresponden con los niveles encontrados de compuestos fenólicos y flavonoides en las muestras, en particular con los resultados del ensayo de DPPH. De las similitudes encontradas entre las determinaciones destacan los valores significativamente mayores encontrados para las dosis de AS 0,1 y 1 mM y para el PH 20 mM (figura 23). Además, en contraste con los resultados de los ensayos de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante no enzimática obtenidos para las semillas, en esta ocasión, un mayor contenido de compuestos antioxidantes polares fue encontrado en las muestras de plantas. Esto puede observarse también en los resultados del perfil metabólico. De manera coincidente, la magnitud de la capacidad antioxidante en general fue mayor para las muestras de plantas que para las semillas.

Adicionalmente, los resultados de ambos ensayos (DPPH y ABTS) muestran que la actividad antioxidante responde a una curva hormética dependiente de la dosis para el peróxido de hidrógeno con respecto al control, lo que sugiere que la dosis de máxima estimulación de este elicitor se encuentra en el rango probado. De manera similar, un máximo estimulador puede observarse en el ensayo de DPPH para el ácido salicílico entre 0,1 y 1 mM. Esta observación no puede hacerse para el quitosano, si bien sí se presenta un aumento significativo en la actividad antioxidante en la dosis 1500 µg/mL con respecto al control en el ensayo de ABTS.

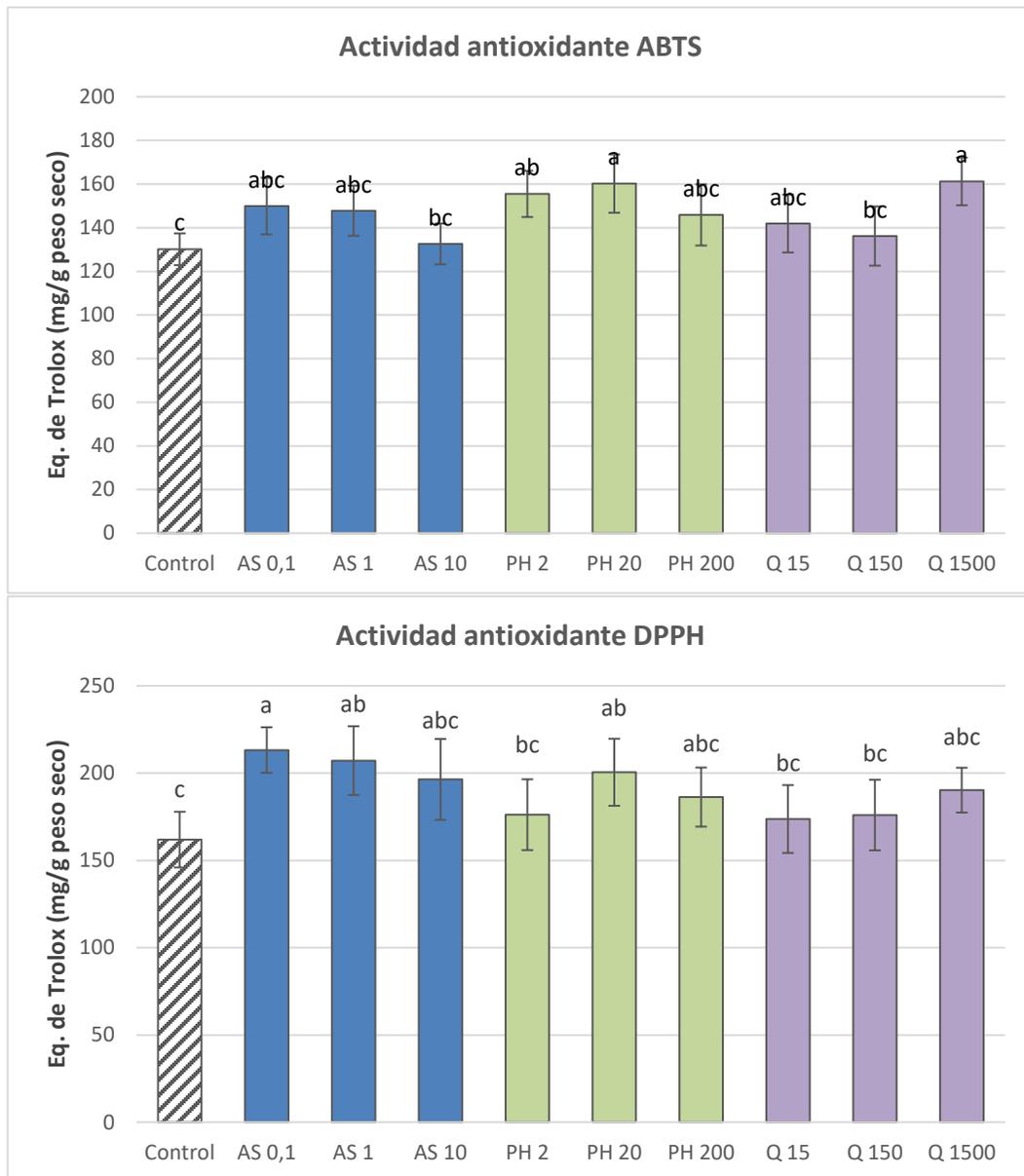


Figura 23. Actividad antioxidante no enzimática en las plantas elicidas determinada mediante los ensayos de DPPH y ABTS. Los tratamientos consistieron en distintas dosis de estresores (AS=ácido salicílico, PH=peróxido de hidrógeno, Q=quitosano). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p < 0,05$).

