



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ciencias en Ingeniería de Biosistemas

Tesis
Efecto de la aplicación de H₂O₂ sobre la hórmesis de chile (*Capsicum annuum* L.) cultivado bajo estrés hídrico

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

Presenta:
Tania Rodríguez-Calzada

Dirigido por:
Dr. Ramón Gerardo Guevara-González

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Presidente

Dr. Irineo Torres Pacheco

Secretario

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez

Vocal

Dr. Enrique Rico García

Suplente

Dr. Luis Miguel Contreras Medina

Suplente



Dr. Manuel Toledano Ayala
Director de la Facultad

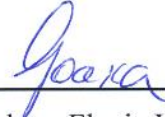
Firma

Firma

Firma

Firma

Firma



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

RESUMEN

La presente investigación propone la aplicación foliar de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como una herramienta biotecnológica para inducir tolerancia a déficit hídrico (DH) y sequía (SQ) en plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.). Se realizaron aplicaciones de H_2O_2 en dosis 2, 20 o 200 mM (agua destilada como control) a los 22 y 36 días después del trasplante, y enseguida se sometieron a tres esquemas de irrigación: capacidad de campo (-10 a 0 kPa), déficit hídrico (-30 a -60 kPa) o sequía (-60 a -140 kPa), con base en el potencial hídrico del sustrato. El experimento finalizó a la segunda cosecha, 92 ddt. En cuanto a los fenómenos fisiológicos y genéticos, DH200 presenta el mayor número de densidad estomatal y los valores más altos de metilación de DNA genómico; también es el tratamiento que mayor frutos produjo por debajo de aquellos obtenidos de plantas cultivadas a capacidad de campo, aunque no cumplían con el estándar de calidad para comercialización en fresco. La dosis de 200 mM de H_2O_2 induce en la variedad en estudio un incremento en la producción de capsaicina, dihidrocapsaicina y capsiato en fruto comparado con el control, y pudiera presentarse como una alternativa para incorporar a las agrocadenas los frutos que no alcanzan características para comercialización en fresco, dándoles un valor agregado por su contenido en bioactivos.

SUMMARY

This research study aims to suggest the foliar application of hydrogen peroxide (H₂O₂) as a biotechnological tool to induce tolerance to water deficit in jalapeño hot pepper crop (*Capsicum annuum* L.). Three doses of H₂O₂ were tested: 2, 20 o 200 mM (distilled water as control) and applied at 22 and 36 days after transplanting (DAT). After those applications, three levels of irrigation were set: field capacity (-10 a 0 kPa), water deficit (-30 a -60 kPa) and drought (-60 a -140 kPa), based on the water potential of the substrate. The experiment finished after the second harvest, 92 DAT. Among the physiological and genetic phenomena, treatment DH200 had the highest stomatal density and the highest levels of methylation of DNA; DH200 also produced the highest number of fruits, compared with yield obtained at field capacity, however, those fruits did not reach the quality standards for fresh market. The dose H₂O₂ 200 mM in this cultivar increases the levels of capsaicin, dihydrocapsaicin and capsiate compared with control, and it could be an option to include fruits with unmarketable quality for fresh market and commercialize them in the agroindustry due to the additional value in bioactive content.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro, a la Dra. Ana Angélica Feregrino (Laboratorio de Metabolitos y Nanocompositos, Facultad de Ingeniería campus Aeropuerto) y al Dr. Ramón Guevara (Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Facultad de Ingeniería campus Amazcala) por permitir realizar la presente investigación dentro de sus instalaciones, y por el apoyo en la ejecución y realización de este proyecto.

A CONACYT, por los fondos destinados a beca de manutención y proyectos.

A mis amigos y familia, a mis compañeros de maestría. Gracias.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de una planta de chile <i>Capsicum annuum</i> L. Elaboración propia, 2017.	3
Figura 2. Comportamiento de la intensidad de sequía y la afectación del territorio nacional (porcentual) durante el periodo 2003-2017. Fuente: Monitor de Sequía, 2017.	5
Figura 3. A) Distribución de zonas de sequía en el país (amarillo) para el 15 junio 2016. B) Distribución de zonas de cultivo de chile jalapeño (verde) en el país para el año agrícola (OI-PV) 2015. Fuente: Monitor de sequía de México (2017), Mapas dinámicos SIAP (2017).	6
Figura 4. Diferentes tipos de respuestas sistémicas en las plantas. Elaboración propia con información de Baxter <i>et al.</i> (2014).	8
Figura 5. Modelo propuesto para la transducción de la señal local y sistémica mediada por ROS. Fuente: Baxter <i>et al.</i> (2014).	9
Figura 6. Entrecruzamiento de los componentes MAPK. Cascada de MAPK en condiciones de sequía y en estrés oxidativo. Elaboración propia con información de Sihna <i>et al.</i> (2011).	10
Figura 7. Rutas de señalización mediadas por peróxido de hidrógeno. Fuente: Elaboración propia con información de Saxena <i>et al.</i> (2016)	11
Figura 8. Ruta metabólica de la biosíntesis de capsaicina. Fuente: Kim <i>et al.</i> (2014).	14
Figura 9. Rutas de inhibición de los reguladores maestros del desarrollo estomatal SPCH, MUTE y FAMA, mediada por MAPK: MKK4/5, MPK3/6. Fuente: Han y Torii (2016).	16
Figura 10. Colocación del sensor de humedad en suelo WATERMARK modelo 200SS. ...	22
Figura 11. A) Planta con cuatro hojas verdaderas (43 dds). B) Plantas en bolsas individuales con sistema de riego por goteo.	30
Figura 12. Apariencia de las hojas 24 horas posteriores a la aplicación foliar de las diferentes dosis de H ₂ O ₂ . A) Control: sin afectación. B) 2 mM: manchas blanquecinas en las hojas bajas. C) 20 mM: Quemaduras leves color café-rojizo en las zonas cóncavas del tejido vascular. D) 200 mM: Daño severo, quemaduras extensas y formación de agujeros. ...	30
Figura 13. A) Flor de chile, completamente desarrollada y con polen abundante en anteras. B) Flor polinizada con cuajado de fruto. C) Aborto de fruto.	31
Figura 14. Apariencia del follaje posterior a la segunda cosecha (92 ddt).	33
Figura 15. Diagrama propuesto para la inducción de la tolerancia a estrés hídrico. Elaboración propia, 2017.	34
Figura 16. Densidad estomatal a los 92 ddt. a) Superficie adaxial (haz) y b) Superficie abaxial (envés). Diferencias significativas: *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.001, control global: CC.	36
Figura 17. Densidad estomatal a los 92 ddt. a) Superficie adaxial (haz) y b) Superficie abaxial (envés). Diferencias significativas: *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.001, control global: CC.	38

Figura 18. Microfotografías del conteo estomatal a los 92 ddt observado al microscopio con aumento de 40X. Adaxial: a) CC, b) DH200, c) SQ2. Abaxial: d) CC, e) DH200, c) SQ2. Bar=50 μ m.	38
Figura 19. Contenido de clorofila en hojas superiores a los 92 ddt.	39
Figura 20 . Chiles de los diferentes tratamientos en la primera cosecha.....	40
Figura 21. Contenido total de fenoles (equivalentes de ácido gálico mg/g) y flavonoides (equivalentes de rutina mg/g) en hoja para tratamientos en déficit hídrico.	43
Figura 22. Contenido total de fenoles (equivalentes de ácido gálico mg/g) y flavonoides (equivalentes de rutina mg/g) en hoja para tratamientos en sequía.....	44
Figura 23. Contenido total de fenoles (equivalentes de ácido gálico mg/g) y flavonoides (equivalentes de rutina mg/g) en fruto para tratamientos en déficit hídrico.	46
Figura 24. Niveles de capsaicina, dihidrocapsaicina y capsaiato. El único tratamiento con presencia de los tres capsaicinoides es DH200, en niveles significativamente elevados con respecto al control, CC. ND: no detectable.	47
Figura 25. Niveles de expresión de <i>pal</i> y <i>sod</i> en diferentes tratamientos.	50
Figura 26. Niveles de metilación de DNA expresado en porcentaje de 5-metilcitosina (%5-metC), 10 días posteriores a la primera aplicación foliar de H ₂ O ₂	51
Figura 27. Temperaturas y radiación registradas en el invernadero durante el ciclo de cultivo Agosto-Diciembre 2016, desde 5 hasta 92 ddt.....	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características anatómicas (CONABIO, 2009).....	4
Cuadro 2. Indicadores económicos del cultivo de chile jalapeño en México durante el año agrícola 2015 (SIAP, 2016).....	6
Cuadro 3. Ficha técnica de chile jalapeño “Coronel” por HARRIS-MORAN ®	19
Cuadro 4. Fertilización para cultivo de chile.....	20
Cuadro 5. Registro de fechas importantes durante el ciclo de cultivo.	29
Cuadro 6. Altura, diámetro de tallo, número de hojas en función de la dosis de aplicación foliar de H ₂ O ₂ y régimen de irrigación a los 92 ddt (segunda cosecha). Control general: capacidad de campo asperjado solo agua (CC).....	32
Cuadro 7. Modificación en densidad estomatal ante sequía en diferentes especies de plantas.	35
Cuadro 8. Número de frutos comerciales y no comerciales en función de la dosis de aplicación foliar de H ₂ O ₂ y régimen de irrigación.	40
Cuadro 9. Peso y longitud y promedio de frutos comerciales y no comerciales en función de la dosis de aplicación foliar de H ₂ O ₂ y régimen de irrigación. Control estadístico: Capacidad de campo asperjada solo agua (CC).	41
Cuadro 10. Parámetros de color medidos y calculados para frutos comerciales y no comerciales en función de la dosis de aplicación foliar de H ₂ O ₂ y régimen de irrigación. Control estadístico: Capacidad de campo asperjada solo agua (CC).	42
Cuadro 11. Valores de fenoles y flavonoides reportados para frutos de <i>C. annuum</i>	46
Cuadro 12. Valores de capsaicinoides reportados para <i>Capsicum</i> spp.....	48
Cuadro 13. Estructuras de los principales capsaicinoides sintetizados en <i>Capsicum</i> spp....	49
Cuadro 14. Jerarquía Taxonómica de <i>Capsicum annuum</i> L. (ITIS, 2016).....	62
Cuadro 15. Porcentaje de metilación de 5-metilcitosina del DNA genómico (%5-metC) 10 días posteriores a la primera aplicación de H ₂ O ₂ . Control: Capacidad de campo asperjado solo agua (CC).....	66

Índice

RESUMEN	I
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE CUADROS	VI
1 INTRODUCCIÓN	1
2 PERSPECTIVA DE APLICACIÓN	2
3 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	3
3.1 <i>CAPSICUM ANNUUM</i> L.: DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y CONDICIONES AMBIENTALES PARA SU CULTIVO ..	3
3.2 PANORAMA DE LA SEQUÍA EN LAS REGIONES CHILERAS DE MÉXICO: CASO CHILE JALAPEÑO	4
3.3 PERCEPCIÓN DEL ESTÍMULO Y RESPUESTA A ESTRÉS.....	7
3.4 LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS) Y SU PAPEL COMO SEÑALES DE RESPUESTA AL ESTRÉS ABIÓTICO.....	8
3.5 GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS ABIÓTICO POR SEQUÍA.	12
3.6 METABOLITOS DE RESPUESTA A ESTRÉS CON ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DESINTOXICANTE.	12
3.6.1 <i>Superóxido dismutasa (SOD)</i>	12
3.6.2 <i>Catalasa (CAT)</i>	13
3.6.3 <i>Fenilalanina amonio liasa (PAL)</i>	13
3.7 METABOLITOS DE RESPUESTA A ESTRÉS CON PROPIEDADES BIOACTIVAS.	13
3.7.1 <i>Fenoles y flavonoides</i>	13
3.7.2 <i>Capsaicinoides</i>	14
3.8 INFLUENCIA DEL ESTRÉS ABIÓTICO EN LA CONCENTRACIÓN DE METABOLITOS BIOACTIVOS EN <i>CAPSICUM ANNUUM</i> L.....	15
3.9 CAMBIOS FENOTÍPICOS COMO RESPUESTA AL ESTRÉS ABIÓTICO	15
3.9.1 <i>Desarrollo estomatal</i>	15
3.10 APLICACIONES FOLIARES DE H ₂ O ₂ COMO HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA ANTE LA SEQUÍA Y SU RELACIÓN CON LA HÓRMESIS	17
4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	18
4.1 HIPÓTESIS	18
4.2 OBJETIVO GENERAL	18
4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
5 MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1 SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	19
5.1.1 <i>Siembra y germinación del material vegetal</i>	19
5.1.2 <i>Manejo agronómico de las plantas de chile jalapeño</i>	20
5.1.3 <i>Localización del experimento</i>	21
5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL	21
5.3 APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS	22
5.4 MEDICIÓN DE VARIABLES DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LA PLANTA.	22
5.4.1 <i>Inicio y duración de las etapas fenológicas</i>	22
5.4.2 <i>Morfología de la planta por etapa fenológica</i>	23
5.4.3 <i>Densidad estomatal</i>	23
5.4.4 <i>Selección y recolección de muestras</i>	23

5.5	ANÁLISIS REALIZADOS A LAS MUESTRAS	24
5.6	ANÁLISIS MOLECULARES	24
5.6.1	<i>Extracción de DNA</i>	24
5.6.2	<i>Extracción de RNA</i>	24
5.6.3	<i>Niveles de metilación de DNA genómico</i>	25
5.6.4	<i>RT-PCR para identificación de sod, pal y cat</i>	25
5.7	IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS DE RESPUESTA A ESTRÉS CON PROPIEDADES BIOACTIVAS: CAPSAICINOIDES TOTALES, FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES.	27
5.7.1	<i>Extracto metanólico</i>	27
5.7.2	<i>Determinación de Fenoles Totales</i>	27
5.7.3	<i>Determinación de Flavonoides Totales:</i>	27
5.7.4	<i>Determinación de Capsaicinoides Totales:</i>	28
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
6.1	FENOTIPO	29
6.1.1	<i>Desarrollo de los órganos de la planta: hoja, flor y fruto</i>	29
6.1.2	<i>Dimensiones de la planta</i>	32
6.1.3	<i>Densidad estomatal</i>	34
6.1.4	<i>Clorofila</i>	39
6.2	CALIDAD DE FRUTO	39
6.2.1	<i>Frutos comerciales y no comerciales (dimensiones) y color de cáliz</i>	39
6.3	DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	43
6.3.1	<i>Contenido total de fenoles y flavonoides en hoja</i>	43
6.3.2	<i>Contenido total de fenoles, flavonoides y capsaicinoides en fruto</i>	45
6.4	EXPRESIÓN DE GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS <i>SOD, PAL Y CAT</i>	50
6.5	NIVELES DE METILACIÓN DE DNA GENÓMICO.....	51
7	CONCLUSIONES	52
8	LITERATURA CITADA	53
	ANEXOS	62

1 INTRODUCCIÓN

La agricultura está cambiando. Desde la perspectiva de ciencia y tecnología, los nuevos modelos de producción de cultivos no solo están migrando hacia la agricultura de precisión, sino también en favor de la producción sostenible; en el planeta se proyecta una población de 9 billones de habitantes para 2050 y habrá que asegurar suficiente alimento sin comprometer los recursos naturales (Deinlein *et al.*, 2014; Tendall & Gaillard, 2015). La investigación agronómica está centrando el objetivo en el manejo agronómico con fundamento científico. Los retos: incrementar producción, o al menos mantenerla, cultivar plantas resistentes a ambientes desfavorables y al mismo tiempo, proveer alimentos con potencial bioactivo que beneficie la salud del consumidor (Wahyuni *et al.*, 2011; Mulero *et al.*, 2015; Hamilton *et al.*, 2016).

Sin embargo, la supervivencia de los cultivos y por ende la productividad, son constantemente amenazados por los efectos del cambio climático. Los fenómenos meteorológicos, tanto en intensidad como duración, son cada vez más impredecibles, y su incidencia errática supone un problema complejo y prioritario por atender (Altieri *et al.*, 2015; Latham *et al.*, 2015). En el periodo 2003-2013, más del 50 % de pérdidas materiales de cultivos fueron ocasionadas por inundaciones, mientras que las mayores pérdidas económicas corresponden a las sequías (84% del total de pérdidas), equivalentes a US\$11 mil millones (FAO, 2015).

Para el sector productivo lo anterior significa solo una cosa: confrontar el problema y buscar soluciones para esta problemática global. Desde nuestra orilla, podemos hacer nuestra labor a través del quehacer científico. Abogando por las respuestas naturales de las plantas, es posible encontrar aplicaciones basadas en la plasticidad biológica, es decir, en las características evolutivas que tienen las plantas para tolerar, en cierta medida, situaciones de estrés medioambiental. La manera en que ellas responden es a través de la síntesis de una amplia variedad de metabolitos especializados en funciones protectoras, inducidos precisamente por la exposición a estrés biótico o abiótico (Hadacek *et al.*, 2011; Poschenrieder *et al.*, 2013).

Surgen entonces dos preguntas de investigación que justifican el trabajo aquí expuesto: ¿Es posible utilizar metabolitos especializados en la respuesta a estrés, aplicarlos exógenamente a los cultivos e inducir resistencia/tolerancia a condiciones medioambientales desfavorables? Si estos metabolitos protegen a la planta, ¿Será posible que aquellos presentes en el fruto tengan propiedades bioactivas con potencial nutracéutico? De ahí que se desprenda la metodología pertinente para buscar responder ambas cuestiones. En lo posterior, el trabajo se centra en tres ejes de estudio principales: contexto económico y medioambiental del material vegetal en estudio, respuestas metabólicas y genéticas derivadas de la aplicación del compuesto inductor de la respuesta de defensa y análisis de los eventos fenotípicos, metabólicos y genéticos derivados de la aplicación del compuesto inductor.

Con este trabajo se busca describir los efectos genéticos, metabólicos y fenotípicos que tiene la aplicación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en plantas de chile jalapeño, cultivo que representa el 34 % de la producción nacional de chile verde (SIAP, 2016), con el objetivo de activar un estado de defensa, conferir tolerancia al estrés hídrico por sequía y favorecer la producción de compuestos bioactivos en fruto.