iv. Actividad antioxidante enzimática

Los ensayos de actividad antioxidante de SOD y CAT también reflejaron diferencias significativas debidas a los tratamientos. Para ambas enzimas, un aumento de su

actividad fue observado en los tratamientos con PH 20 y 200 mM, así como para la dosis más alta de quitosano, 1500 µg/mL sin que se observe una disminución de la función en dosis altas, como ocurre en la respuesta hormética. Estos resultados se relacionan con los observados para la actividad antioxidante no enzimática. En ambos casos, un aumento estadísticamente significativo en la actividad enzimática pudo observarse en las plantas tratadas con SA 0,1, 1 y 10 mM, PH 20 y 200 mM y Q 1500 µg/mL con respecto al grupo control, indicando que en tales dosis los elicitores activan la defensa antioxidante del apio.

En el caso de las plantas, fue observada una correspondencia entre la actividad de CAT y SOD con respecto a los tratamientos. Esta observación resulta contrastante con respecto a los resultados de los análisis en semillas, en los que altas dosis de ácido salicílico y quitosano provocaron una disminución en la actividad de CAT. Lo anterior sugiere que en las plantas la misma dosis de elicitores no provoca estrés; es decir, las plantas de apio presentan una mayor plasticidad a la incidencia del estrés y son capaces de soportar mayores dosis que las semillas. Este hallazgo corresponde con otros reportes en los que se han evaluado dosis de estrés en plantas y semillas (Nouripour-Sisakht et al., 2022), e incluso se ha demostrado que, en una misma planta, la respuesta fisiológica de hojas nuevas y maduras es significativamente distinta ante las mismas dosis de estrés (Rankenberg et al., 2021). Es frecuente que incluso en una misma planta diferentes órganos presenten variaciones contrarias en la actividad de enzimas antioxidantes como CAT, SOD y peroxidasa (POX), lo cual más que representar una contradicción pone de manifiesto la gran especificidad de los diferentes tejidos en la planta y la complejidad de los sistemas defensivos (Szóllósi, 2014).

En este sentido, podemos afirmar y recomendar que el análisis metabólico en el desarrollo de protocolos de elicitación debe hacerse sobre un mismo órgano vegetal, elegido a partir del objetivo de la investigación y preferentemente que los órganos muestreados se encuentren en un período de madurez similar.

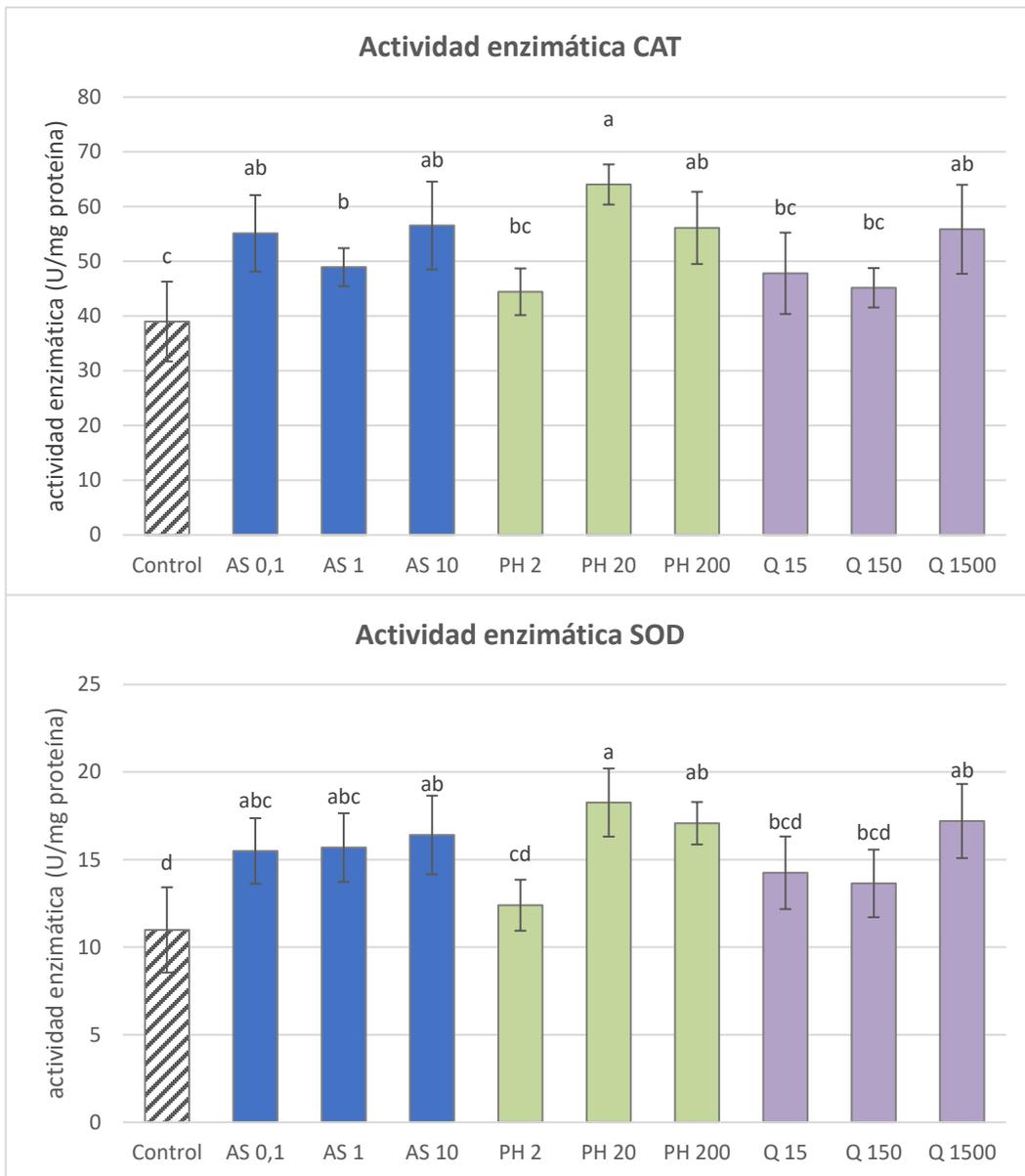


Figura 24. Actividad antioxidante enzimática de la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD).

Los tratamientos consistieron en distintas dosis de estresores (AS=ácido salicílico, PH=peróxido de hidrógeno, Q=quitosano). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey $p < 0,05$).

X. CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo consistió en estimular la respuesta metabólica defensiva de las plantas y semillas de apio mediante la aplicación de los elicitores ácido salicílico, peróxido de hidrógeno y quitosano. Los resultados permitieron comprobar la hipótesis de que es posible estimular la síntesis de ftálicos y compuestos fenólicos bioactivos en semillas y plantas de apio, y que tal estimulación es dependiente de la dosis del elicitador de acuerdo con la hormesis. Principalmente, los cambios observados en los niveles de metabolitos permitieron describir tres posibles marcadores biológicos de estrés. Por una parte, el ácido petroselínico para las semillas de *Apiaceae*; y, de manera equivalente, el fitol y el escualeno para las plantas. Estos dos últimos metabolitos mencionados son ubicuos en el reino vegetal, por lo que podrían utilizarse para obtener información relevante respecto al nivel de estrés en cualquier otra especie. De una manera similar, los hallazgos de este trabajo confirmaron la relación de la proporción de β -sitosterol/estigmasterol con el estrés, los dos fitosteroles son mayoritarios en las plantas de apio y están presentes la mayoría de las plantas. Con base en lo anterior, el desarrollo de métodos selectivos de análisis para tales metabolitos en distintas matrices vegetales podría simplificar la descripción y modelado de la hormesis y las respuestas al estrés.

A partir de los hallazgos derivados de esta investigación surgen también otras perspectivas para el trabajo a futuro. Los cambios fisiológicos provocados por la elicitación, que pueden observarse en la variación de los niveles de metabolitos especializados, tienen en las plantas una función biológica protectora que puede derivar en el aumento de la tolerancia a otros factores de estrés. En el caso particular del apio, aún es necesario evaluar si los tratamientos estimulantes aquí probados tienen un efecto en la tolerancia a la sequía, que es el estresor que más afecta a su productividad. Sería particularmente ventajoso conocer si la elicitación de las semillas les confiere tolerancia a las plántulas. Esto permitiría proponer tratamientos pregerminativos o “priming” para las semillas de apio que pudieran

disminuir los problemas de baja uniformidad y porcentaje de germinación, además de mejorar la sobrevivencia de las plántulas en campo.

Finalmente, la complejidad de los sistemas vegetales se hizo clara, por lo que resulta igualmente complejo proponer análisis que sean lo suficientemente representativos del estado del sistema. Por esa razón, además de proponer variables que puedan generalizarse para el mayor número de cultivares y especies, es indispensable establecer condiciones normalizadas para el análisis de las respuestas al estrés y la hormesis, así como incorporar modelos estadísticos que permitan la reducción de la dimensionalidad de los datos y faciliten la construcción de modelos computacionales que lleven a una predicción y clasificación confiable para su uso en aplicaciones agrícolas en un nivel global.

XI. REFERENCIAS

Aboaba, S. A., Aiyelaagbe, O. O., & Ekundayo, O. (2010). Chemical composition, toxicity and larvicidal activity of the essential oil from the whole plant of *Acalypha segetalis* from South-West Nigeria. *Natural Product Communications*, 5(3), 1934578X1000500328.

Aboobucker, S. I., & Suza, W. (2019). Why do plants convert sitosterol to stigmasterol? *Front. Plant Sci.*, 10, 00354.

Agathokleous, E., Kitao, M., Calabrese, E.J., (2020). Hormesis: highly generalizable and beyond laboratory. *Trends Plant Sci.* 25 (11), 1076–1086.

Ahluwalia, V., D. Boyd, A. Jain, C. Khanduri, & N. Sharma. (1988). Furanocoumarin glucosides from the seeds of *A. graveolens*. *Phytochemistry*. 27 (4), 1181-1183.

Ahmed A., M. A, F. M. Elkady & K. A. Khalid. Comparison between salicylic acid and selenium effect on growth and biochemical composition of celery. (2018). *Asian J. Plant Sci.*, 17 (3): 150-159.