2 PERSPECTIVA DE APLICACIÓN

El utilizar sustitutos a los agroquímicos, como pudiera ser el H_2O_2 , es también una ventana de oportunidad para disminuir los riesgos de contaminación química del suelo, así como una reducción de las implicaciones negativas hacia la salud de los agricultores y consumidores. Anualmente son cerca de 30 millones de jornales implicados en el ciclo productivo del chile en México, por lo cual un manejo agronómico alternativo pudiera beneficiar a este vasto número de trabajadores al reducir el riesgo de enfermedades ocupacionales derivadas del uso excesivo de agroquímicos. La estimulación por elicitores favorece la presencia de bioactivos en frutos, y si éstos se utilizan en productos de consumo regular, se abre una ventana para la disminución de enfermedades derivadas de la dieta, tales como las Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT) ya que la Secretaría de Salud estima que el 84 % de las muertes del país se deben a ECNT y lesiones (PAHO, 2015), pudiendo las primeras ser prevenidas por una correcta alimentación, por lo cual la agricultura de vanguardia pretende no solo mantener los rendimientos sino también proporcionar un componente nutracéutico que aporte beneficios a la salud de los consumidores.

3 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

El presente capítulo trata dos temas principales: por un lado, abarca el contexto de la producción de chile en México, planteando la importancia tanto económica como nutricional al ser un producto de la canasta básica y cómo la sequía resulta ser un problema que afecta la productividad del cultivo. Posteriormente, se desglosa la respuesta a estrés en plantas y la propuesta de utilizar compuestos elicitores como recurso biotecnológico para inducir tolerancia a estrés abiótico; específicamente se abordan los cambios provocados por especies reactivas del oxígeno (ROS), particularmente peróxido de hidrógeno (H_2O_2), desde la transducción de la señal en la planta hasta los cambios originados en tres niveles: fenotipo, metabolismo y material genético como parte de la plasticidad biológica para hacer frente a estrés por sequía.

3.1 *Capsicum annuum* L.: descripción botánica y condiciones ambientales para su cultivo

Actualmente se conocen alrededor de 30 especies de chile distribuidas en todo el mundo, aunque solo cinco son cultivadas o domesticadas: *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense*, *Capsicum baccatum* y *Capsicum pubescens*. Entre ellas, *Capsicum annuum* L. es la más ampliamente conocida y la de mayor importancia económica (Figura 1), ya se cultiva a nivel mundial (CONAPROCH, 2014).

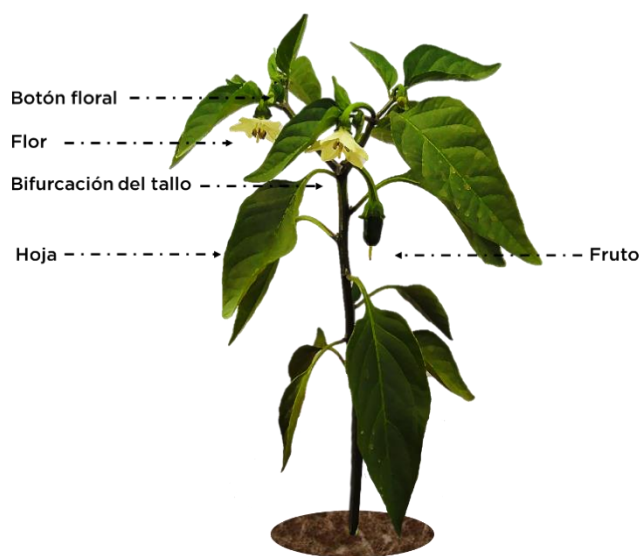


Figura 1. Anatomía de una planta de chile *Capsicum annuum* L. Elaboración propia, 2017.

Capsicum annuum L. es una especie herbácea perenne (Cuadro 1), aunque suele cultivarse como anual; florece de mayo a agosto y fructifica desde julio hasta noviembre. Es una especie capaz de la autopolinización. Para que la planta de chile se desarrolle adecuadamente requiere una temperatura media de 24 °C, germina en un periodo de 9 a 12 días entre los 21 a 30 °C; requiere suelos de textura areno-arcillosos con alta retención de humedad, con pH entre 6.3 a 7.0; es una planta poco tolerante a la salinidad. La humedad relativa para su cultivo es de 50 a 70 por ciento (CONABIO, 2009; Montes-Hernández, 2010).

Cuadro 1. Características anatómicas (CONABIO, 2009).

Región anatómica	Características
Follaje	Arbustivo, alcanza los 80 a 100 cm de altura. Los tallos son glabrescentes ramificados con hojas ovaladas, pecioladas, solitarias o por pares.
Sistema radicular	Voluminosa y pivotante, con numerosas raíces adventicias.
Flores	Pueden ser solitarias o formar grupos de escasos números, erectas o algo penduladas, nacen en la axila de las hojas del tallo. La corola es pequeña y constan de 5 a 7 pétalos, de color blanco, finamente denticulados en los bordes. Las anteras suelen ser purpúreas.

3.2 Panorama de la sequía en las regiones chileras de México: caso chile jalapeño

Internacionalmente, el chile es la segunda solanácea más importante justo por debajo de la producción de tomate. 31 millones de toneladas de chile verde y pimiento fueron producidas en 1.9 millones de hectáreas alrededor del mundo durante el periodo 2010-2015, siendo China, México y Turquía los principales países productores (Diao *et al.*, 2016; FAO, 2016). México es el segundo productor mundial de chile verde y el tercer exportador de chile fresco, con un valor generado a nivel nacional de 17.8 mil millones de pesos anuales, posición debida a la participación de 12 mil productores, los cuales generan empleo para 30 millones de jornales anualmente (Díaz, 2015; SAGARPA, 2015).

En un estudio realizado en 2009, la FAO proyectó que para 2020 nuestro país entraría en la zona de riesgo de pérdidas económicas debidas a sequía, proyectando que los estados donde se presentarían incremento en intensidad de este fenómeno meteorológico serían Sinaloa, Chihuahua, Sonora, Veracruz, Michoacán y Estado de México, siendo el escenario más drástico durante el periodo 2010-2011, donde un 70 % de la superficie nacional fue afectada por intensa sequía (FAO, 2009; Federman *et al.*, 2014). Los datos actuales indican concordancia con las predicciones realizadas en aquel entonces (Figura 2). Los registros más recientes presentados en la plataforma de Monitor de Sequía de México, con datos desde 2014 a 2016, indican que los estados de la república con un índice de sequía moderada a extrema coinciden con los reportados por la FAO (2009), con excepción del Estado de México.

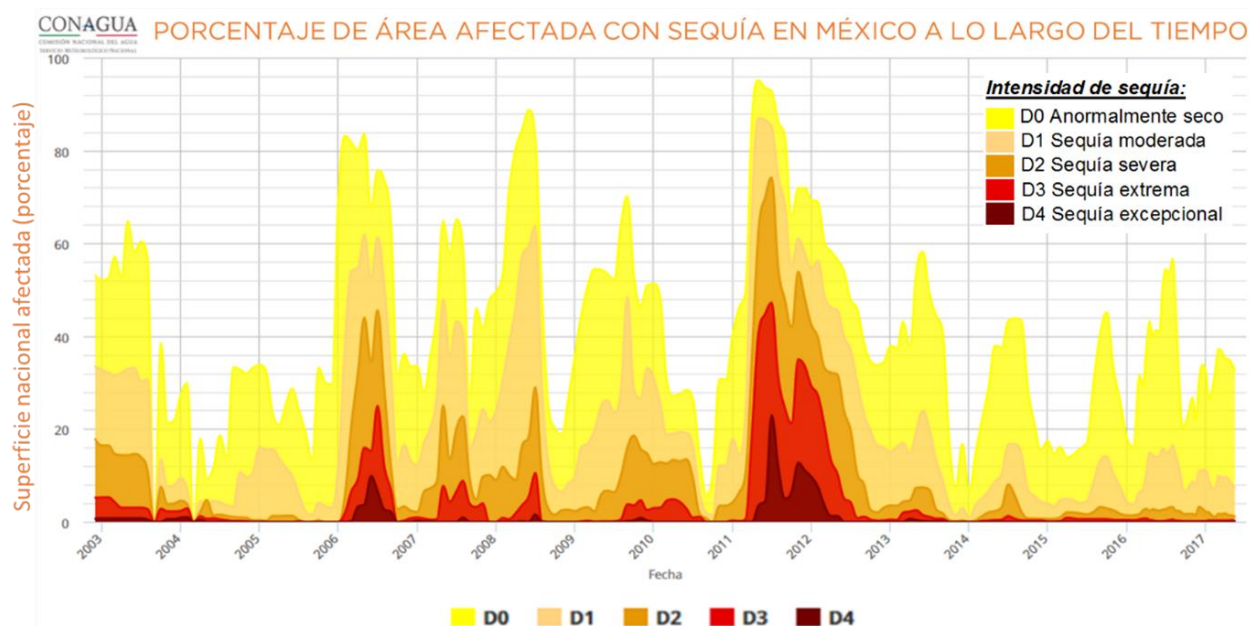


Figura 2. Comportamiento de la intensidad de sequía y la afectación del territorio nacional (porcentual) durante el periodo 2003-2017. Fuente: Monitor de Sequía, 2017.

Para el reporte de cierre agrícola 2015 (año agrícola primavera-verano + otoño-invierno), los estados de mayor producción de chile verde fueron Sinaloa (547 mil 285 ton), Chihuahua (732 mil 299 ton) San Luis Potosí (220 mil 106), Sonora (103 mil 707) y Zacatecas (214 mil 325) (SIAP, 2016), por lo que los estados referentes en producción chilera se encuentran en regiones azoradas por escenarios de sequía (SIAP, 2016) (Figura 3).

De la superficie destinada a la producción de este cultivo, el 87.15 por ciento de la superficie sembrada se cultiva bajo régimen de riego y el 12.85 por ciento restante como temporal. Al cierre agrícola de 2015, la variedad que destacó con mayor producción fue chile jalapeño (Cuadro 2) con 30.45 mil ha sembradas: 81.07 por ciento de riego y 18.93 por ciento de temporal (SIAP, 2016).

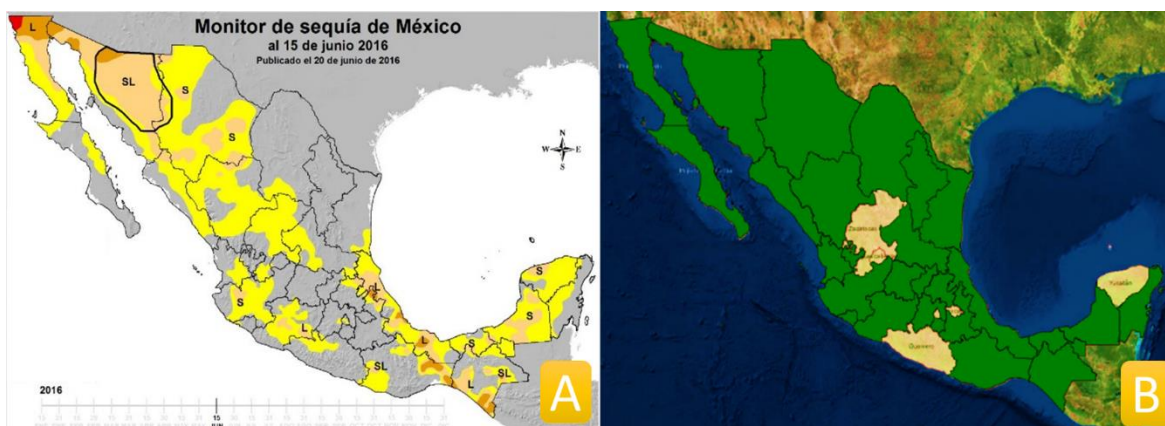


Figura 3. A) Distribución de zonas de sequía en el país (amarillo) para el 15 junio 2016. B) Distribución de zonas de cultivo de chile jalapeño (verde) en el país para el año agrícola (OI-PV) 2015. Fuente: Monitor de sequía de México (2017), Mapas dinámicos SIAP (2017).

Cuadro 2. Indicadores económicos del cultivo de chile jalapeño en México durante el año agrícola 2015 (SIAP, 2016).

Cultivo	Superficie sembrada (ha)	Superficie sembrada (ha)	Superficie sembrada (ha)	Producción (ton)	Rendimiento (ton/ha)	Valor Producción (miles de pesos)
Jalapeño	30,409.74	30,148.74	261	836,246.34	27.74	4,791,179.93
Jalapeño invernadero	13.08	13.08	0	727	55.58	4,192.76
Jalapeño malla sombra	20	20	0	1,600.00	80	9,072.00
Jalapeño orgánico	7.5	7.5	0	97	12.93	1,010.58
TOTAL	30,450.32	30,189.32	261.00	838,670.34	176.25	4,805,455.27

La superficie sembrada de chile verde se encuentra distribuida en todo el territorio nacional, lo cual implica que los 12 de los 13 organismos de cuenca del país abastezcan la producción de este cultivo, por lo cual también se debe racionar el recurso para evitar afectaciones a las cuencas (CONAGUA, 2014).

3.3 Percepción del estímulo y respuesta a estrés

Los mecanismos de respuesta a estrés inician con la percepción del estímulo, continúan con la transducción de la señal a los compartimentos celulares, posteriormente la expresión de genes que codifican para metabolitos antioxidantes y enzimas desintoxicantes, y finalmente, cambios metabólicos y a nivel fenotipo que favorecen la tolerancia al estrés (Lata y Prasad, 2011). Cuando la planta detecta un peligro biológico o ambiental, dependiendo del tipo de estímulo que reciba, activará diferentes respuestas de defensa; estos estímulos comprenden los siguientes patrones (Henry *et al.*, 2012):

- A) **Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs)**, los cuales se refieren a agentes infecciosos.
- B) **Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos (MAMPs)**, representan la elicitación ante la presencia de un microorganismo no patogénico.
- C) **Patrones Moleculares Asociados al Daño (DAMPs)**, ocurren cuando la planta reconoce fragmentos de su anatomía en zonas donde no pertenecen.

Dependiendo del patrón o agente estresor, la respuesta puede derivar en dos tipos: localizada o sistémica. Cuando es localizada se conoce como Respuesta Localizada Adquirida (LAR), y es aquella que ocurre alrededor del sitio puntual de la infección (Henry *et al.*, 2012). La planta también puede desencadenar una reacción de inmunidad y respuesta a estrés, la cual es sistémica y puede categorizarse de la siguiente manera (Figura 4) (Baxter *et al.*, 2014):

- A) **Respuesta Sistémica Adquirida (SAR)**, involucra la emisión de señales moleculares a órganos distales, dando una protección generalizada y de larga duración ante la presencia de PAMPs.
- B) **Aclimatación Sistémica Adquirida (SAA)**, es la respuesta a larga distancia análoga a SAR, pero surge cuando la planta está expuesta a un estrés abiótico.

C) **Respuesta metabólica sistémica**, es activada por cambios en los niveles de azúcares, fosfatos y otros metabolitos.

D) **Respuesta Sistémica del desarrollo**, ocurre cuando existen cambios en las condiciones de iluminación y CO₂ atmosférico. El crecimiento y distribución estomatal son coordinadas en las nuevas hojas en desarrollo.

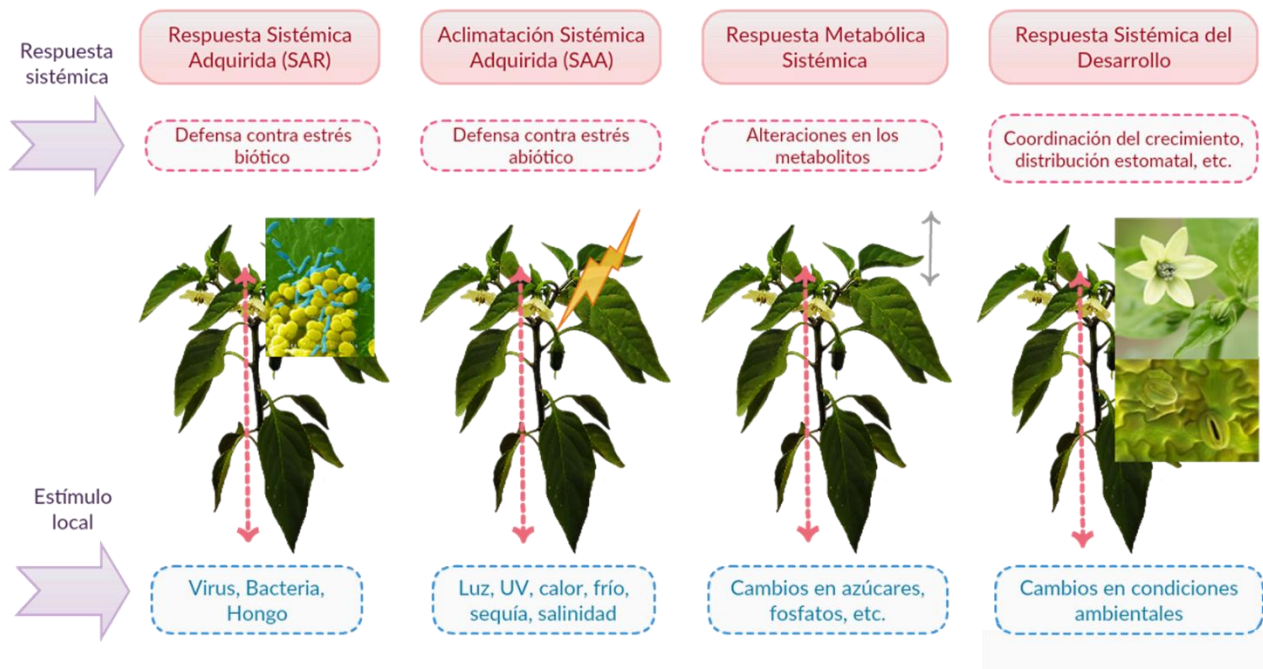


Figura 4. Diferentes tipos de respuestas sistémicas en las plantas. Elaboración propia con información de Baxter *et al* (2014).

3.4 Las Especies Reactivas del Oxígeno (ROS) y su papel como señales de respuesta al estrés abiótico

Recientemente se ha agregado a las especies reactivas de oxígeno (ROS) como señales de respuesta a estrés abiótico, las cuales modifican la regulación genética y la actividad enzimática (Cramer *et al.*, 2011). Las ROS se generan a partir de varias etapas de reducción de un oxígeno molecular y las especies más comunes son el anión O₂⁻, el radical hidroxilo OH• y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Thakur y Sohal, 2013); de forma ordinaria, los electrones fluyen en la cadena de transporte de la fotosíntesis y la respiración; cambios en este flujo origina la formación del anión O₂⁻ y de H₂O₂ (Hadacek *et al.*, 2011).

Por sus propiedades químicas, las ROS son altamente reactivas y pueden dañar proteínas, clorofilas, lípidos de membrana y ácidos nucleicos, por lo cual la célula mantiene la concentración de ROS en niveles no tóxicos, denominado estrés oxidativo controlado (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012). Es así que a concentraciones bajas de ROS, éstas funcionan como poderosas señales moleculares involucradas en la respuesta de aclimatación y se relaciona estrechamente con las redes redox y hormonales de la planta. Además, las ROS sirven como señales de propagación rápida y a larga distancia implicadas en una respuesta sistémica al estrés. El estrés local inicia eventos de rápida señalización tales como el incremento del Ca^{2+} citosólico, producción de ROS, y activación de señales metabólicas de estrés específico, ocurriendo esto en segundos o minutos. Estas señales son propagadas por la planta y activan la defensa/ aclimatación para finalizar con cambios en el crecimiento y desarrollo involucrados en la supervivencia (Figura 5) (Baxter *et al.*, 2014; Cabello *et al.*, 2014; Zorov *et al.*, 2014).

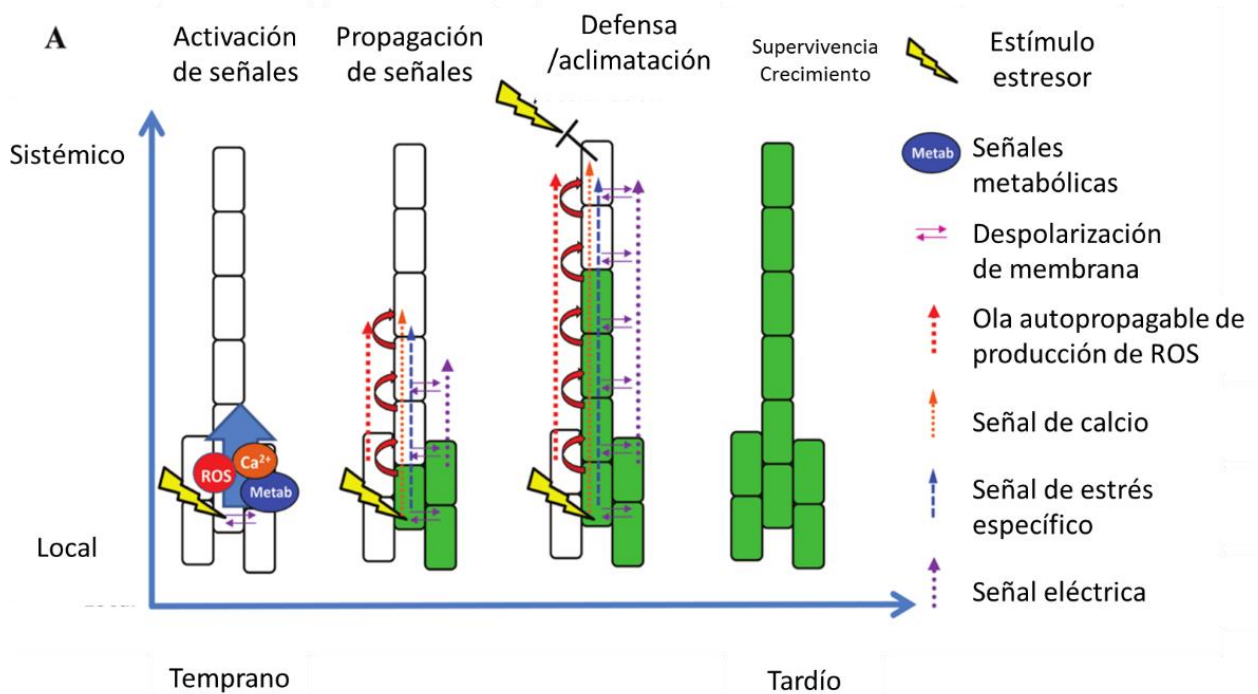


Figura 5. Modelo propuesto para la transducción de la señal local y sistémica mediada por ROS. Fuente: Baxter *et al* (2014).

Otras investigaciones sugieren que el H₂O₂ no solo juega un papel en las rutas de protección celular, sino también en las rutas de crecimiento y desarrollo (Baxter *et al.*, 2014). Esta molécula sirve como un mediador clave de activación de Ácido Abscísico (ABA), un tipo de regulador de crecimiento involucrado en la respuesta a estrés osmótico (Mejía-Teniente *et al.*, 2013). Los genes inducidos por ABA incluyen aquellos que codifican proteínas como las proteínas de embriogénesis tardía (LEA, por sus siglas en inglés), una variedad de enzimas clave en la síntesis de osmoprotectores. Los genes inhibidos o regulados negativamente por ABA están involucrados en el desarrollo y crecimiento (Fujita *et al.*, 2011).

Actualmente se tiene evidencia que el H₂O₂ activa la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés), las cuales son la ruta de señalización más importante en la transmisión de un estímulo biológico desde la membrana celular hasta el núcleo (Son *et al.*, 2011).

La cascada de las MAPK es conservada en eucariotas y está compuesta por al menos tres componentes: MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK/MAP3K), MAP quinasa quinasa (MAPKK/MAP2K) y MAP quinasa (MAPK), los cuales actúan por medio de fosforilaciones para llevar la señal desde el exterior hasta el núcleo. Las MAPK están involucradas en la señalización del desarrollo de la planta, en la respuesta hormonal y en la respuesta a estrés biótico o abiótico. Si bien la forma en que las ROS activan a MAPK permanece sin revelarse, se sabe que las ROS activan a MPK3 y MPK6 (Figura 6 y Figura 7) (Sinha *et al.*, 2011).

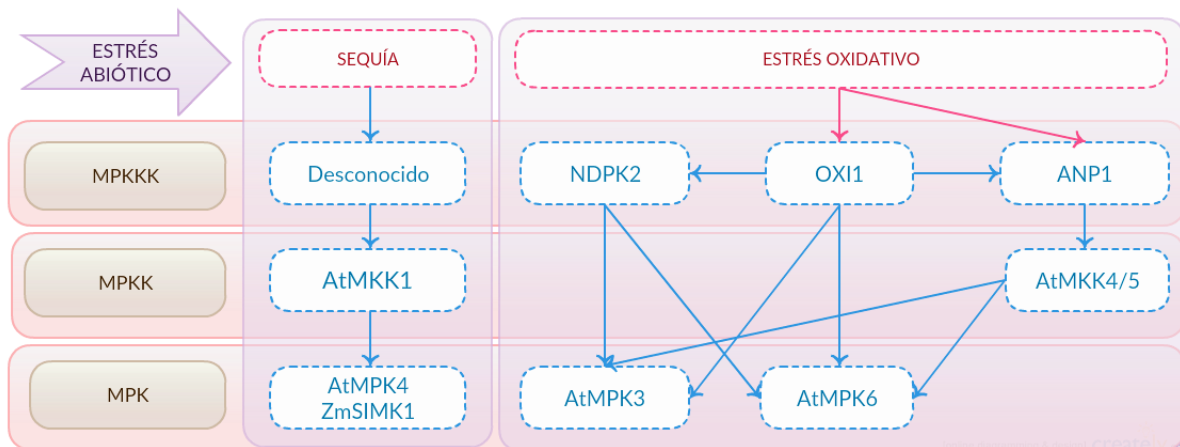


Figura 6. Entrecruzamiento de los componentes MAPK. Cascada de MAPK en condiciones de sequía y en estrés oxidativo. Elaboración propia con información de Sinha *et al* (2011).

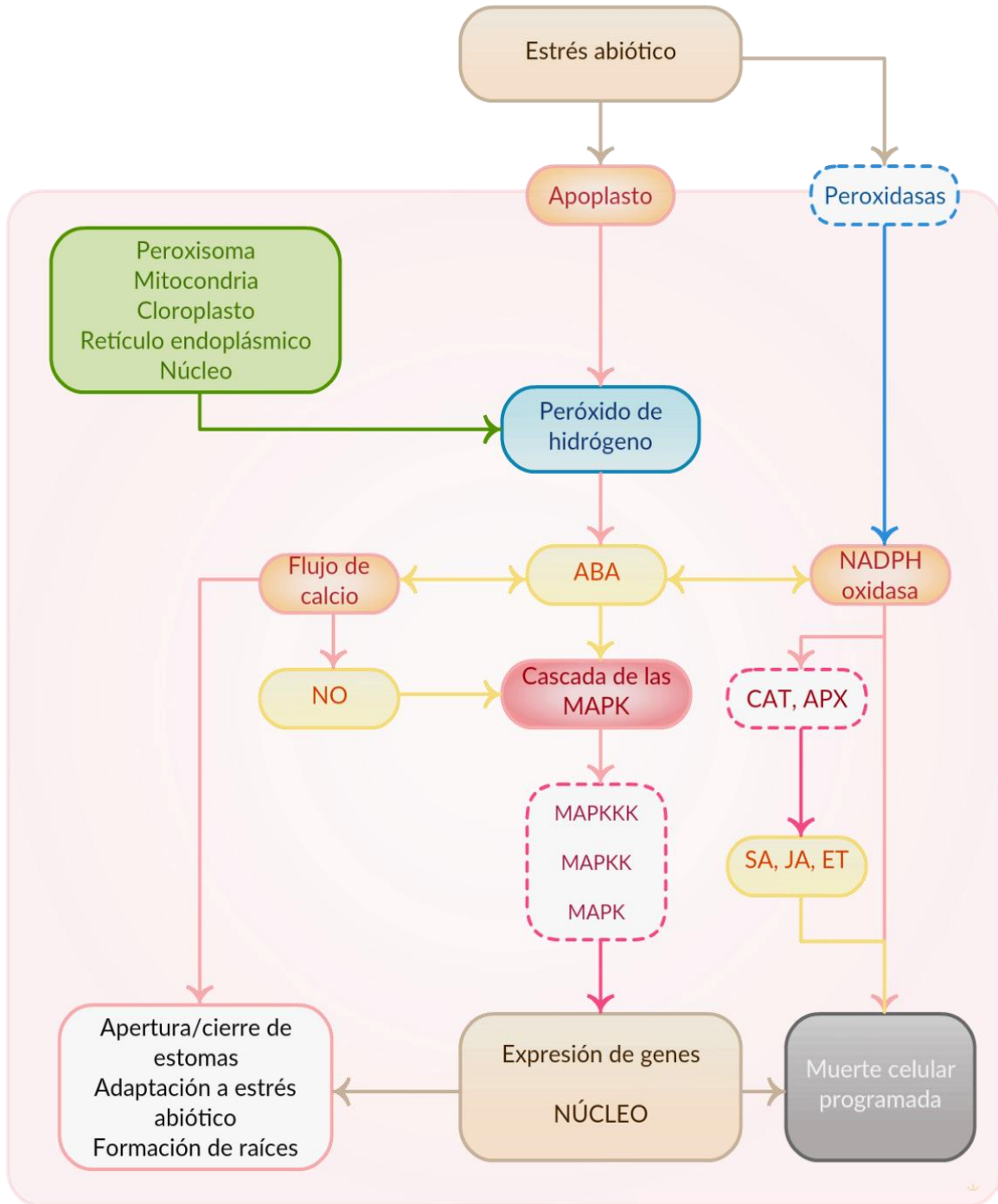


Figura 7. Rutas de señalización mediadas por peróxido de hidrógeno. Fuente: Elaboración propia con información de Saxena *et al.* (2016).

3.5 Genes de respuesta a estrés abiótico por sequía.

El análisis transcriptómico a gran escala clasifica a los genes de respuesta a estrés en dos grupos (Lata y Prasad 2011):

1. Genes que codifican para proteínas que protegen a la célula de los efectos de estrés hídrico.
2. Genes que codifican para proteínas reguladoras de transducción de señales y de la expresión de los genes de respuesta a estrés.

En el primer grupo, se encuentran genes que expresan enzimas desintoxicantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa (GXT), ascorbato peroxidasa (AXT), las cuales sirven como protección y estabilización de estructuras celulares ante posible daño por especies reactivas de oxígeno (Lata y Prasad 2011; Krasensky y Jonak, 2012). En tejidos vivos, estas ROS son reducidas por ascorbato y glutatión, en concreto mediante las enzimas SOD y CAT (Hadacek *et al.*, 2011).

3.6 Metabolitos de respuesta a estrés con actividad enzimática desintoxicante.

Para evitar el estrés oxidativo descontrolado, los mecanismos de la célula consisten en primera instancia en la activación de SOD, CAT y peroxidasas (Sunkar *et al.*, 2012).

3.6.1 Superóxido dismutasa (SOD)

Las SOD son las primeras en actuar ante la presencia de concentraciones tóxicas de aniones O_2^- y los convierten en H_2O_2 . Durante estrés abiótico, los genes de SOD son inducidos por el exceso de aniones O_2^- . La regulación genética en *Arabidopsis* muestra que los genes que codifican para las SOD citosólicas (CSD1) y cloroplásticas (CSD2) inducidas por Cu-Zn, son normalmente suprimidas por un tipo de microRNA denominado miR398. Ante estrés oxidativo, los niveles de miR398 decrecen y por ende, se incrementa el nivel de los transcritos de CSD1 y CSD2 (Leng *et al.*, 2017).

3.6.2 Catalasa (CAT)

La producción de enzima catalasa se realiza a través de intrincadas redes regulatorias de la planta y su estado redox. Un posible mecanismo es que el H₂O₂ que proviene de la β-oxidación, de la acción de las SOD y de la fotorespiración, se almacena en el peroxisoma; desde ahí viaja al núcleo como señal y activa los genes de producción de catalasas; estas viajan hacia el peroxisoma y estabilizan al H₂O₂ (Mhamdi *et al.*, 2012).

3.6.3 Fenilalanina amonio liasa (PAL)

En plantas de *Capsicum* cultivadas bajo estrés hídrico por sequía, se descubrió que PAL es la enzima crítica en la biosíntesis de capsaicinoides puesto que su actividad se incrementó en relación positiva al contenido de capsaicinoides de diferentes variedades de chile picante examinadas (Phimchan *et al.*, 2014).

3.7 Metabolitos de respuesta a estrés con propiedades bioactivas.

El estado celular redox es la suma de moléculas oxidativas y reductoras; actúa como un sensor de perturbaciones ambientales, pero también como un amortiguador de estas perturbaciones para mantener la homeostasis; entre las moléculas con esa función se encuentran proteínas antioxidantes como la tioredoxina o la glutaredoxina, y metabolitos especializados como los fenoles, flavonoides, aminoácidos, ascorbato, carotenoides y tocoferoles, todos ellos conocidos por sus propiedades promotoras de la salud (Wahyuni *et al.*, 2011; Kissoudis *et al.*, 2014).

3.7.1 Fenoles y flavonoides

Los fenoles son compuestos que contienen uno o más anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilos; son los metabolitos secundarios más abundantes en las plantas, pudiendo encontrar hasta 8,000 estructuras actualmente conocidas. Entre los numerosos grupos destacan los ácidos fenólicos, flavonoides y taninos. Poseen excelentes actividades antioxidantes y son conocidos por su acción biológica específica en la prevención y/o tratamiento de enfermedades (Dai y Mumpler, 2010). La biosíntesis de flavonoides antioxidantes incrementa en plantas más sensibles al estrés que en aquellas tolerantes al

estrés; las plantas sensibles al estrés muestran una primera línea de defensa contra las ROS mucho menos eficiente, y subsecuentemente están expuestas a un mayor estrés oxidativo (Agati *et al.*, 2012). Se ha visto que solo la radiación UVB, pero no la temperatura, aplicaciones de ácido salicílico, o la interacción de estos factores, tuvo efecto significativo en el contenido de flavonoides (Martel y Qaderi, 2016).

3.7.2 Capsaicinoides

Los capsaicinoides son un grupo de alcaloides responsables de la sensación de calor al consumir chile, conocida como pungencia. La capsaicina, dihidrocapsaicina y norhidrocapsaicina constituyen los principales capsaicinoides, los cuales son producidos exclusivamente en las glándulas de la placenta del fruto. Se ha encontrado que los capsaicinoides tienen propiedades antifúngicas y antimicrobianas, y brindan beneficios a la salud humana, tales como inhibir varios tipos de cáncer y como analgésicos para la artritis. Aunque aún quedan rutas por esclarecer, los capsaicinoides son un buen modelo para la investigación evolutiva de los metabolitos secundarios (Figura 8) (Kim *et al.*, 2014). Algunos compuestos involucrados en la biosíntesis de capsaicina son PAL, la cinámico-4-hidroxilasa (C4H), la capsaicina sintasa (CS) y peroxidasa (POD).

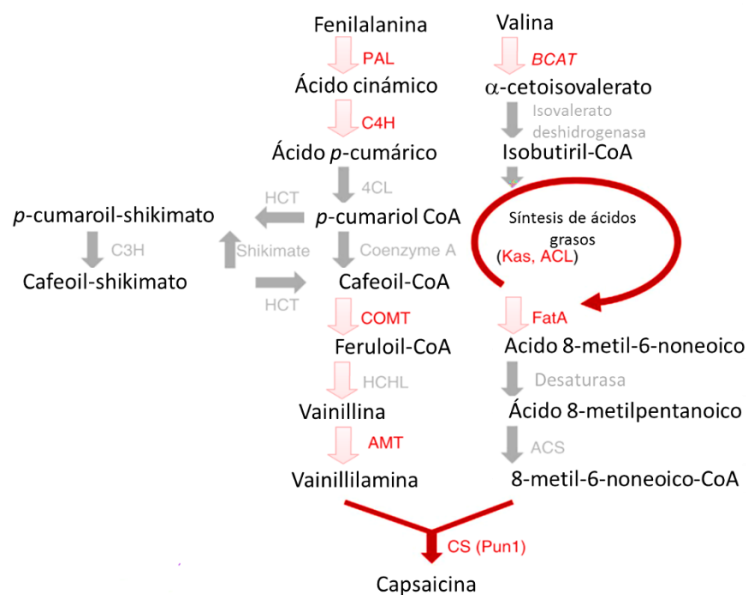


Figura 8. Ruta metabólica de la biosíntesis de capsaicina. Fuente: Adaptación Kim *et al* (2014).