- Ali, A., Shah, L., Rahman, S., Riaz, M. W., Yahya, M., Xu, Y. J. & Cheng, B. (2018). Plant defense mechanism and current understanding of salicylic acid and NPRs in activating SAR. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 104, 15-22.
- Ataga, A. E., Epton, H. A. S., & Frost, R. R. (1993). Effect of virus infection on the concentration of furanocoumarins in celery (*Apium graveolens* L. var. dulce Mill. DC). *Physiol. Mol. Plant. Pathol.*, 42(3), 161-168.
- Ávila-Juárez L., I. Torres-Pacheco, R. V. Ocampo-Velázquez, A. A. Feregrino-Pérez, A. Cruz-Hernández & R. G. Guevara-González. (2017). Integrating plant nutrients and elicitors for production of secondary metabolites, sustainable crop production and human health: a review. *Int. J. Agric. Biol.* 19 (3), 391-402.
- Beck, J., & S. Chou. (2007). The structural diversity of phthalides from the Apiaceae. *J. Nat. Prod.* 70, 891-900.
- Beier, R., G. Ivie, H. Oertli, & Holt. L. (1983). HPLC analysis of linear furocoumarins (psoralens) in healthy celery (*A. graveolens*). *Ed. Chem. Toxic.* 21(2), 163-165.
- Beier, R.C. & E.H. Oertli. (1983). Psoralen and other linear furocoumarins as phytoalexins in celery. *Phytochemistry* 22, 2595–2597.
- Bjeldanes, L. F. & Kim, I. Phthalide components of celery essential oil. (1977). *J. Org. Chem.*, Val. 42 (13), 2333-2335.
- Boland W, Hopke J, Donath J, Nüske J, Bublitz F (1995) Jasmonic acid and coronatin induce odor production in plants. *Angew Chem Int Ed.*, 34:1600–1602.
- Borgaud F., A. Gravot, S. Milesi, & E. Gontier. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci.* 161,839–851.
- C. A. Black, R. Karban, L. D. Godfrey, J. Granett, and W.E. Chaney. (2003). Jasmonic Acid: a vaccine against leafminers (Diptera: *Agromyzidae*) in celery. *Environ. Entomol.* 32(5): 1196-1202.

Cabianca, A., Müller, L., Pawlowski, K., & Dahlin, P. (2021). Changes in the Plant β -Sitosterol/Stigmasterol Ratio Caused by the Plant Parasitic Nematode *Meloidogyne incognita*. *Plants*, 10(2), 292

Calabrese, E. J., K. A. Bachmann, A. J. Bailer, P. M. Bolger, J. Borak & L. Cai. (2007). Biological stress response terminology: integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222, 122–128.

Cardenas-Manríquez G., Vega-Muñoz I., Villagómez-Aranda A.L., León-Galvan M.F., Cruz-Hernandez A., Torres-Pacheco I., Rangel-Cano R. M., Rivera-Bustamante R.F. & R.G Guevara-Gonzalez. (2016). Proteomic and metabolomic profiles in transgenic tobacco (*N. tabacum* xanthinc) to CchGLP from *Capsicum chinense* BG-3821 resistant to biotic and abiotic stresses. *Environ. Exp. Bot.* 130: 33–41.

Carvalho, F. P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food Energy Secur.*, 6(2), 48-60.

Chaudhary, S. K., O. Ceska, P. J. Warrington, and M. J. Ashwood-Smith. (1985). Increased furocoumarin content of celery during storage. *J. Agric. Food Chem.* 33, 1153-1 157.

Cho, D.H. & Lim, S.T. (2018). Changes in phenolic acid composition and associated enzyme activity in shoot and kernel fractions of brown rice during germination. *Food Chem.* 256, 163–170.

Christensen, L. P. (2018). Polyphenols and polyphenol-derived compounds from plants and contact dermatitis. En: *Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease (Segunda Edición)*, Elsevier EBooks, 349–384.

Dąbrowska, J.A., Kunicka-Styczyńska, A. & Śmigielski, K.B. (2020). Biological, chemical, and aroma profiles of essential oil from waste celery seeds (*Apium graveolens* L.). *J. Essent. Oil Res.* 32 (4), 308–315.

Davis, Wilma V., Catharine Weber, Gary Lucier, & Sharon Raszap Skorbiansky (2022). Vegetables and Pulses Outlook: December 2022, VGS-369, U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service, December 16, 2022. Recuperado de: <https://www.ers.usda.gov/webdocs/outlooks/105511/vgs-369.pdf?v=8178.2>

De, A., & Jean-Luc Cacas. (2016). How very-long-chain fatty acids could signal stressful conditions in plants? *Front. Plant Sci.*, 7: 01490.

Duan A., K. Feng, G. Wang, J. Liu, Z. Xu, A. Xiong. Elevated gibberellin enhances lignin accumulation in celery (*Apiumgraveolens* L.) leaves. (2019). *Protoplasma*. 256(3):777-788.

Durrett, T. P., & Welti, R. (2021). The tail of chlorophyll: fates for phytol. *J Biol Chem*, 296.

El Arroussi, H., Benhima, R., El-Baouchi, A., Sijilmassi, B., El Mernissi, N., Aafsar, A., Kadmiri, I. M., Bendaou, N. & Smouni, A. (2018). Dunaliella salina exopolysaccharides: a promising biostimulant for salt stress tolerance in tomato (*Solanum lycopersicum*). *J App Phycol*, 30(5), 2929–2941.

FAO. (2002). Agricultura mundial hacia los años 2015/2030. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/y3557s/y3557s06.htm> el 01/05/2019.