3.8 Influencia del estrés abiótico en la concentración de metabolitos bioactivos en *Capsicum annuum* L.

Los frutos de chile son una fuente rica en metabolitos con propiedades potencialmente benéficas para la salud, tales como los carotenoides, ácido ascórbico, tocoferoles, flavonoides y capsaicinoides (Wahyuni *et al.*, 2011), destacando *Capsicum annuum* L. con mayores propiedades antioxidantes comparadas con aquellas de *Capsicum baccatum*, *Capsicum chacoense* y *Capsicum chinense* (Loizzo *et al.*, 2015). La especie *Capsicum annuum* L. contiene nutrientes esenciales y compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antivirales, anti-inflamatorias y anti-cancerígenas. Es fuente de vitamina C, vitamina E, provitamina A, fenoles, carotenoides y capsaicinoides (Materska, 2014).

Se ha encontrado que el estrés abiótico puede modificar las concentraciones de bioactivos en los frutos. Al analizar la expresión de los genes clave en la biosíntesis de capsantina, un carotenoide en gran parte responsable del intenso color rojo en frutos de pimiento, se encontró que la transcripción de los genes *Lcyb* y *Crtz* es altamente sensible al estrés hídrico. La sequía inhibió significativamente la expresión de estos genes en las etapas tempranas y medias del desarrollo de fruto, lo cual pudo estar detrás de la reducción de la síntesis de capsantina (Tian *et al.*, 2014). En otros estudios se ha encontrado una relación entre la concentración de bioactivos, la estación del año en que se realiza el cultivo y el grado de madurez del fruto. Las concentraciones de ácido ascórbico y capsaicinoides son mayores en frutos maduros (Bae *et al.*, 2014).

3.9 Cambios fenotípicos como respuesta al estrés abiótico

3.9.1 Desarrollo estomatal

Los estomas son pequeños poros regulables ubicados en la epidermis de las plantas, los cuales permiten el intercambio de gases. En trabajos previos, se ha demostrado que el desarrollo estomatal en *Arabidopsis* está regulado por la cascada de las MAPK, entre ellos los componentes destacables son: MAP2K YDA, MKK4, MKK5, y las MPK3 y MPK6 (Figura 9). La activación de estos módulos de MAPK inhibe la entrada de las células de empalizada hacia linaje estomatal (Han y Torii, 2016).

El Componente Represivo Policombo 2 (PRC2) y el Grupo Tritorax (TrxG) son proteínas conocidas por reprimir o activar la transcripción genética de forma epigenética. Las diferencias en la metilación del DNA genómico han sido investigadas como base en un posible rol en la memoria del estrés por sequía, sin embargo, aún no se ha encontrado una correlación entre la expresión genética y los niveles de metilación del DNA en *A. thaliana* (Colaneri y Jones, 2013).

Durante el desarrollo estomatal, factores de la transcripción tipo Hélice base-Asa-Hélice (bHLH) son parte del proceso de transformación de células de la epidermis en células guarda. Es importante mencionar a las proteínas PRC2, puesto que controlan a uno de estos factores de transcripción bHLH: el factor de la transcripción FAMA.

SPEECHLESS, MUTE y FAMA son los reguladores maestros en el desarrollo estomatal y sus funciones son las siguientes:

- SPCH: entrada a la primera división asimétrica. La no expresión de SPCH equivale a la no formación de estomas.
- MUTE: promueve la diferenciación celular hacia células guarda.
- FAMA: es requerido para la diferenciación de células guarda.

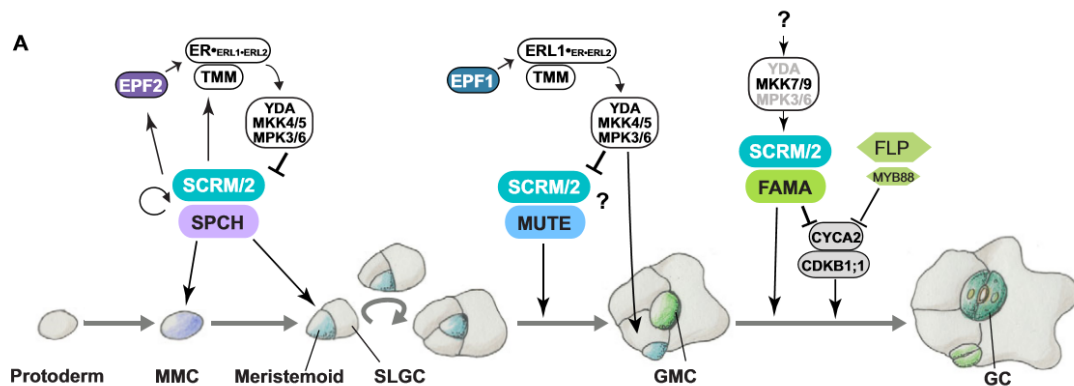


Figura 9. Rutas de inhibición de los reguladores maestros del desarrollo estomatal SPCH, MUTE y FAMA, mediada por MAPK: MKK4/5, MPK3/6. Fuente: Han y Torii (2016).

Sin embargo, FAMA es requerido para prevenir divisiones mitóticas subsecuentes de las células guarda, y expresión ectópica de FAMA también puede promover la formación de células guarda en sitios inapropiados como la capa de mesófilo o en la epidermis de raíz (Gray, 2007). También se ha visto que plantas cultivadas en baja humedad relativa tienen un menor número de estomas y los genes SPCH y FAMA son *de novo* metilados en las citosinas y transcripcionalmente reprimidos (Tricker *et al.*, 2012).

3.10 Aplicaciones foliares de H₂O₂ como herramienta biotecnológica ante la sequía y su relación con la hormesis

La hormesis es el efecto estimulante a bajas concentraciones de agentes potencialmente tóxicos. Con anterioridad se hizo mención al H₂O₂ como un agente tóxico a altas concentraciones, por lo cual la célula lo mantiene en niveles bajos, y es en ese momento cuando funge como un compuesto de las diferentes rutas de defensa de la planta. Para encontrar un efecto hormético, es necesario indagar sobre cuál es la dosis más baja de H₂O₂ que puede aplicarse para obtener los efectos deseados: tolerancia a estrés medioambiental y producción de metabolitos secundarios de defensa (Hadacek *et al.*, 2011).

En investigaciones previas, se ha utilizado el H₂O₂ (100 mM) como tratamiento exógeno en semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.); éstas mismas fueron germinadas en condiciones de sequía, encontrando un incremento en peso seco y longitud de raíces cuando las plantas se encontraban en etapa de semillero (Hameed & Iqbal, 2014). Otras investigaciones previas realizadas en explantes de raíz de cempasúchil (*Tagetes erecta* L.) mostraron que aplicar H₂O₂ exógeno en dosis 50 µM a 900 µM incrementaba el peso fresco de raíz cuando eran sometidas a estrés por sequía (Liao *et al.*, 2012). Se ha reportado que asperjar H₂O₂ en dosis bajas disminuye los síntomas negativos por exposición a sequía, o incrementa la tolerancia a esta condición; esto para cultivos de calabaza, frijol, soya, maíz y mostaza. El efecto observado fue un incremento en los niveles de fotosíntesis, altos niveles de antioxidantes y contenido de clorofila, así como altas actividades de las enzimas desintoxicantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) (Hossain *et al.*, 2015). Sin embargo, también se ha detectado actividad de la enzima fenilalanina-amonio-liasa (PAL) (Mejía-Teniente *et al.*, 2013) y actividad antimicrobiana en plantas de *Capsicum annuum* L. tratadas con dosis de 6, 14, 18 mM de H₂O₂ (Vargas-Hernández *et al.*, 2017).

4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 HIPÓTESIS

La aplicación de peróxido de hidrógeno en plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) modifica la hórmesis, confiriendo a la planta tolerancia al estrés hídrico mediante la activación de genes de respuesta a estrés y el incremento en la producción de metabolitos con propiedades bioactivas en fruto.

4.2 OBJETIVO GENERAL

Inducir la activación de la hórmesis en plantas de *Capsicum annuum* L. para conferir tolerancia al estrés hídrico a través de la aplicación de peróxido de hidrógeno.

4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer un cultivo de chile jalapeño desde siembra hasta cosecha y someterlo a condiciones de estrés hídrico.
- Identificar cambios en el crecimiento y desarrollo de la planta de chile tras la aplicación de peróxido de hidrógeno.
- Evaluar la expresión de respuesta a estrés y cambios en los niveles de metilación del DNA, por la aplicación de peróxido de hidrógeno.
- Determinar niveles de metabolitos de respuesta a estrés con propiedades bioactivas presentes en frutos y hojas de plantas elicitadas con peróxido de hidrógeno.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Selección del material vegetal

El material vegetal utilizado fue chile jalapeño variedad “Coronel”, el cual es una variedad híbrida adecuada para regiones cálido-húmedas, resistente a bacteria. Su ciclo es precoz y con buena fructificación y amarre de frutos de buen tamaño, rectos, de color verde oscuro y picante (Cuadro 3).

Cuadro 3. Ficha técnica de chile jalapeño “Coronel” por HARRIS-MORAN ®

Característica	Descripción
Madurez relativa	Intermedia-precoz
Resistencia a enfermedades	Resistente a PVY: 0.1.2 / Xcv:0-3, 7, 8; IR: TEV
Color	Exterior verde oscuro
Hábito de la planta	Compacta
Forma del fruto	Mediano y grande en calor

5.1.1 Siembra y germinación del material vegetal.

Las semillas fueron sembradas en charolas de poliestireno expandido de 200 cavidades; como sustrato se empleó peatmoss humedecido con agua acidulada a pH 5.5 a 6.5 con ácido fosfórico al 85 %. Una vez realizada la siembra, las charolas fueron colocadas dentro de una cámara de germinación con variables ambientales ajustadas a temperatura 29 ± 1 °C y humedad relativa al 80 ± 5 %, donde permanecieron hasta la emergencia de la radícula. Este evento tuvo lugar cinco días después de la siembra (dds); la plúmula y cotiledones aparecieron entre los días 11 y 13 dds; la charola se llevó al invernadero experimental desde el día 11 dds.

5.1.2 Manejo agronómico de las plantas de chile jalapeño.

Trasplante: Cuando las plantas tenían 4 hojas verdaderas y aproximadamente siete centímetros de altura fueron trasplantadas en condiciones de hidroponía. El sistema de riego y sustrato tuvieron las siguientes características:

- a) Sustrato tezontle con granulometría 17% grava, 74% arena, 3% finos y textura franco-arenosa (ensayo realizado en el laboratorio de Hidráulica de la Facultad de Ingeniería).
- b) Bolsas de plástico blanco/negro de 10 L de capacidad, perforadas.
- c) Sistema de riego: tinacos de 600 L de capacidad, bomba monofásica impulsora de ½ HP, tubería de PVC hidráulico de 1” de diámetro, manguera lisa de 16 mm de diámetro, gotero auto-compensante de 4 L/h, distribuidor de flujo a dos salidas, tubín o espagueti de 5 mm diámetro, estaca reguladora de flujo de 2 L/h, timer de 16 tiempos.

Labores culturales: Para evitar estrés adicional, no se realizó ningún tipo de poda durante todo el tratamiento ni aplicaciones foliares de ningún tipo.

Fertilización: Se aplicó una nutrición (Cuadro 4) con base en los siguientes principios:

- a) Etapa de establecimiento: ocurre el crecimiento vegetativo, la nutrición se realiza con base en la solución Steiner.
- b) Etapa de floración y fructificación, la formulación toma como base en la relación K/N de 1.5.

Cuadro 4. Fertilización para cultivo de chile.

Etapa fenológica	Nutriente (ppm)					
	N	P	K	Ca	Mg	S
Establecimiento	125	126	127	137	37	134
Floración y Fructificación	112	53	175	120	23	79

Condiciones de seguridad: El manejo de sustancias químicas peligrosas está regulado por la NOM-017-STPS-1993 “Equipo de protección personal – Selección, uso y manejo en los centros de trabajo” y la NOM-005-STPS-1998 “Condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas”, por lo que el personal que manipule los ácidos, así como los fertilizantes, debe utilizar:

- Anteojos de protección.
- Guantes contra sustancias químicas.
- Mandil contra sustancias químicas.
- Overol.
- Calzado ocupacional.

5.1.3 Localización del experimento.

Las instalaciones en las que tendrá lugar la investigación se ubican en el Campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro, el Marqués, Querétaro. Este municipio se localiza al noroeste del estado de Querétaro: al norte a 20° 58', al sur 20° 31'; al este 100° 09' y al oeste 100° 24'. El cultivo se llevará a cabo en un invernadero de 50 m² de una sola nave, diseño gótico y material de cubierta plástico de polietileno, con ventilación forzada y reducción de radiación con malla sombra del 60%.

5.2 Diseño experimental

El diseño experimental consistió en bloques al azar con 12 tratamientos con tres replicados cada uno y tres plantas como unidad experimental. Los datos obtenidos fueron analizados por medio del programa GraphPAD Prism 6 para el análisis estadístico y elaboración de gráficos. Las medias fueron comparadas utilizando la prueba de Dunnet con un 95% de nivel de confianza ($p < 0.05$), tomando como control general las plantas cultivadas en capacidad de campo y con aplicación foliar solo de agua destilada (CC).

5.3 Aplicación de los tratamientos

Al inicio de la etapa de floración (22 ddt) se realizó una primera aplicación foliar de H_2O_2 en concentraciones 2, 20 y 200 Mm, y como control agua destilada. Se realizó una segunda aplicación foliar 14 días después (36 ddt). Posteriormente, las plantas fueron sometidas a diferentes condiciones de humedad en el sustrato, expresadas en relación al Potencial Hídrico del sustrato (unidades en kPa) con base en los estudios realizados por Lin *et al.* (2015). Se utilizaron sensores de humedad en suelo WATERMARK, modelo 200SS y un WATERMARK Digital Meter (Figura 10):

- Condiciones de humedad:
 - Capacidad de campo: -10 a 0 kPa.
 - Estrés hídrico moderado: -30 a -60 kPa.
 - Estrés hídrico por sequía: -60 a -140 kPa



Figura 10. Colocación del sensor de humedad en suelo WATERMARK modelo 200SS.

5.4 Medición de variables de crecimiento y desarrollo de la planta.

5.4.1 Inicio y duración de las etapas fenológicas.

- Elaboración de calendario de duración y aparición.
 - Plántula, floración, cuajado de fruto, cosecha.

5.4.2 Morfología de la planta por etapa fenológica

De manera semanal, se midió altura de la planta, diámetro de tallo y número de flores utilizando un flexómetro (Cadena, 3m) para medir la altura de la planta y un vernier digital para medir diámetro de tallo (Vernier marca Mutitoyo Absolute y escala de 0 a 200 mm, con resolución 0.001 mm).

5.4.3 Densidad estomatal

El conteo de estomas se realizó en la parte adaxial (haz) y abaxial (envés) de hojas completamente desarrolladas; se removió la cutícula manualmente y se tiñó en una solución de azul de toluidina al 0.01% durante 3 minutos. Posteriormente se enjuagó en agua destilada, sumergiendo el tejido teñido durante 3 minutos más. Las muestras fueron colocadas en un cubreobjetos, luego hidratadas con una solución 1:1 de glicerol-agua. Los materiales fueron examinados al microscopio a 40X (Leica ICC50 HD). Tres áreas por hoja (tanto adaxial como abaxial) fueron examinadas.

5.4.4 Selección y recolección de muestras.

- Hojas
 - Las hojas fueron cortadas con tijera, se envolvieron en aluminio e inmediatamente fueron congeladas con nitrógeno líquido. Las muestras se guardadas en bolsas de plástico para su posterior almacenamiento a -80 °C hasta su análisis.
- Frutos obtenidos de la primera y segunda cosecha.
 - Los frutos se llevaron al laboratorio envueltos en aluminio para análisis morfológicos y colorimétricos; se removió el exceso de polvo con sanita, se separó la parte comestible de la no comestible (placenta y semillas) y posteriormente se congelaron con nitrógeno líquido. Fueron almacenados a -80 °C hasta su análisis.

5.5 Análisis realizados a las muestras.

- **Muestra de hoja:** a partir de las muestras congeladas en nitrógeno líquido se realizó extracción de DNA para análisis de perfil de metilación de DNA genómico, extracción de RNA para identificación de genes de respuesta a estrés *sod*, *pal* y *cat* por medio de RT-PCR, y extracto metanólico para determinación de contenido total de fenoles y flavonoides.
- **Muestra de fruto:** se realizaron los análisis de calidad de fruto: se midió peso fresco, longitud, y características de color (L^* , Chroma y ángulo de Hue); también se realizó extracto metanólico para determinación de contenido total de fenoles, flavonoides, capsinoides y capsaicinoides.

5.6 Análisis moleculares

5.6.1 Extracción de DNA

La preparación de la muestra para la extracción de DNA fue la siguiente: 100 mg de muestra fresca congelada (hoja) fue pulverizada en nitrógeno líquido y mezclado con 750 μ l de buffer CTAB, seguido por un periodo de incubación de 5 minutos a 65 °C. Posterior a la incubación, se añadieron 750 μ l de cloroformo-álcool isoamílico (24:1) y se agitaron en vortex durante 15 segundos. Las muestras fueron centrifugadas a 12, 000 RPM por 5 min a 4° C. La fase acuosa sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo Eppendorf y se añadió un equivalente a 2/3 del volumen recuperado de isopropanol a 4° C y 1/10 del volumen recuperado de acetato de sodio 5 M; posteriormente se centrifugó a 12, 000 RPM por 5 min a 4 °C. La pastilla precipitada se lavó con etanol frío al 70%. Se dejó secar el pellet dentro de campana de aire y se resuspendió en agua libre de nucleasas estéril.

5.6.2 Extracción de RNA

La preparación de la muestra para la extracción de RNA fue la siguiente: 100 mg de muestra fresca congelada (hoja) fue pulverizada en nitrógeno líquido y mezclado con 750 μ l de Trizol, seguido por un periodo de incubación de 5 minutos. Posterior a la incubación, se añadieron 750 μ l de cloroformo y se agitaron en vortex durante 15 segundos. Las muestras se dejaron incubar a temperatura ambiente por un periodo de 2-3 minutos. Posteriormente fueron

centrifugadas a 12, 000 RPM por 15 min a 4° C. La fase acuosa sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo Eppendorf y se añadió el equivalente al volumen recuperado (aproximadamente 750 µl) de isopropanol a 4° C y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12, 000 RPM por 5 min a 4 °C. El precipitado forma una pastilla. Se eliminó el sobrenadante y se adicionó un 1 ml de con etanol frío al 70% y se centrifugó a 7500 g por 5 min a 4 °C. Este paso se conoce como lavado con etanol. Terminado el periodo de centrifugación, se retiró la fase acuosa de los tubos y fueron colocados dentro de campana de aire para dejar secar la pastilla. Finalmente, la pastilla suspendió en 35 µl de agua libre de nucleasas estéril.

5.6.3 Niveles de metilación de DNA genómico

La medición del porcentaje de metilación fue utilizando un KIT ELISA para 5-mC (ZYMO RESEARCH), de acuerdo con las instrucciones provistas en el manual. La relación (ratio) de la ‘densidad de dinucleótidos CpG/ longitud del genoma’ fue aquel para *Arabidopsis thaliana*, 0.022 (Ashikawa, 2001), dando un factor resultante de 3.409 utilizado para el ajuste de datos.

5.6.4 RT-PCR para identificación de *sod*, *pal* y *cat*.

La reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa (RT-PCR) se realizó con el kit First Strand cDNA Synthesis #K1612 de ThermoFisher Scientific. La reacción de síntesis tuvo lugar en un termociclador y consistió en los siguientes ciclos:

1. Abrir cadenas ricas en enlaces GC: 1 ciclo de 5 minutos a 65 °C. Pausar.
2. Sacar los tubos del termociclador y enfriar las muestras en hielo durante 5 minutos. Volver a colocar dentro del termociclador.
3. Inicio de la reacción: 1 ciclo de 60 minutos a 37 °C.
4. Finalizar con 1 ciclo de 5 minutos a 70 °C para terminar la reacción e inactivar enzimas.
5. 1 ciclo (tiempo ilimitado) a 4 °C para almacenar los tubos en caso de que las muestras no puedan ser removidas del termociclador tras la finalización de la reacción.

Los productos de la RT-PCR se verificaron en un gel de agarosa al 1-1.2%, mezclando 3 μ l de GelRed y 5 μ l de muestra. Se utilizó como marcador de peso molecular MassRuler DNA Ladder ready to use, mezclando 3 μ l de GelRed y 5 μ l de marcador.

Una vez sintetizado el cDNA, se procedió a amplificar los genes de interés (*sod*, *pal* y *cat*) utilizando los oligos forward y reverse específicos para cada gen. Para la reacción de PCR se utilizó el kit Hot-Start DNA Polimerase & Master mixes de ThermoFisher Scientific. La polimerasa Hot-Start es inactiva a temperatura ambiente, lo cual reduce el riesgo de formación de productos no específicos. Requiere un periodo de activación que debe ser incluido en el ciclo de reacción de la PCR.

La reacción tuvo lugar en un termociclador /marca, modelo/ de la siguiente manera:

1. Activación de la enzima Hot-Start: 1 ciclo de 4 minutos a 95 °C.
2. Inicio de la reacción en cadena de la polimerasa, constituida por 30 ciclos de tres etapas: a) Desnaturalización del DNA: 2 minutos a 95° C, b) Alineamiento del oligo con la cadena molde de DNA: 2 minutos a 60 °C, c) Extensión de la cadena por acción de la polimerasa: 30 segundos a 72 °C.
3. Elongación final: 1 ciclo de 5 minutos a 72 °C.
4. Enfriamiento: 1 ciclo (tiempo ilimitado) a 4 °C para almacenar los tubos en caso de que las muestras no puedan ser removidas del termociclador tras la finalización de la reacción.

Los productos de la PCR se verificaron en un gel de agarosa al 1-1.2%, mezclando 3 μ l de GelRed y 5 μ l de muestra. Se utilizó como marcador de peso molecular “MassRuler DNA Ladder ready to use” de ThermoFisher Scientific, mezclando 3 μ l de GelRed y 5 μ l de marcador.

5.7 Identificación y cuantificación de metabolitos de respuesta a estrés con propiedades bioactivas: Capsaicinoides totales, Fenoles y Flavonoides totales.

5.7.1 Extracto metanólico

Para la caracterización de estos compuestos presentes en el fruto se realizó una extracción metanólica de la muestra de hoja congelada, de la siguiente manera:

- Preparación de la muestra. Se pesó 1 g de muestra fresca congelada y colocó en un tubo Falcon estéril de 50 ml.
- Se adicionaron 10 ml de metanol grado reactivo.
- Cubrir el tubo Falcon con papel aluminio y cerrar perfectamente.
- Agitación durante 24 horas en Orbit 1000 Digital shaker (Labnet).
- Centrifugación a 15 000 rpm durante 10 minutos a 4° C.
- Filtrar con membrana de 0.45 micrómetros si el análisis se realiza en cromatógrafo Gases-Masas.

5.7.2 Determinación de Fenoles Totales

La determinación de contenido de fenoles y flavonoides, método de Folin-Ciocalteu, se realizó de acuerdo a lo reportado por García-Mier *et al.* (2015):

Tomar 40 µl de extracto metanólico y colocar en tubo Falcon de 15 ml. Adicionar 460 µl de agua destilada, 250 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma), 1250 µl de Na₂CO₃ al 20 %, cerrar el tubo y agitar en vortex. Dejar reposar 2 horas en la oscuridad. Transcurrido el tiempo, colocar 200 µl de la mezcla en una microplaca de 96 pozos. Leer la absorbancia a 760 nm en multiscaner UV-Vis (Multiskan FC, Thermo Fisher). Como blanco se utiliza del mismo metanol grado reactivo empleado para la extracción metanólica. Curva de calibración en ANEXOS.

5.7.3 Determinación de Flavonoides Totales:

Tomar 50 µl de extracto metanólico y colocar directamente en la microplaca de 96 pozos. Adicionar 180 µl de agua destilada, 20 µl de 2-aminodifenil borato al 1%. Leer la absorbancia a 404 nm en multiscaner UV-Vis (Multiskan FC, Thermo Fisher). Como blanco se utiliza

del mismo metanol grado reactivo empleado para la extracción metanólica. Curva de calibración en ANEXOS.

5.7.4 Determinación de Capsaicinoides Totales:

Determinación de contenido de capsaicinoides por Gases-Masas (Agilent Serie 1200, 6120 Quadropole) con bomba cuaternaria (G1311A), detector UV-Vis y automuestreador de acuerdo a lo reportado por García-Mier *et al.* (2015).

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Fenotipo

6.1.1 Desarrollo de los órganos de la planta: hoja, flor y fruto

Una vez emergidas, las plantas fueron trasladadas al invernadero donde se conduciría el experimento. Fueron trasplantadas cuando presentaron 4 hojas verdaderas (Figura 11). El crecimiento de las plantas fue homogéneo durante el establecimiento del cultivo (periodo de 22 días posteriores al trasplante, Cuadro 5), y el coeficiente de uniformidad de riego del sistema de riego correspondía a niveles aceptables del 97%.

Cuadro 5. Registro de fechas importantes durante el ciclo de cultivo.

Etapa	Fecha	Observaciones
Siembra	06-agosto-2016	Peat moss humedecido con agua ajustada a un pH=5.8 (se empleó ácido fosfórico al 55%)
Emergencia	11-agosto-2016	Porcentaje de germinación: menor al 50%
	14-agosto-2016	Porcentaje de germinación: 76%
Trasplante	18-septiembre-2016	Cuatro hojas verdaderas. 43 dds.
Floración	02-octubre-2016	Botón floral en menos del 50% de las plantas
	06-octubre-2016	Botón floral detectado en 77% plantas. Inicio de solución nutritiva para floración.
Aplicación 1	10-octubre-2016	22 ddt. Realizada a las 18:00 hr. Foliar: 3 ml/planta asperjados gota fina
Fructificación	20-octubre-2016	Antesis en plantas de DH200.
Aplicación 2	24 octubre-2016	36 ddt. Realizada a las 18:00 hr.
		Foliar: 3 ml/planta asperjados gota fina
Cosecha	29-noviembre-2016	Cosecha 1: 72 ddt
	19-diciembre-2016	Cosecha 2: 92 ddt

La primera aplicación foliar se realizó 22 ddt, cuando las plantas presentaron la formación de botones florales; fue realizada por la tarde (18:00 horas) utilizando una aspersora manual de 2 L de capacidad y rociado fino. 24 horas posteriores a la aplicación se examinaron las hojas, siendo las plantas que presentaron mayores daños aquellas tratadas con dosis 20 y 200 mM de H₂O₂ (Figura 12). En estas plantas, el daño se presentó de moderado (quemaduras superficiales en la epidermis a lo largo del tejido vascular) a severo (hojas perforadas).



Figura 11. A) Planta con cuatro hojas verdaderas (43 dds). B) Plantas en bolsas individuales con sistema de riego por goteo.

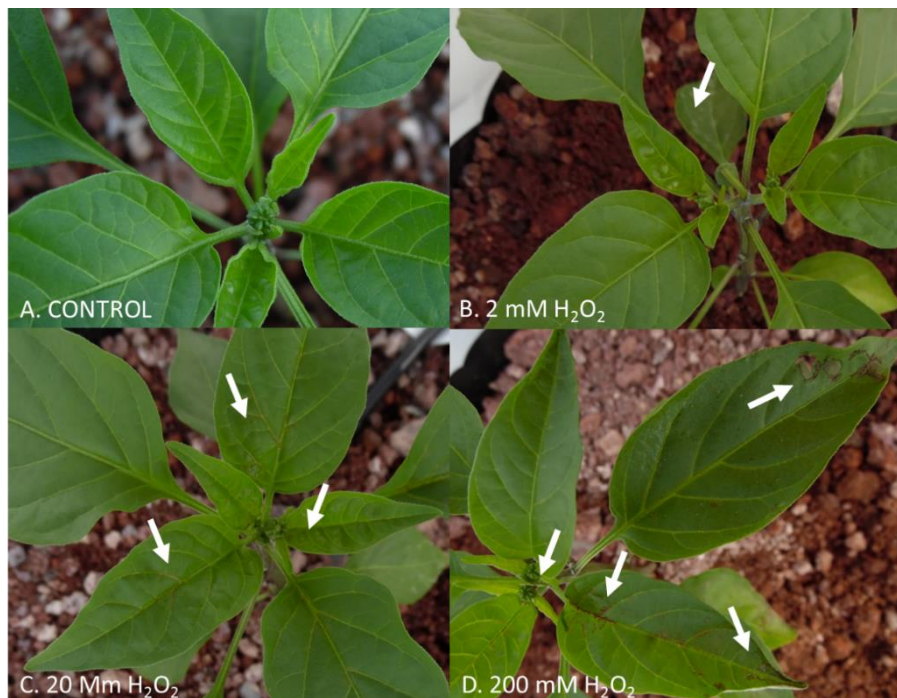


Figura 12. Apariencia de las hojas 24 horas posteriores a la aplicación foliar de las diferentes dosis de H_2O_2 . A) Control: sin afectación. B) 2 mM: manchas blanquecinas en las hojas bajas. C) 20 mM: Quemaduras leves color café-rojizo en las zonas cóncavas del tejido vascular. D) 200 mM: Daño severo, quemaduras extensas y formación de agujeros.

Las flores se desarrollaron completamente, el color de los pétalos era blanco lechoso y las anteras presentaban polen abundante; una vez polinizadas, los pétalos decaían y pasaban a ser color blanco-amarillento. Las flores de las plantas sometidas a estrés por sequía (SQ = -140 a -60 kPa) tenían un tamaño menor que las flores producidas por las plantas irrigadas a capacidad de campo (CC = -10 a 0 kPa) o déficit hídrico (DH = -60 a -30 kPa). Las primeras plantas en presentar flores en antesis fueron las correspondientes al tratamiento DH200.

Para la primera cosecha (72 ddt), las plantas cultivadas en capacidad de campo y déficit hídrico sí produjeron fruto; en las plantas cultivadas en condiciones de sequía la flor sí era polinizada, pero el fruto cuajado era abortado (Figura 13). Por esta razón, las plantas producidas en sequía solo tuvieron cosecha hasta el segundo corte (92 ddt). El aborto de fruto puede atribuirse a diversos factores, entre ellos al control hormonal, donde el etileno (ET) y auxinas juegan un rol clave. Tanto ET como ABA son hormonas relacionadas con la senescencia provocada por estrés oxidativo (derivado de las aplicaciones de H₂O₂ y por la sequía), siendo el ET un mensajero involucrado en la muerte celular programada (PCD) (Sinha *et al.*, 2014). Otra variable involucrada en el aborto de fruto son las condiciones ambientales, tales como estrés por altas temperaturas (Marcelis *et al.*, 2004), factor asociado al aborto de las flores y frutos. Este factor es considerado, dado que dentro del invernadero se llegaron a registrar temperaturas superiores a los 30 °C durante los periodos de floración y fructificación (Figura 14).



Figura 13. A) Flor de chile, completamente desarrollada y con polen abundante en anteras. B) Flor polinizada con cuajado de fruto. C) Aborto de fruto.

6.1.2 Dimensiones de la planta

El crecimiento de la planta fue monitoreado semanalmente hasta la segunda cosecha (92 ddt). En cuanto a la altura de la planta y grosor del tallo, los tratamientos no tuvieron diferencia estadística con respecto al control, CC. No así con el número de hojas por planta, donde sí hubo diferencias significativas (Cuadro 6 y Figura 14). En capacidad de campo, a mayor concentración de H₂O₂ aplicado, mayor número de hojas por planta; por lo contrario, la reducción en el número de hojas fue significativo para déficit hídrico y altamente significativo en sequía, comparado con el control CC. El menor número de hojas se presentó en los tratamientos de sequía elicitado con 20 y 200 mM H₂O₂ (SQ20 y SQ200, respectivamente).

Cuadro 6. Altura, diámetro de tallo, número de hojas en función de la dosis de aplicación foliar de H₂O₂ y régimen de irrigación a los 92 ddt (segunda cosecha). Control general: capacidad de campo asperjado solo agua (CC).

	Control	2 mM H ₂ O ₂	20 mM H ₂ O ₂	200 mM H ₂ O ₂
Altura de planta 93 ddt (cm)				
CC	15.3 a	15.50 a	16.30*	16.00 a
DH	15.20 a	13.78 a	14.28 a	15.51 a
SQ	15.68 a	13.67*	13.86 a	14.13 a
Diámetro de tallo 93 ddt (mm)				
CC	4.36 a	4.86 a	4.81 a	5.19 a
DH	3.91 a	3.36*	3.67 a	3.87 a
SQ	3.68 a	3.57 a	3.29*	3.50 a
Número de hojas 93 ddt (n plant ⁻¹)				
CC	32.75a	39.69a	40.11a	48.22***
DH	22.25a	17.22**	19.44*	20.11*
SQ	19.00a	19.22*	15.44**	17.00**

Valores seguidos por la misma letra no presentaron diferencias significativas a un nivel de confianza $p < 0.05$ – (Prueba de comparaciones múltiples Dunnett). Verde: control. Anaranjado: Valores significativamente menores al control. Amarillo: Valores significativamente mayores al control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

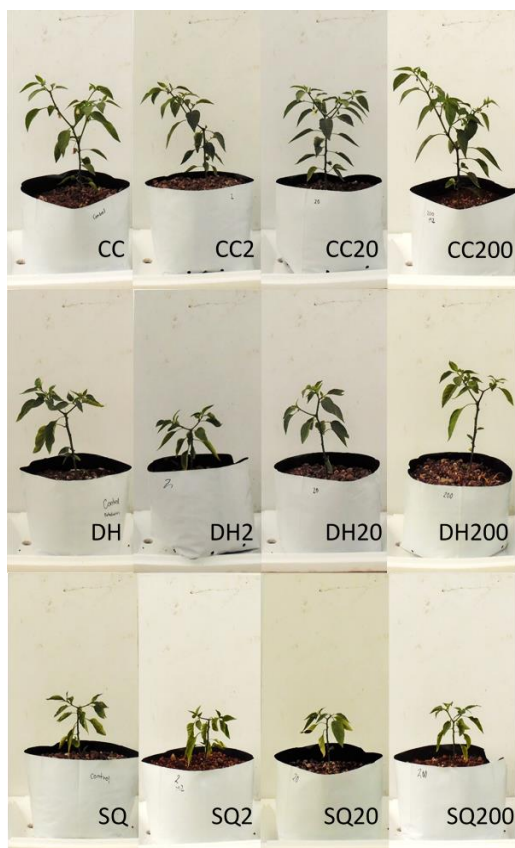


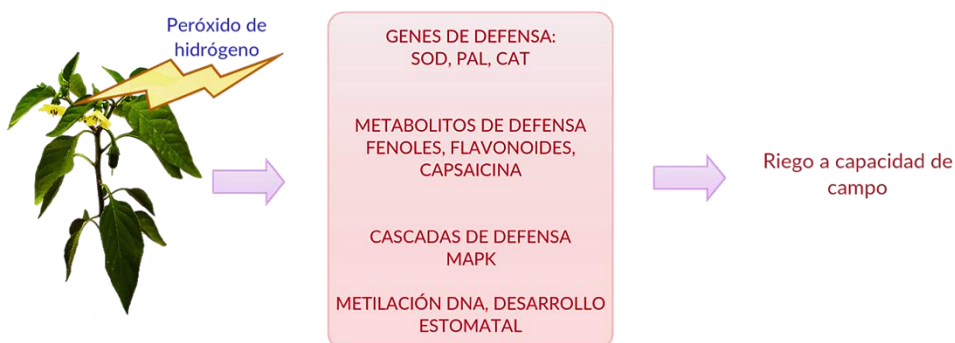
Figura 14. Apariencia del follaje posterior a la segunda cosecha (92 ddt).