Fazal S. S., M. M. Ansari, R. K. Singla, S. Khan. Isolation of 3-n-butyl phthalide & sedanenolide from *Apium graveolens* Linn. (2012). *Indo Global J. Pharm. Sci.*, 2(3): 258-261.

Feregrino-Pérez A. A., L. C. Berumen, G. García-Alcocer, R. G. Guevara-Gonzalez, M. Ramos-Gomez, R. Reynoso-Camacho, J. A. Acosta-Gallegos, G. Loarca-Piña. (2008). Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from common beans (*Phaseolus vulgaris*L.) on azoxymethane-induced colon cancer. *J. Agric. Food Chem.* 56(18): 737-8744.

Figuroa-Pérez M.G., Reynoso-Camacho R., Garcia-Ortega L. F.& R. G. Guevara-González. (2019). Transcriptome profiling of peppermint (*Mentha piperita*) with improved antioxidant properties in response to salicylic acid elicitation. J Plant Biochem. Biotech., 28(3): 301-311.

Floegel, A., Kim, D., Chung, S., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. J. Food Compos. Anal., 24(7), 1043–1048.

Gavilán-García I., A. Gavilán-García, G. S. Cano-Díaz, V. Alcántara-Concepción. (2012). Guía técnica de acción para residuos peligrosos. UNAM. Recuperado de: <http://www.fciencias.unam.mx/nosotros/comision/Guía%20técnica%20de%20acción%20para%20residuos%20químicos.pdf> el 25/10/2019.

Godínez-Mendoza, P. L., Rico-Chávez, A. K., Ferrusquía-Jiménez, N. I., Carbajal-Valenzuela, I. A., Villagomez-Aranda, A. L., Irineo Torres-Pacheco, & Ramón Gerardo Guevara-González. (2023). Plant hormesis: Revising of the concepts of biostimulation, elicitation and their application in a sustainable agricultural production. Sci Tot Environ, 894, 164883–164883.

González-Benito, M. & Iriondo J. M. (2002). Cryopreservation of *Apium graveolens* L. (Celery) seeds en: Cryopreservation of plant germplasm II. Springer Verlag, Berlin Heidelberg. 48-56.

Gorelick, J., & N. Bernstein. (2014). Elicitation: An Underutilized Tool in the Development of Medicinal Plants as a Source of Therapeutic Secondary Metabolites. Adv. Agron. 124, 201-230.

Gupta, M., Sharma, P., Sarin, N.B. & Sinha, A.K. (2009). Differential response of arsenic stress in two varieties of *Brassica juncea* L. Chemosphere 74 (9), 1201–1208.

Gutbrod, K., Romer, J., & Dörmann, P. (2019). Phytol metabolism in plants. Prog. Lipid Res., 74, 1–17.

Gutbrod, P., Yang, W., Goran Vuk Grujicic, Peisker, H., Gutbrod, K., Du, L., & Dörmann, P. (2021). Phytol derived from chlorophyll hydrolysis in plants is metabolized via phytanal. *J Biol Chem*, 296, 100530–100530.

Hagemeyer J., Batz O., Schmidt, J., Wray, V., Hahlbrock, K. & Strack, D. (1999). Accumulation of phthalides in elicitor-treated cell suspension cultures of *Petroselinum crispum*. *Phytochemistry*. 51: 629-635.

He, M. & Ding, N.Z. (2020). Plant unsaturated fatty acids: multiple roles in stress response. *Front. Plant Sci.* 11, 562785

Hounsome, N., Hounsome, B., Tomos, D., Edward-Jones, G. (2008). Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *J Food Sci.*, 73 (4) 48-65.

Huang, Y., Wu, Y., Yin, H., Du, L., & Chen, C. (2023). Senkyunolide I: a review of its phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and drug-likeness. *Molecules*, 28(8), 3636.

Ibarra-Alvarado, C.; Rojas A.; Mendoza S.; Bah M.; Gutiérrez D.M.; Hernández-Sandoval L.; Martínez M. (2010). Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharm. Biol.* 48: 732–739.

Jespersen, B., Tykocki, N.R., Watts, S.W., Cobbett, P.J. (2015). Measurement of smooth muscle function in the isolated tissue bath-applications to pharmacology research. *J Vis Exp.* (95):52324.

Khodaeifar, F., S. M. Bagher Fazljou, A. Khaki, M. Torbati, E. O. Saheb Madarek, A. A. Khaki, M. Shokoohi, & A. H. Dalili. (2019). Investigating the role of hydroalcoholic extract of *Apium graveolens* and *Cinnamon zeylanicum* on metabolically change and ovarian oxidative injury in a rat model of polycystic ovary syndrome. *Int. J. Women's Health Reprod. Sci.*, 7 (1), 92-98.

Kitajima, J., T. Ishikawa, & M. Satoh. (2003). Polar constituents of celery seed. *Phytochemistry*. 64(5), 1003–1011.

- Kokotkiewicz, A. & Luczkiewicz, M. (2016). Celery (*Apium graveolens* var. *dulce* (Mill.) Pers.) oils. Essential oils in food preservation. *Flavor Saf.* 325–338.
- Kooti, W., S. Ali-Akbari, N. Asadi-Samani, H. Ghadery, & D. Ashtary-Larky. (2014). A review on medicinal plant *Apium graveolens*. *Adv. Herb. Med.* 1(1), 48-59.
- Krishnan, S. R., Skiba, A., Luca, S. V., Marcourt, L., Wolfender, J. L., Skalicka-Woźniak, K., & Gertsch, J. (2023). Bioactivity-guided isolation of trypanocidal coumarins and dihydro-pyranochromones from selected Apiaceae plant species. *Phytochemistry*, 113770.
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J.M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N. & Caboche, M. (2006). Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57 (1), 405–430.
- Li, H., Chen, J., He, L., Zhu, H., Huang, Z., Zhu, M., Fan, L., Wu, L., Yu, L., Zhu, W., & Yan, J. (2022). Transcriptome Analyses Reveal the Role of Light in Releasing the Morphological Dormancy of Celery Seed by Integrating Plant Hormones, Sugar Metabolism and Endosperm Weakening. *Int. J. Mol. Sci.*, 23(17).
- Lin, G., Chan, S. S. K., Chung, H. S., & Li, S. L. (2005). Chemistry and biological activities of naturally occurring phthalides. *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 32, 611-669.
- Lin, L.-Z., Lu, S. & Harnly, J.M. (2007). Detection and quantification of glycosylated flavonoid malonates in celery, chinese celery, and celery seed by LC-DAD-ESI/MS. *J. Agric. Food Chem.* 55 (4), 1321–1326.
- Luna-Vázquez F. J., C. Ibarra-Alvarado, A. Rojas-Molina, J. I. Rojas-Molina, E. M. Yahia, D. M. Rivera-Pastrana, A. Rojas-Molina & A. M. Zavala-Sánchez. (2013). Nutraceutical value of black cherry *Prunus serotina* Ehrh. fruits: antioxidant and antihypertensive properties. *Molecules.* 18(12), 14597-14612.
- MacLeod, A. J., MacLeod, G., & Subramanian, G. (1988). Volatile aroma constituents of celery. *Phytochemistry*, 27(2), 373–375.

Malhotra, S. K. (2012). Celery. Capítulo 12 en: Handbook of herbs and spices. Volume 2, 2da Edición. p249. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Abington Cambridge, England.

Marco-Contelles, J. & Zhang, Y. (2020). From seeds of *Apium graveolens* Linn. to a cerebral ischemia medicine: the long journey of 3-n-butylphthalide. J. Med. Chem. 63 (21), 12485–12510.

Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Maxia, A., Frau, M. A., & Salgueiro, L. (2013). Isolation of the volatile fraction from *Apium graveolens* L. (Apiaceae) by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation: Chemical composition and antifungal activity. Nat. Prod, Res., 27(17), 1521–1527.

Mejía-Teniente, L., Durán-Flores, B.A., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M.M., Rivera-Bustamante, R.F., Feregrino-Perez, A.A., Pérez-Ramírez, I., Rocha-Guzmán, N.E., Reynoso-Camacho, R. & R. G. Guevara-González. (2019). Hydrogen peroxide protects pepper (*Capsicum annuum* L.) against pepper golden mosaic geminivirus (PepGMV) infections. Physiol. Mol. Plant Pathol., 106: 23-29.

Mencherini, T., A. Cau, G. Bianco, R. Della Loggia, R. P. Aquino & G. Autore. (2007). An extract of *Apium graveolens* var. dulce leaves: structure of the major constituent, apiin, and its anti-inflammatory properties. J. Pharm. Pharmacol. 59, 891–897.

Meng-Yao, L., Xi-Lin, H., Feng W., Guo-Fei, T., Zhi-Sheng, X. & Ai-Sheng, X. (2017). Advances in the research of celery, an important Apiaceae vegetable crop. Crit. Rev. Biotechnol., 38(2):172-183.

Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F. & Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. JXB 61 (15), 4197–4220.

Miksch, M. & Boland, W. (1996). Airborne methyl jasmonate stimulates the biosynthesis of furanocoumarins in the leaves of celery plants (*Apium graveolens*). Experientia. 52:739-743.

Mishra, N., Jiang, C., Chen, L., Paul, A., Chatterjee, A., & Shen, G. (2023). Achieving abiotic stress tolerance in plants through antioxidative defense mechanisms. *Front. Plant Sci.*, 14: 1110622.

Najda, A., Dyduch, J., Świca, K., Kapłan, M., Papliński, R., Sachadyn-Król, M., & Klimek, K. (2015). Identification and profile of Furanocoumarins from the ribbed celery (*Apium graveolens* L Var. Dulce mill./Pers.). *Food Sci Technol Res*, 21(1), 67-75.

Neill, S.J., R. Desikan, A. Clarke, R. D. Hurst, J. T. Hancock. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *Journal of experimental botany*. 53 (372): 1237-1247.

Nemeš, I. N Simin, D. Orčić, D. Arsenov, S. Pajević, & N. Mimica-Dukić. (2018). Essential-oil composition of parsley and celery conventionally and organically grown in Vojvodina. *Physics, Chemistry and Technology*. 16 (1) 112. 49th International Symposium on Essential Oils (ISEO2018) Book of Abstracts.

Ngaki, M. N., Dipak Kumar Sahoo, Wang, B., & Bhattacharyya, M. K. (2020). Overexpression of a plasma membrane protein generated broad-spectrum immunity in soybean. *Plant Biotech J*, 19(3), 502–516.