En el presente estudio, los tratamientos con la interacción riego insuficiente y sequía presentaron los índices más altos de defoliación. Es posible observar en la Figura 14 los efectos más notorios en los tratamientos de sequía: SQ, SQ2, SQ20 y SW200. Uno de los efectos fisiológicos de la sequía es la senescencia de las hojas; este proceso está regulado tanto por factores endógenos como ambientales, y contribuye a la reubicación de los nutrientes desde las hojas senescentes hacia las hojas jóvenes, flores y frutos (Munné-Bosch & Alegre, 2004). La removilización requiere transporte por floema; los macronutrientes N, P, S, K y Mg (con excepción del Ca) son altamente móviles, mientras que micronutrientes Fe, Zn, Cu, Ni, Mo, B y Cl (con excepción del Mn) son menos móviles, y cada uno se moviliza con mayor o menor eficiencia (White, 2012; Maillard, et al., 2015). La senescencia induce la abscisión foliar, especialmente durante condiciones de sequía, y con ello las plantas reducen las pérdidas de agua por transpiración, permitiendo un balance hídrico adecuado en la planta (Parker & Pallardy, 2011).

6.1.3 Densidad estomatal

En los resultados del presente estudio podemos observar dos fenómenos distintos en la densidad estomatal en las zonas adaxial (haz) y abaxial (envés) de la hoja. De acuerdo con la combinación de factores dosis de peróxido y riego, se generan dos grupos distintos: **Grupo 1)** las plantas sometidas a aplicación de H_2O_2 y continuación del riego a capacidad de campo, y el **Grupo 2)** plantas que recibieron la aplicación inicial de H_2O_2 y el subsecuente estrés hídrico en dos niveles: déficit hídrico y sequía (Figura 15). Este contexto es importante, dado que la densidad estomatal sugiere indicios de lo que pudiera estar ocurriendo a nivel molecular en la tolerancia a estrés hídrico.

GRUPO 1. Elicitación sin estrés subsecuente



GRUPO 2. Elicitación + estrés subsecuente



Figura 15. Diagrama propuesto para la inducción de la tolerancia a estrés hídrico.

Elaboración propia, 2017.

Partiremos de la figura 15. En ella vemos cómo el GRUPO 1, sometido exclusivamente al estrés inicial por H₂O₂, obtiene un patrón de respuesta en donde están involucrados los genes de respuesta a estrés, metabolitos de defensa, activación de la cascada de MAPK y metilación del DNA. Sin embargo, el segundo grupo sufre el estrés inicial por la aplicación de H₂O₂, pero es sometido a un estrés hídrico subsecuente.

La hipótesis del trabajo aquí realizado es que el H₂O₂ puede ser utilizado como inductor de tolerancia a sequía y genera modificaciones genéticas, metabólicas y fenotípicas para tolerar el estrés hídrico subsecuente. Esta suposición implica que parte del material de defensa generado tras la aplicación del H₂O₂ será utilizado por la planta para hacer frente al nuevo estrés por sequía. De esta forma, los efectos del H₂O₂ pueden ser abordados como dos fenómenos temporales: a) producción inicial de los metabolitos de defensa generados por el estímulo por H₂O₂, los cuales son utilizados para que la planta pueda resistir el estrés oxidativo inicial *per se*, y b) al enfrentarse a una condición secundaria de sequía, los metabolitos sintetizados en un inicio proveen un efecto de protección, por lo cual la intensidad del daño por estrés es menor (la planta estaría mejor preparada para recibir el estrés por sequía). En estos fenómenos están involucradas las MAPKs, señalizadoras del desarrollo de la planta y en la respuesta a estrés, así como reguladoras del linaje estomatal, es por ello que la densidad de estomas en la hoja juega un papel importante en la confirmación de esta hipótesis (Figura 15).

Las modificaciones en la densidad estomatal en respuesta a la sequía varían entre especies de plantas, y es dependiente de la severidad del déficit de agua (Cuadro 7) (Hamanishi *et al.*, 2012).

Cuadro 7. Modificación en densidad estomatal ante sequía en diferentes especies de plantas.

Especie de planta	Densidad estomatal ante sequía	Autor
Trigo	Reducción	Quarrie y Jones, 1977
Cebada		Hughes <i>et al.</i> , 2017
Pasto	Aumento	Xu y Zhou, 2008
Tomate		Farber <i>et al.</i> , 2016
Cacahuete	Sin alteración	Clifford <i>et al.</i> , 1995

Partiendo del análisis de densidad estomatal en el envés de la hoja (Figura 16) se puede observar la relación que existe entre la dosis de H₂O₂ aplicado y el tipo de régimen hídrico. En las plantas asperjadas con H₂O₂ irrigadas a capacidad de campo se observa el patrón esperado: una mayor dosis de H₂O₂ implicaría un mayor estrés oxidativo, por lo cual las ROS activarían la ruta de MAPK, específicamente las MKK4, MKK5, MPK3 y MPK6, las cuales limitarían el desarrollo estomatal al inhibir a los factores de transcripción SPCH, MUTE y FAMA. Un efecto similar se observa en las plantas sometidas a déficit hídrico, siendo la cantidad de estomas ligeramente mayor que en las plantas irrigadas a capacidad de campo.

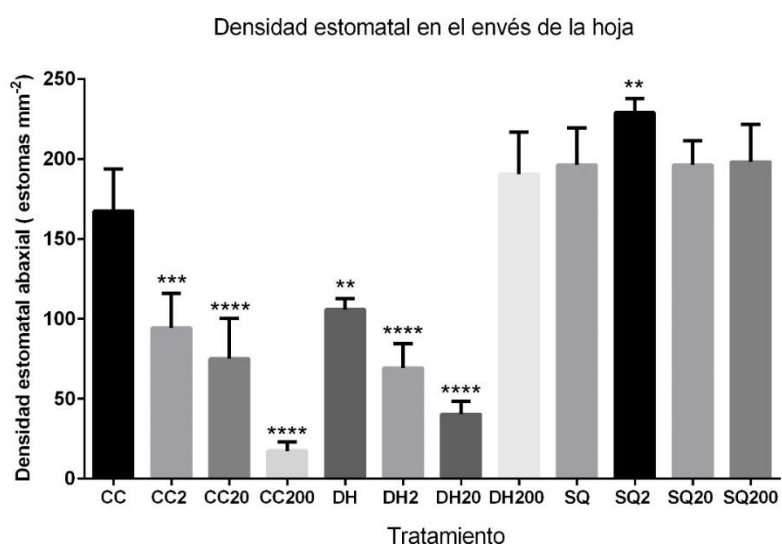


Figura 16. Densidad estomatal a los 92 ddt. a) Superficie adaxial (haz) y b) Superficie abaxial (envés). Diferencias significativas: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$, control global: CC.

En el caso de las plantas sometidas a déficit hídrico y asperjadas con una dosis 200 mM de H₂O₂ y aquellas sometidas a sequía aunada al estímulo inicial de H₂O₂ ocurre un patrón distinto. En estas plantas el desarrollo estomatal no presenta diferencia significativa con el control, incluso llega a ser mayor (caso SQ2, Figura 16).

Es importante considerar que una planta mantendrá sus estomas cerrados durante las horas de mayor temperatura, cercanas al medio día, y ante una reducción en el potencial hídrico

del xilema, lo cual ocasionaría disminución en la turgencia de las células epidérmicas y por ende, relajaría la presión ejercida sobre las células guarda del estoma (Raschke, 1970), pero durante las horas donde temperatura, humedad relativa y la relación entre el continuo hidráulico suelo-planta-atmósfera sean favorables, estos se abrirán para permitir el intercambio gaseoso (Buckley, 2005).

Hepworth *et al.* (2015) investigaron la densidad estomatal en *Arabidopsis thaliana* como una herramienta potencial para mejorar la tolerancia a sequía; sus resultados demuestran que plantas con la mitad de densidad estomatal que el control reducían los niveles de transpiración, conservaban la humedad en suelo y mantenían niveles de nitrógeno en raíz ante condiciones de baja disponibilidad de agua; otro hallazgo interesante en su investigación fue que plantas con el doble de estomas que el control poseían una mayor capacidad de absorber nitrógeno, y una reducida conductancia estomatal conforme aumentaban los días expuesta a sequía. Esta hipótesis se complementa con la teoría de la defoliación, donde las hojas senescentes migran sus nutrientes hacia las hojas nuevas (Munné-Bosch y Alegre, 2004). Conjuntando las respuestas encontradas por Buckley (2005) y Hepworth *et al.* (2015) en el caso de estomas, un mayor número de estos órganos favorece el intercambio gaseoso y la translocación de nutrientes dentro de la planta cuando las condiciones ambientales lo permitan, compensando así el menor número de hojas derivado de la defoliación por senescencia.

Un mayor número de estomas sugiere una mayor capacidad para amortiguar los efectos negativos del estrés oxidativo, esto es, disminuir la producción de MAPK y con ello evitar la represión de los factores de transcripción SPCH, MUTE y FAMA necesarios para el desarrollo estomatal. Sin embargo, las condiciones de estrés también suelen ir acompañadas de deficiencias en la regulación genética y metabólica de la célula, lo cual sugiere que encontrar un mayor número de estomas en el haz comparado con los estomas presentes en el control, puede deberse a errores en el control de la diferenciación del linaje estomatal, particularmente podemos referirnos a FAMA, puesto que un mal funcionamiento en la regulación de este factor de transcripción promueve la formación de estomas en sitios inadecuados, como lo son en los tejidos mesófilos de empalizada o en la epidermis de la raíz (Figura 17 y 18) (Gray, 2007).

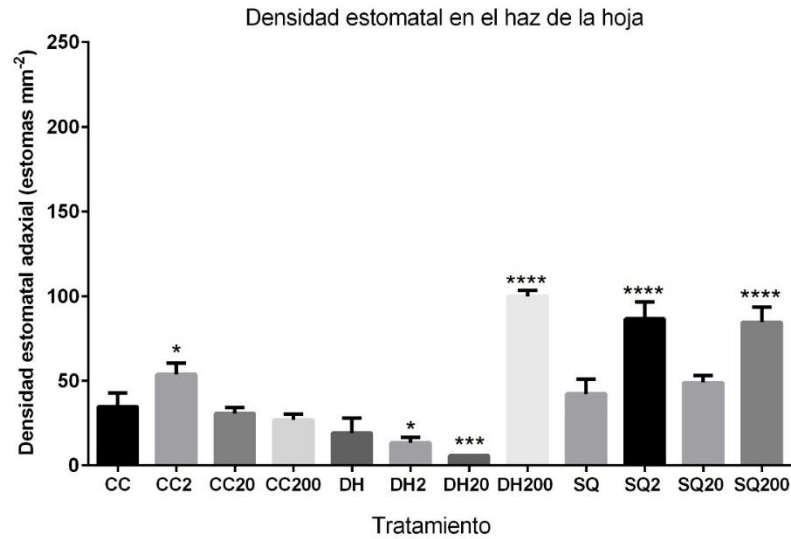


Figura 17. Densidad estomatal a los 92 ddt. a) Superficie adaxial (haz) y b) Superficie abaxial (envés). Diferencias significativas: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$, control global: CC.

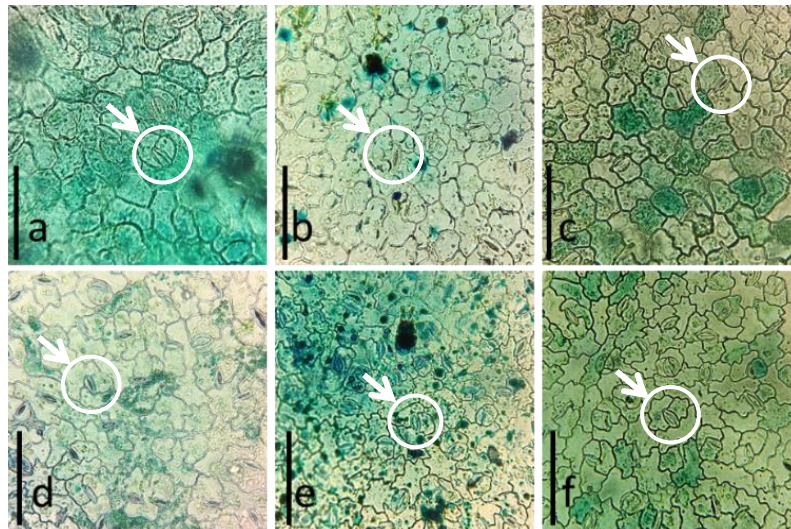


Figura 18. Microfotografías del conteo estomatal a los 92 ddt observado al microscopio con aumento de 40X. Adaxial: a) CC, b) DH200, c) SQ2. Abaxial: d) CC, e) DH200, c) SQ2. Bar=50 μm .

6.1.4 Clorofila

Los resultados muestran que estadísticamente no hubo diferencias entre la concentración de clorofila presente en la mayoría de los tratamientos, excepto en los tratamientos de SQ y SQ20. Sin embargo, la dispersión los datos no permite un análisis más detallado, incluso siendo normalizados (Figura 19).

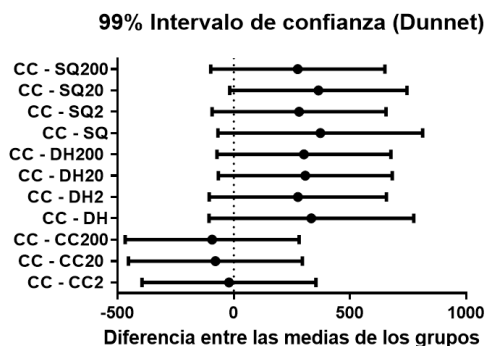


Figura 19. Contenido de clorofila en hojas superiores a los 92 ddt.

6.2 Calidad de fruto

6.2.1 Frutos comerciales y no comerciales (dimensiones) y color de cáliz

La variable de control para calidad de fruto comercial o no comercial se determinó de acuerdo con el PC-011-2004.- Pliego de condiciones para el uso de la marca oficial México Calidad Selecta en chile poblano, serrano y jalapeño, donde los frutos con longitud igual o mayor a 2 ¼ pulgadas de longitud son considerados comerciales.

Los chiles fueron cosechados en estado inmaduro, color verde, sin aparición de manchas rojizas ni grietas. Las plantas de chile regadas a capacidad de campo incrementaron el número de frutos cuando se les aplicaba H₂O₂, independientemente de la dosis; sin embargo, producían en su mayoría frutos no comerciales. Para déficit hídrico, el tratamiento DH200 presentó el mayor número de frutos, aunque más del 90% fue no comercial. Dado el aborto de flor en condiciones de sequía, este fue el tratamiento con menor número de frutos producidos. En general, los frutos no desarrollaron la longitud adecuada establecida en el PC-011-2004 para chile jalapeño, y por ende se obtuvo un mayor número de frutos no comerciales (Cuadro 8).

Las características de color no se vieron significativamente afectadas por los tratamientos (Figura 20 y Cuadro 10). En cuanto al tono, los valores de Chroma y ángulo de Hue se mantuvieron en valores cercanos al control (sin diferencias significativas), oscilando entre 10-20 para chroma (chiles de color vivo) y 145-165 para ángulo de Hue (tono verde); esta combinación dio como resultado chiles de color esmeralda, aunque algunos ejemplares mostraban zonas violáceas en las puntas.

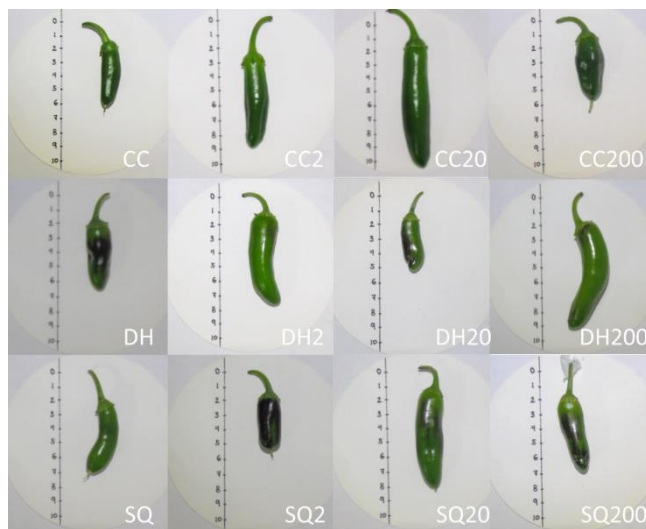


Figura 20 . Chiles de los diferentes tratamientos en la primera cosecha.

Cuadro 8. Número de frutos comerciales y no comerciales en función de la dosis de aplicación foliar de H₂O₂ y régimen de irrigación.

	Control	2 mM H ₂ O ₂	20 mM H ₂ O ₂	200 mM H ₂ O ₂
Frutos totales				
CC	8	21	20	21
DH	2	2	4	11
SQ	5	8	4	5
Frutos comerciales				
CC	2	11	7	8
DH	0	2	1	1
SQ	3	2	3	3
Fruto no comerciales				
CC	6	10	13	13
DH	2	0	3	10
SQ	2	6	1	2

Cuadro 9. Peso y longitud y promedio de frutos comerciales y no comerciales en función de la dosis de aplicación foliar de H₂O₂ y régimen de irrigación. Control estadístico: Capacidad de campo asperjada solo agua (CC).

	Control	2 mM H ₂ O ₂	20 mM H ₂ O ₂	200 mM H ₂ O ₂
Frutos comerciales				
Peso (g)				
CC	12.79 a	18.75 a	17.52 a	23.99 a
DH	-	9.74 a	-	-
SQ	6.93 a	8.85 a	8.66 a	7.71 a
Longitud (mm)				
CC	63.96 a	68.65 a	76.13 a	78.34 a
DH	-	69.99 a	-	-
SQ	62.64 a	68.16 a	68.03 a	58.79 a
Ancho (mm)				
CC	21.25 a	201.4 a	22.41 a	24.53 a
DH	-	17.94 a	-	-
SQ	16.59 a	16.29 a	17.51 a	16.92 a
Frutos no comerciales				
Peso (g)				
CC	6.693 a	7.32 a	6.893 a	7.543 a
DH	6.447 a	-	3.09 a	4.044 a
SQ	3.442 a	3.975 a	-	3.367 a
Longitud (mm)				
CC	45.41 a	46.62 a	39.58 a	34.95 a
DH	50.69 a	-	41.63 a	39.65 a
SQ	41.73 a	37.01 a	-	39.34 a
Ancho (mm)				
CC	16.25 a	17.9 a	16.34 a	15.74 a
DH	17.83 a	-	12.38 a	13.87 a
SQ	12.61 a	12.47 a	-	13.17 a

Valores seguidos por la misma letra no presentaron diferencias significativas a un nivel de confianza $p < 0.05$ – (Prueba de comparaciones múltiples Dunnet). Verde: control. Código: a: sin diferencia significativa, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Cuadro 10. Parámetros de color medidos y calculados para frutos comerciales y no comerciales en función de la dosis de aplicación foliar de H₂O₂ y régimen de irrigación. Control estadístico: Capacidad de campo asperjada solo agua (CC).