Nguyen Thu, H., Nguyen Van, P., Ngo Minh, K. & Le Thi, T. (2021). Optimization of extraction conditions of flavonoids from celery seed using response surface methodology. *J. Food Meas. Charact.* 15 (1), 134–143.

Nouripour-Sisakht, J., Ehsanzadeh, P., & Ehtemam, M. H. (2022). Fennel outperforms ajwain and anise in the saline environment: physiological response mechanisms in germinating seeds and mature plants. *Italian Journal of Agronomy*, 17(3).

OMS. (2017). Enfermedades cardiovasculares. Recuperado de: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) el 01/05/2019.

OMSa. (2018). Cáncer. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> el 01/05/2019.

OMSb. (2018). Healthydiet. Recuperado de: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet> el 15/08/2019

Pandey, P., Singh, S. & S. Banerjee. (2019). *Ocimum basilicum* suspension culture as resource for bioactive triterpenoids: yield enrichment by elicitation and bioreactor cultivation. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 137: 65.

Patrícia, L., Alberton, B., Alvarado, S. T., Melo, B., Buisson, É., Gabriela, M., Leonardo Farage Cancian, Carstensen, D., Fernando, D., Patrícia T.P. Leite, Mendoza, I., Walter, M., Natalia Costa Soares, Silva, Vanessa Grazielle Staggemeier, Annia Susin Streher, Betânia Cunha Vargas, & Peres, C. A. (2016). Linking plant phenology to conservation biology. *Biological Conservation*, 195, 60–72.

Popović, M., B. Kaurinović, S. Trivić, N. Mimica-Dukić, & M. Bursać. (2006). Effect of celery (*Apium graveolens*) extracts on some biochemical parameters of oxidative stress in mice treated with carbon tetrachloride. *Phytotherapy Research.* 20(7): 531–537.

Powanda, M.C., Whitehouse, M.W. & Rainsford, K.D. (2015). Celery seed and related extracts with antiarthritic, antiulcer, and antimicrobial activities. *Prog. Drug Res.* 70, 133–153.

Rankenberg, T., Geldhof, B., van Veen, H., Holsteens, K., Van de Poel, B., & Sasidharan, R. (2021). Age-dependent abiotic stress resilience in plants. *Trends in Plant Science*, 26(7), 692-705.

Rico-Chávez, A. K., Solano-Alvarez, N., Valencia-Hernández, J. A., & Guevara-González, R. G. (2021). Management of Plant Stress Physiology to Improve Crop Production and Quality. En: *Handbook of Plant and Crop Physiology* (pp. 1065-1081). CRC Press.

Rico-Chávez, A., Franco, J., Fernandez-Jaramillo, A., Contreras-Medina, L., Guevara-González, R., Hernandez-Escobedo, Q. (2022). Machine learning for plant stress modeling: a perspective towards hormesis management. *Plants* 11 (7), 970.

Rodríguez-Calzada T., Qian M, Strid Å., Neugart S., Schreiner M., Torres-Pacheco I. & R. G. Guevara-González. (2019). Effect of UV-B radiation on morphology, phenolic compound production, gene expression, and subsequent drought stress responses in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant. Physiol. Biochem.* 134:94-102.

Rzedowski, G. C. de & J. Rzedowski, (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México. Recuperado de: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/apiaceae/apium-graveolens/fichas/ficha.htm> el 14/03/2019.

Saini, R. K., Song, M. H., Yu, J. W., Shang, X., & Keum, Y. S. (2021). Phytosterol Profiling of Apiaceae Family Seeds Spices Using GC-MS. *Foods* 10(10), 2378.

SBI, Spices Board India. (2019). Ministry of Commerce and Industry, Govt. of India. Monthly estimated export. Recuperado de: <http://indianspices.com/sites/default/files/edec2018web.pdf> el 21/08/19.

Shanmugapriya, R., & T. Ushadevi. (2015). Phytochemical screening and GC-MS analysis of *Apium graveolens* L. seed extracts. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 6 (2): 814–820.

Shim, I.-S., Momose, Y., Yamamoto, A., Kim, D.-W. & Usui, K. (2003). Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* 39 (3), 285–292.

SIAP (2018). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Recuperado de: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> el 15/08/2019.

Siller-Cepeda J.H, M. A. Báez-Sañudo, A. Sañudo-Barajas, R. Báez-Sañudo. (2002). Manual de Buenas Prácticas Agrícolas. SAGARPA. Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/120191/Manual_de_Buenas_Practicas_Agricolas.pdf el 25/10/2019

Soltani, E., Ghaderi-Far, F., Baskin, C.C., Baskin, J.M. (2015). Problems with using mean germination time to calculate rate of seed germination. *Aust. J. Bot.* 63 (8), 631–635.

Sowbhagya, H.B. (2013). Chemistry, technology, and nutraceutical functions of celery (*Apium graveolens* L.): an overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54: 389–398

Stanjek V., Herhaus C., Ritgen U. & W. Boland. (1997). Changes in the leaf surface chemistry of *Apium graveolens* (Apiaceae) stimulated by jasmonic acid and perceived by a specialist insect. *Helvetica Chimica Acta.* 80: 1408-1420.

Stanley-Horn, D. E. (1999). Induction of linear furanocoumarins in celery, *Apium graveolens* by insect damage and their effects on *Lygus lineolaris* and the parasitoid *Persitenus stygicus* (Tesis doctoral, University of Guelph).