	Control	2 mM H ₂ O ₂	20 mM H ₂ O ₂	200 mM H ₂ O ₂
Frutos comerciales				
<i>L*</i>				
CC	56.93 a	50.51 a	46.98 a	53.54 a
DH	-	55.98 a	-	-
SQ	60.91 a	55.83 a	53.16 a	66.07 a
Chroma				
CC	24.32 a	13.47 a	12.65 a	10.72 a
DH	-	14.17 a	-	-
SQ	22.07 a	24.91 a	20.18 a	21.02 a
Ángulo Hue				
CC	148.6 a	146.0 a	145.9 a	164.3 a
DH	-	148.4 a	-	-
SQ	147.2 a	147.5 a	147.1 a	151.0 a
Frutos no comerciales				
<i>L*</i>				
CC	62.36 a	64.06 a	66.06 a	67.39 a
DH	59.14 a	-	69.69 a	69.85 a
SQ	73.42 a	70.21 a	-	68.45 a
Chroma				
CC	12.15 a	9.372 a	9.938 a	9.747 a
DH	9.457 a	-	10.59 a	8.667 a
SQ	8.646 a	8.694 a	-	6.997 a
Ángulo Hue				
CC	148.7 a	151.5 a	153.3 a	154.8 a
DH	151.7 a	-	150.7 a	154.2 a
SQ	157.1 a	154.7 a	-	153.6 a

Valores seguidos por la misma letra no presentaron diferencias significativas a un nivel de confianza $p < 0.05$ – (Prueba de comparaciones múltiples Dunnet). Verde: control. Código: a: sin diferencia significativa, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

6.3 Determinación de compuestos bioactivos

6.3.1 Contenido total de fenoles y flavonoides en hoja.

Se tiene evidencia que las plantas sintetizan flavonoides con capacidad antioxidante cuando son sometidas a estrés ambiental, principalmente para estabilizar a las ROS (Agati *et al.*, 2012). En el presente estudio, las plantas que enfrentaron condiciones de estrés hídrico moderado, disminuyeron en contenido de fenoles y flavonoides en hoja. Para el caso de las plantas elicitadas con H₂O₂ 200 mM, los fenoles se ven dramáticamente disminuidos en un 23.8 % con respecto al control y los flavonoides en un 17.55 % (Figura 21); se tiene evidencia que a las 120 horas después de exponer plantas de *Arabidopsis* a estrés hídrico medio o sequía, el nivel de flavonoides era mayor en las plantas sometidas a sequía que las de estrés medio (Shojaie *et al.*, 2016).

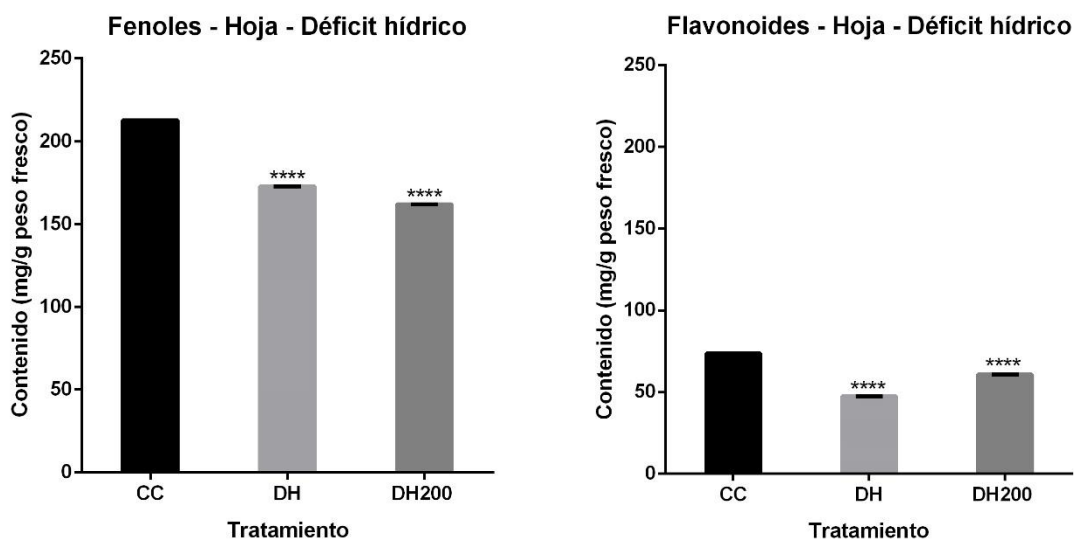


Figura 21. Contenido total de fenoles (equivalentes de ácido gálico mg/g) y flavonoides (equivalentes de rutina mg/g) en hoja para tratamientos en déficit hídrico.

La biosíntesis de flavonoides antioxidantes suele incrementarse en plantas más sensibles al estrés que en aquellas tolerantes al estrés; las plantas sensibles al estrés muestran una primera línea de defensa contra las ROS mucho menos eficiente, y subsecuentemente están expuestas a un mayor estrés oxidativo, por lo cual incrementan los niveles de compuestos antioxidantes (Agati *et al.*, 2012). Para las plantas expuestas a sequía hubo un aumento en el contenido de flavonoides, incluso en las plantas elicitadas con 200 mM de H₂O₂; esto puede deberse a que

el estrés generado por la sequía rebasó la línea de defensa producida en primera instancia por el H_2O_2 y la planta requirió sintetizar más flavonoides para contrarrestar el estrés oxidativo, a pesar de que la variedad de chile jalapeño ha sido desarrollada para cultivo a cielo abierto y en climas ligeramente cálidos y secos (Arrowsmith *et al.*, 2012).

Si bien los mayores niveles de flavonoides se encontraron en las plantas sometidas a sequía, el contenido de fenoles también fue significativamente mayor (Figura 22). Se tiene reportado que plantas severamente estresadas presentan niveles de flavonoides antioxidantes de 25-35 $\mu\text{mol/g}$ en base seca. En la presente investigación el contenido de flavonoides se expresó en equivalente de rutina; tras realizar la conversión de unidades a $\mu\text{mol/g}$ de rutina, las plantas registraron valores de flavonoides entre 120.76 $\mu\text{mol/g}$ (CC), 99.56 $\mu\text{mol/g}$ (DH200) y 173.99 $\mu\text{mol/g}$ (SQ200) de este compuesto. Otros autores reportan que el H_2O_2 producido en condiciones de estrés ambiental puede difundir hacia la vacuola, sitio donde los flavonoides se encuentran almacenados principalmente, y de esta manera sirven como sustrato para que las peroxidasas reduzcan el H_2O_2 ; es así que los flavonoides pudieran ser los responsables de mantener los niveles de H_2O_2 en concentraciones lo suficientemente bajas para evitar la señalización hacia muerte celular, y en su lugar, mantenerlo en niveles de molécula señalizadora para incrementar la tolerancia a estrés (Fini *et al.*, 2011).

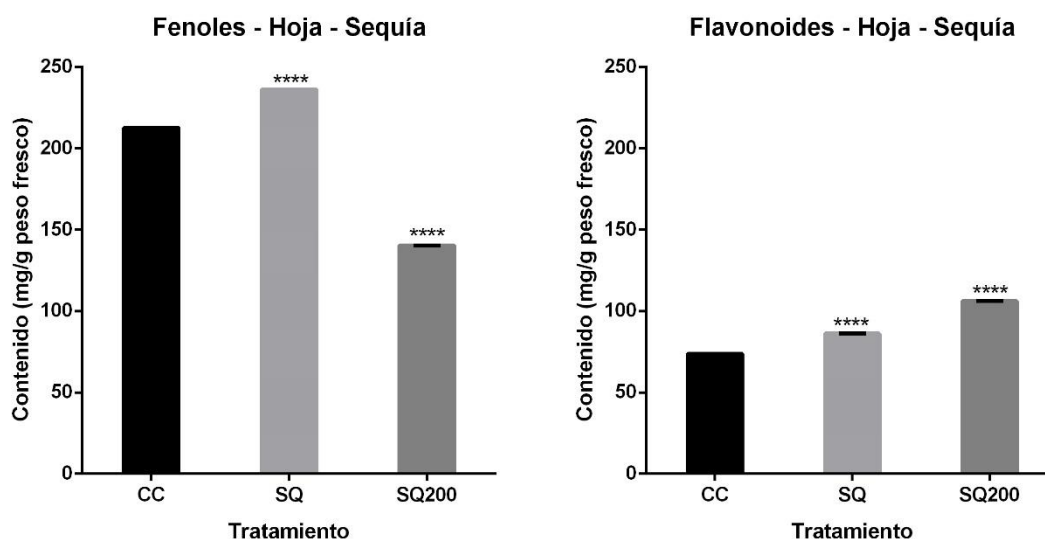


Figura 22. Contenido total de fenoles (equivalentes de ácido gálico mg/g) y flavonoides (equivalentes de rutina mg/g) en hoja para tratamientos en sequía.

6.3.2 Contenido total de fenoles, flavonoides y capsaicinoides en fruto

En cuanto a la ruta de polifenoles, existe un entrecruzamiento de la síntesis de flavonoides y capsaicina en fruto. De acuerdo con los estudios realizados por Sukrasno y Yeoman (1993), se tiene evidencia que la acumulación de capsaicinoides va aunada a una disminución en el contenido de flavonoides. De igual forma, los niveles de capsaicina son altos en el estado inmaduro (verde) y se reducen significativamente conforme aumenta el estado de madurez del fruto (rojo); este comportamiento depende a su vez de la especie y variedad de chile (Vera-Guzmán *et al.*, 2017).

En el caso *C. annuum*, para variedades de chile jalapeño, algunos estudios muestran niveles de fenoles entre 7.45 y 10.28 mg/g, mientras que para flavonoides los valores oscilan entre 2.01 a 3.32 mg/g (Cuadro 11). En la presente investigación, para el tratamiento con mejor desempeño DH200, los valores de fenoles en fruto oscilaron alrededor de 0.8 mg/g equivalentes de ácido gálico, muy bajos con respecto a literatura para jalapeño. En cuanto a flavonoides, los niveles se encuentran alrededor de 1.07 mg/g, también bajos con respecto a los valores encontrados por Álvarez-Parrilla *et al.* (2011) para jalapeño cultivado sin estrés (Figura 23).

En el caso del tratamiento elicitado DH200, la combinación de elicitación y estrés hídrico disminuye significativamente el contenido de fenoles y flavonoides con respecto al control CC, pero también muestra un aumento en el contenido de capsaicinoides, obedeciendo al comportamiento descrito por Sukrasno y Yeoman (1993); el contenido de capsaicina será discutido más adelante. Comparado con la sección anterior, la síntesis de fenoles y flavonoides se vio favorecida en hoja más que en fruto, por lo cual, los niveles de polifenoles en fruto corresponden a los capsaicinoides y capsinoides.

Si bien los flavonoides poseen propiedades bioactivas, los capsaicinoides poseen notables propiedades antimutagénicas y antitumorales, las cuales son utilizadas para tratar neuralgias ocasionadas por enfermedades virales, neuropatías diabéticas o dolor por artritis; de igual forma, los capsaicinoides destacan por sus propiedades antimicrobianas (Domínguez-Martínez *et al.*, 2014).

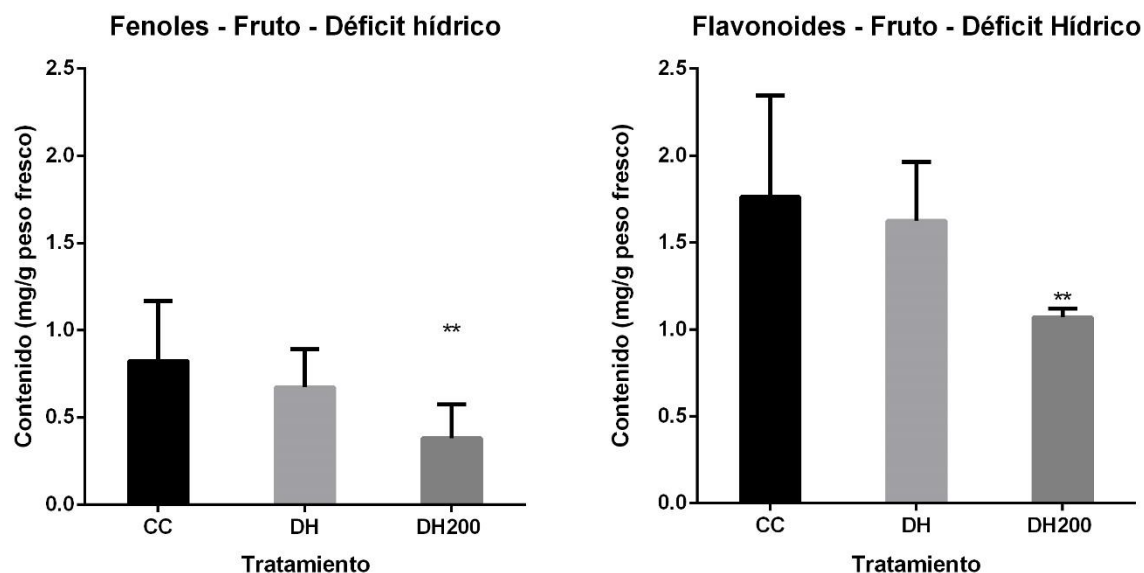


Figura 23. Contenido total de fenoles (equivalentes de ácido gálico mg/g) y flavonoides (equivalentes de rutina mg/g) en fruto para tratamientos en déficit hídrico.

Cuadro 11. Valores de fenoles y flavonoides reportados para frutos de *C. annuum*.

Autor	Especie y variedad	Variedad comercial	Capsaicinoides (mg/g base seca)	
Vera-Guzmán <i>et al.</i> , (2017)	<i>C. annuum</i> var. Jalapeño	No especificada	FLV 10.32	
Shaima <i>et al.</i> , (2016)	<i>C. annuum</i>	Sina verde	FEN 19.21 ± 0.41	
			FLV 13.62 ± 0.71	
		Godiuon verde	FEN 20.52 ± 0.02	
			FLV 10.28 ± 0.15	
Álvarez-Parrilla <i>et al.</i> , (2011)	<i>C. annuum</i> var. Jalapeño	Asensión	FEN 10.28 ± 0.57	
			FLV 3.32 ± 0.40	
	Sin estrés	Flores Magón	FEN 7.45 ± 0.29	
			FLV 2.46 ± 0.18	
			Meoquí	FEN 10.10 ± 0.71
				FLV 2.01 ± 0.22

FEN: Fenoles, FLV: Flavonoides

Los frutos analizados fueron cosechados en estado inmaduro (verde) a los 40 días después de antesis. En los frutos de chile, los niveles de capsaicina alcanzan su máximo entre los 40 y 50 días del desarrollo del fruto a partir de antesis (Reyes-Escogido *et al.*, 2011). Es importante destacar que la variedad ‘Coronel’ es picante, dado que para el control se encontraron niveles de 5.7 mg/g de capsaicina; Al Othman *et al.* (2011) reporta para variedades picantes de *C. annuum* valores de capsaicina de 4.249 mg/g, y para las variedades de chile jalapeño ‘Flores Magón’ y ‘Don Julio’ en literatura se reportan valores de capsaicina de 2.308 mg/g y 8.03 mg/g, respectivamente (Cuadro 12).

En el presente estudio, el estrés hídrico por sí mismo incrementó los niveles de capsaicina en un 25.9% comparado con el control CC; sin embargo, la aplicación de H₂O₂ acompañado con estrés hídrico moderado induce una sobreproducción de capsaicina, obteniéndose resultados de 10.76 mg/g muestra seca (DH200); expresado en porcentaje, se obtuvo el 1.07 % de capsaicina del total del peso del fruto (base seca), siendo un 85% más que en el control CC (Figura 24). Los valores de capsaicina obtenidos en DH200 son mayores incluso que los valores reportados para otras variedades sin elicitar de *C. annuum*, *C. chinense* (habanero) y *C. annuum* var. *glariusculum* (chiltepín), aunque en plantas expuestas exclusivamente a sequía Sung *et al.* (2005) reportó valores entre 0.05 % y 1.15 % de capsaicina en peso seco (Cuadro 12).

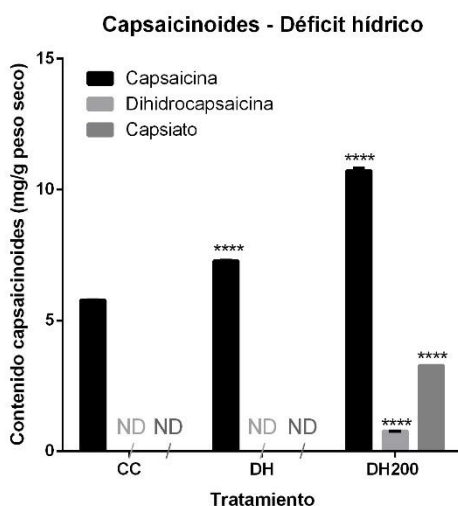


Figura 24. Niveles de capsaicina, dihidrocapsaicina y capsato. El único tratamiento con presencia de los tres capsaicinoides es DH200, en niveles significativamente elevados con respecto al control, CC. ND: no detectable.

Cuadro 12. Valores de capsaicinoides reportados para *Capsicum* spp.