Sun, W., Rice, M. S., Park, M. K., Chun, O. K., Nan, H., Willett, W. C., Li, W.-Q., Qureshi, A. A., & Cho, E. (2020). Intake of Furocoumarins and Risk of Skin Cancer in 2 Prospective US Cohort Studies. *J Nutrition*, 150(6), 1535–1544.

Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 43:2, 145-171.

Szőllősi, R. (2014). Superoxide Dismutase (SOD) and abiotic stress tolerance in plants. En: *Oxidative Damage to Plants, Antioxidant Networks and Signaling.* 89–129. Academic Press. Elsevier Ebooks.

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Saraiva, J.A. & Nunes, M.L. (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Ind. Crops Prod.* 43, 587–595.

- Thakur, M., Bhattacharya, S., Kumar, Khosla P., Puri, S. (2019). Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 12: 1–12
- Topçu, G. (2006). Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. *J. Nat. Prod.* 69(3): 482–487.
- Turi, C. E., Finley, J., Shipley, P. R., Murch, S. J. & Brown, P. N.. (2015). Metabolomics for phytochemical discovery: development of statistical approaches using a cranberry model system. *J. Nat. Prod.* 78, 953–966.
- Turner, L., Lignou, S., Gawthrop, F., & Wagstaff, C. (2021). Investigating the relationship of genotype and geographical location on volatile composition and sensory profile of celery (*Apium graveolens*). *Int J Mol Sci*, 22(21), 12016.
- Vargas-Hernández M., Torres-Pacheco I., Gautier F., Álvarez-Mayorga B., Cruz-Hernández A., García-Mier L., Jiménez-García S. N., Ocampo-Velázquez R. V., Feregrino-Perez A.A. & R. G. Guevara-Gonzalez. (2017). Influence of hydrogen peroxide foliar applications on in vitro antimicrobial activity in *Capsicum chinense* Jacq. *Plant Biosyst.*, 151(2): 269-275.
- Vasconsuelo, A. & Boland R. (2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sci.*, 172: 861–875.
- Vazquez-Hernandez, C., Feregrino-Perez A.A., Perez-Ramirez I., Ocampo-Velazquez R.V., Rico-Garcia E., Torres-Pacheco I. & R. G Guevara-González. (2019). Controlled elicitation increases steviol glycosides (SGs) content and gene expression-associated to biosynthesis of SGs in *Stevia rebaudiana* B. cv. Morita II. *Ind. Crop. Prod.*, 139: 1-7.
- Vázquez-Hernández, M. C., I. Parola-Contreras, L.M. Montoya-Gómez, I. Torres-Pacheco, D. Schwarz & R.G. Guevara-González. (2019). Eustressors: Chemical and physical stress factors used to enhance vegetables production. *Sci. Hort.* 250: 223-229.

- Vega-Muñoz, I., Feregrino-Pérez A. A., Torres-Pacheco I., & R. G. Guevara-González. (2018). Exogenous fragmented DNA acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) inducing changes in CpG DNA methylation and defence-related responses in *Lactuca sativa*. *Funct. Plant Biol.* 45(10): 1065-1072.
- Wang, A., Jia, B., Zhang, X., Huo, X., Chen, J., Gui, L., Cai, Y., Guo, Z., Han, Y., Peng, Z., Jing, P., Chen, Y., Liu, Y., Yang, Y., Wang, T., Sun, Z., Li, T., Sun, H., Yuan, H., & Shao, H. (2023). Efficacy and safety of butylphthalide in patients with acute ischemic stroke. *JAMA Neurol*, 80(8), 851–851.
- Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Cu. Op. Plant Biol.*, 5(3), 218–223.
- Xing, K., Xiao Jun Zhu, Peng, X., & Qin, S. (2014). Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agron. Sustain. Dev.*, 35(2), 569–588.
- Yeung, A.W.K., Mocan, A. & A.G. Atanasov. (2018). Let food be thy medicine and medicine be thy food: A bibliometric analysis of the most cited papers focusing on nutraceuticals and functional foods. *Food Chem.* 269: 455-465.
- Yin, L., Lu, Y., Guo, R., Hao, M., Liang, Y., Bi, Y., Chen, Y., Chen, Y., & Yang, Z. (2023). Ligustilide induces apoptosis and reduces proliferation in human bladder cancer cells by NFκB1 and mitochondria pathway. *Chem. Biol. Drug Des.*, 101(6), 1252–1261.
- Young, G. M., Franz Nippgen, Titterbrandt, S., & Cooney, M. J. (2010). Lipid extraction from biomass using co-solvent mixtures of ionic liquids and polar covalent molecules. *Sep. Purif. Technol.*, 72(1), 118–121.
- Yu, Y.Y., Gui Shuang Ying, Li, Z., Jiang, C., Guo, J., & Niu, D. (2022). Induced Systemic Resistance for Improving Plant Immunity by Beneficial Microbes. *Plants*, 11(3), 386–386.

Zangerl, A.R. & Berenbaum, M.R. (1997). Costs of chemically defending seeds: furanocoumarins and *Pastinaca sativa*. *Amer. Natur.* 150: 491-504.

Zhou, K., Zhao, F., Liu, Z., Zhuang, Y., Chen, L. & Qiu, F. (2009). Triterpenoids and flavonoids from celery (*A. graveolens*). *J. Nat. Prod.*, 72: 1563-1567.