Autor	Especie y variedad	Variedad comercial	Capsaicinoides (mg/g base seca)		
Materska y Perkucka (2005)	<i>C. annuum.</i>	Bronowika Ostra	CAP 0.442 ± 0.003		
	Cosechado verde	Cyklon	CAP 0.269 ± 0.001		
	Sin estrés	Tornado	CAP 0.043 ± 0.004		
		Tajfun	CAP 0.029 ± 0.001		
Al Othman <i>et al.</i> , (2011)	<i>C. annuum</i>	Chile picante	CAP 4.249 ± 0.1903		
		Chile verde	CAP 0.138 ± 0.0052		
		Pimiento verde	CAP 0.001 ± 0.0009		
Sung <i>et al.</i> , (2005)	<i>C. annuum</i> Cosecha 40 días después de floración Estrés: Sequía	Beauty Zest	Control CAP 7.0 Sequía CAP 11.5		
		Home flavor	Control CAP 6.5 Sequía CAP 9.0		
		Hungariana	Control CAP 5.0 Sequía CAP 5.0		
		Álvarez-Parrilla <i>et al.</i> (2011)	<i>C. annuum</i> Jalapeño Sin estrés	Asensión	CAP 0.346 ± 0.0143 DHC 0.395 ± 0.0158
				Flores Magón	CAP 2.308 ± 0.0365 DHC 0.875 ± 0.0061
				Meoquí	CAP 1.318 ± 0.0144 DHC 1.420 ± 0.0585
González-Zamora <i>et al.</i> (2013)	<i>C. annuum</i> Jalapeño Estrés: temperatura			Don Julio. Control.	CAP 8.03 ± 0.37 DHC 2.48 ± 0.28
		Don Julio. Estrés.	CAP 2.35 ± 0.11 DHC 1.19 ± 0.08		
		Butcher <i>et al.</i> (2012)	<i>C. chinense</i> Habanero	Diferentes variedades	CAP 0.15696 en promedio
Rochin-Wong <i>et al.</i> (2013)	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>			Chiltepín verde	CAP 4.17 ± 0.11

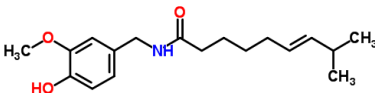
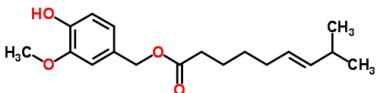
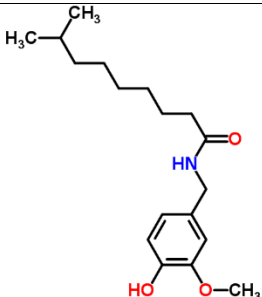
CAP: capsaicina; DHC: Dihidrocapsaicina.

En cuanto al capsiato es clasificado como capsinoide; carece de pungencia, pero comparte algunas propiedades bioactivas de los capsaicinoides, destacando su actividad antioxidante (Rosa *et al.*, 2002); al igual que la capsaicina, el capsiato suele encontrarse más abundantemente en la placenta que en el pericarpio (Cuadro 13) (Wahyuni *et al.*, 2011).

El tratamiento DH200 produjo a su vez capsiato y dihidrocapsacina, compuestos que se encontraron en niveles no detectables en el control ni en déficit hídrico; el tratamiento DH200 mostró valores de 3.272 mg/g muestra seca para capsiato y 0.76 mg/g muestra seca para dihidrocapsacina. En trabajos previos se ha reportado que aplicaciones semanales de 200 mM de H₂O₂ en *Capsicum annuum* L. sin estrés hídrico puede llegar a niveles entre 1.12 y 1.36 mg/g muestra fresca (Zunun-Perez *et al.*, 2017), por lo cual la combinatoria de déficit hídrico más aplicación foliar de 200 mM en la variedad de chile jalapeño produce desde un 45% hasta un 92% más de capsiato que los niveles reportados por Zunun-Pérez *et al.* (2017) para *C. annuum* L. 509-45-1 (USDA/ARS/PGRU, USA).

El contenido de capsaicinoides y capsinoides obtenidos para el tratamiento DH200 resultan interesantes, ya que ante condiciones de déficit hídrico moderado, la elicitación puede ser una opción para incrementar el contenido de estos bioactivos; de esta manera, las plantas toleran el estrés ambiental y los frutos, a pesar de no alcanzar la calidad para ser comercializados en fresco, poseen niveles altos de compuestos bioactivos, lo cual los hace susceptible de incorporarse a las cadenas de valor de los procesos agroindustriales.

Cuadro 13. Estructuras de los principales capsaicinoides sintetizados en *Capsicum* spp.

Capsaicina	Capsiato	Dihidrocapsacina
		

6.4 Expresión de genes de respuesta a estrés *sod*, *pal* y *cat*

Los resultados muestran que en todos los tratamientos está presente el gen de *pal*, lo cual pudiera sugerir una relación con la producción de capsaicina. Se distinguen bandas de mayor intensidad den los tratamientos DH200 y SQ200, siendo también bandas de tamaño significativo las correspondientes al estrés por sí mismo, DH y SQ (Figura 25).

Sin embargo, para el caso de *sod*, la expresión de este gen está ausente en las plantas cultivadas a capacidad de campo (CC), posiblemente debido a que estas plantas están sometidos a bajos niveles de estrés oxidativo al ser suministradas de un riego adecuado; las bandas de mayor intensidad corresponden al estrés hídrico por sí mismo, DH y SQ, disminuyendo la intensidad en las bandas en DH200 y SQ200. Esto puede deberse a que las plantas DH y SQ no cuentan con los mismos niveles de metabolitos desintoxicantes y antioxidantes inducida por la elicitación con H₂O₂, sino que la formación de H₂O₂ ocurre *de novo*, iniciando con la formación del radical superóxido (O₂⁻) y es necesario que las plantas expresen la *sod* para estabilizar a este radical libre. No se obtuvieron resultados concluyentes para *cat*.

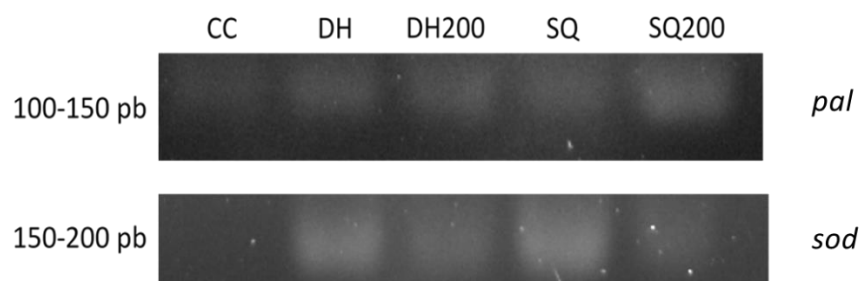


Figura 25. Niveles de expresión de *pal* y *sod* en diferentes tratamientos.

6.5 Niveles de metilación de DNA genómico

Para estrés medio (déficit hídrico) existe una correlación positiva entre el aumento de la metilación y la dosis de H₂O₂ aplicada; a mayor dosis de peróxido hay correspondencia de hipermetilación (Figura 26). En cuanto a sequía, solo SQ200 presentó valores de hipermetilación con respecto al control. La metilación del DNA está relacionada con el silenciamiento de genes (Deleris *et al.*, 2016), aunque también es sabido que en adición a los factores involucrados para la tolerancia a estrés, los procesos de metilación de DNA genómico y las modificaciones postranscripcionales de histonas pueden influir en la eficiencia de los genes de respuestas inducidos por estrés (Golldack *et al.*, 2011).

Retomando el desarrollo del linaje estomatal, las proteínas PRC2 controlan la expresión de FAMA epigenéticamente, y aunque aún no se ha encontrado una correlación entre la expresión genética y los niveles de metilación del DNA en *A. thaliana* (Colaneri y Jones, 2013), es interesante que los niveles de expresión más altos elevados de metilación se encuentren en el tratamiento DH200 y SQ200, tratamientos que presentaron una elevada densidad estomatal en el haz de la hoja.

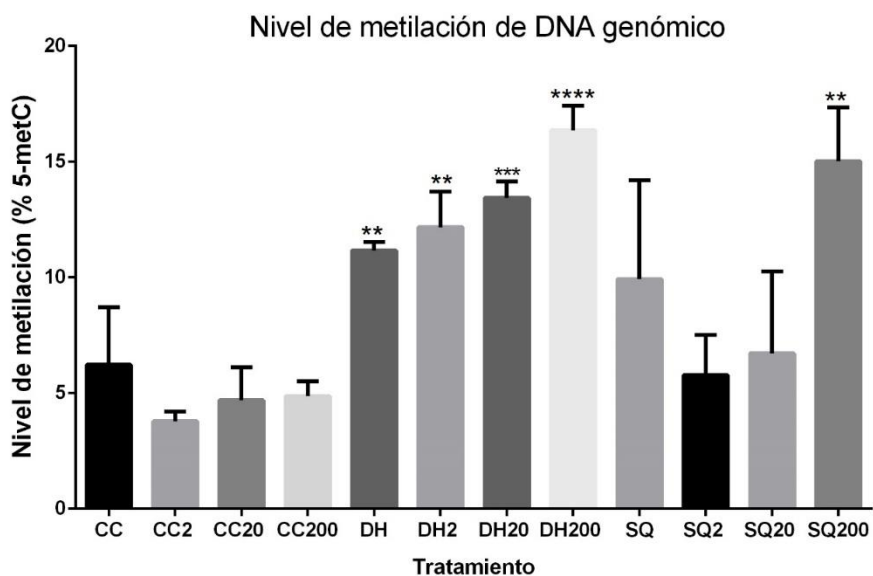


Figura 26. Niveles de metilación de DNA expresado en porcentaje de 5-metilcitosina (%5-metC), 10 días posteriores a la primera aplicación foliar de H₂O₂.

7 CONCLUSIONES

La aplicación de H₂O₂ genera una serie de cambios fenotípicos, metabólicos y genéticos en las plantas de Chile relacionadas con la ruta de defensa y activación de la hormesis. Los principales resultados sugieren que la aplicación de 200 mM de H₂O₂ figura como una opción factible para inducir la producción de metabolitos secundarios en fruto y conferir tolerancia a sequía.

En cuanto a los fenómenos fisiológicos y genéticos, DH200 presenta el mayor número de densidad estomatal y los valores más altos de metilación de DNA genómico; también es el tratamiento que mayor frutos produjo por debajo de aquellos obtenidos de plantas cultivadas a capacidad de campo. La dosis de 200 mM de H₂O₂ pudiese ser un tratamiento propuesto para mejorar la calidad de bioactivos en fruto, dado que es el único tratamiento que induce la producción de capsaicina, dihidrocapsaicina y capsaiato en fruto.

Resulta pertinente realizar otro ciclo de cultivo para corroborar los datos aquí presentados y de ser posible, estudios en campo para evaluar la efectividad del tratamiento y evaluar rendimiento y calidad del fruto en sistemas productivos intensivos de Chile jalapeño, donde las principales características son cultivo en suelo y fertilización de liberación prolongada; o de igual forma, en invernadero para sistemas que busquen la reducción de consumo hídrico e incremento de bioactivos.

8 Literatura citada

Agatia, G., Azzarellob, E., Pollastrib, S. & Tattinic, M., 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, Volumen 196, pp. 67-76.

Al Othman, Z. A., Hadj Hamed, Y. B., Habila, M. A. & Ghafar, A. A., 2011. Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Capsicum Fruit Samples using High Performance Liquid Chromatography. *Molecules*, Volumen 16, pp. 8919-8929.

Altieri, M. A., Nicholls, C. I., Henao, A. & Lana, M. A., 2015. Agroecology and the design of climate change-resilient farming systems. *Agron. Sustain. Dev.*, Volumen 35, p. 869–890.

Álvarez-Parrilla, E., De la Rosa, L. A., Amarowicz, R. & Shaidi, F., 2011. Antioxidant Activity of Fresh and Processed Jalapeño and Serrano Peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volumen 59, pp. 163-173.

Anjum, N. A., 2015. Plant acclimation to environmental stress: a critical appraisal. *Frontiers in Plant Science*, Volumen 6, p. 445.

Aranega-bou, P., Leyva, M. D. O., Finiti, I. & García-agustín, P., 2014. Priming of plant resistance by natural compounds . Hexanoic acid as a model. *Frontiers in Plant Science*, Volumen 5, pp. 1-12.

Arrowsmith, S. y otros, 2012. Effects of salt stress on capsaicin content, growth, and fluorescence in a Jalapeño cultivar of *Capsicum annuum* (Solanaceae). *BIOS*, 83(1), pp. 1-7.

Ashikawa, I., 2001. Gene-associated CpG islands in plants as revealed by analyses of genomic sequences. *The Plant Journal*, 26(6), pp. 617-625.

Bae, H. y otros, 2014. Ascorbic acid, capsaicinoid, and flavonoid aglycone concentrations as a function of fruit maturity stage in greenhouse-grown peppers. *Journal of Food Composition and Analysis*, Volumen 33, pp. 195-202.

Baxter, A., Mittler, R. & Suzuki, N., 2014. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, Volumen 65, p. 1229–1240.

Borges, A. A. y otros, 2014. Priming crops against biotic and abiotic stresses: MSB as a tool for studying mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, Volumen 5, pp. 1-4.

Buckley, T. N., 2005. The control of stomata by water balance. *New Phytologist*, Volumen 168, pp. 275-292.

Butcher, J. D., Crosby, K. M., Yoo, K. S. & Patil, B. S., 2012. Environmental and Genotypic Variation of Capsaicinoid and Flavonoid Concentrations in Habanero. *HortScience*, 47(5), pp. 574-579.

Cabello, J. V., Lodeyro, A. F. & Zurbriggen, M. D., 2014. Novel perspectives for the engineering of abiotic stress tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, Volumen 26, pp. 62-70.

Cai, H. y otros, 2015. Genome-wide identification and expression analysis of calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase genes in *Capsicum annuum*. *Frontiers in Plant Science*, pp. 1-22.

Cardenas-Manríquez, G. y otros, 2016. Proteomic and metabolomic profiles in transgenic tobacco (*Nicotiana glauca*) to CchGLP from *Capsicum chinense* BG-3821 resistant to biotic and abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany*, Volumen 130, pp. 33-41.

Challinor, A. J., Simelton, E. S. & Fraser, E. D. G., 2016. Changes in yield variability of major crops for 1981 – 2010 explained by climate change. *Environmental Research Letters*.

Chen, K. & Arora, R., 2012. Priming memory invokes seed stress-tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, p. in press.

Clifford, S. y otros, 1995. The effect of elevated atmospheric CO₂ and drought on stomatal frequency in groundnut (*Arachis hypogaea* (L.)). *Journal of Experimental Botany*, Volumen 46, pp. 847-852.

Colaneri, A. & Jones, A. M., 2013. *Genome-Wide Quantitative Identification of DNA Differentially Methylated Sites in Arabidopsis Seedlings Growing at Different Water Potential*, s.l.: Plos one.

CONABIO, 2009. [En línea]
Available at: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/capsicum-annuum/fichas/ficha.htm>

CONAPROCH, 2014. *Comité Nacional Sistema Producto Chile AC. PLAN RECTOR 2014*. [En línea]
Available at: http://www.conaproch.com/descargas/PLAN_RECTOR_2014.pdf
[Último acceso: 09 Febrero 2016].

Conrath, U., Beckers, G. J., Langenbach, C. J. & Jaskiewicz, M. R., 2015. Priming for Enhanced Defense. *Anu. Rev. Phytopathol*, Volumen 53, pp. 97-119.

Corpas, F. J., 2015. What is the role of hydrogen peroxide in plant peroxisomes?. *Plant Biology*, Volumen 17, pp. 1099-1103.

Cramer, G. R. y otros, 2011. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, Volumen 11, p. 163.

Dai, J. & Mumpler, R. J., 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, Volumen 15, pp. 7313-7352.

Deinlein, U. y otros, 2014. Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in Plant Science*, Volumen 19, pp. 371-379.

Deleris, A., T., H. & Navarro, L., 2016. DNA Methylation and Demethylation in Plant Immunity. *Annual Review of Phytopathology*, Volumen 54, pp. 579-603.

Diao, W.-p. y otros, 2016. Genome-Wide Identification and Expression Analysis of WRKY Gene Family in *Capsicum annuum* L. *Frontiers in Plant Science*, Volumen 7, pp. 1-15.

Domínguez-Martínez, I. y otros, 2014. Determination of capsaicin, ascorbic acid, total phenolic compounds and antioxidant activity of *Capsicum annuum* L. var. serrano by mid infrared spectroscopy (Mid-FTIR) and chemometric analysis. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 57(1), pp. 133-142.

FAO, 2015. *The impact of natural hazards and disasters on agriculture and food security and nutrition*, s.l.: s.n.

FAO, 2016. [En línea] Available at: <http://faostat3.fao.org/compare/E> [Último acceso: 02 09 2016].

Farber, M., Attia, Z. & Weiss, D., 2016. Cytokinin activity increases stomatal density and transpiration rate in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 67(22), pp. 6351-6362.

Federman, D. K., Arreguín-Cortés, F. I. & López-Pérez, M., 2014. Constructing a framework for National Drought Policy: The way forward in Mexico. *Weather and Climate Extremes*, Volumen 3, pp. 90-94.

Fini, A. y otros, 2011. Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(5), pp. 709-711.

Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K., 2011. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants.. *Journal of Plant Research*, 124(4), pp. 509-525.

Fu, Z. Q. & Dong, X., 2013. Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annual Reviews of Plant Biology*, Volumen 64, pp. 839-863.

Gilroy, S. y otros, 2016. Update on Reactive Oxygen Species and Systemic Signaling ROS, Calcium, and Electric Signals: Key Mediators of Rapid Systemic Signaling in Plants. *Plant Physiology*, Volumen 171, p. 1606–1615.

Golldack, D., Lüking, I. & Yang, O., 2011. Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Reports*, pp. 1383-1391.

González-Zamora, A. y otros, 2013. Characterization of Different Capsicum Varieties by Evaluation of Their Capsaicinoids Content by High Performance Liquid Chromatography, Determination of Pungency and Effect of High Temperature. *Molecules*, Volumen 18, pp. 13471-13486.

Gray, J. E., 2007. Plant Development: Three Steps for Stomata. *Current Biology*, 17(6), pp. R213-R215.

Hadacek, F., Bachmann, G., Engelmeier, D. & Chobot, V., 2011. Hormesis and a chemical raison d'etre for secondary plant metabolites. *International Dose-Response Society*, 9(79), pp. 79-116.

- Hamanishi, E., Thomas, B. & Campbell, M., 2012. Drought induces alterations in the stomatal development program in *Populus*. *Journal of Experimental Botany*, 63(13), pp. 4959-4971.
- Hameed, A. & Iqbal, N., 2014. Chemo-priming with Mannose, Mannitol and H₂O₂ Mitigate Drought Stress in Wheat. *Cereal Research Communications*, 42(3), p. 450-462.
- Hamilton, C. E. y otros, 2016. Agriculture , Ecosystems and Environment Mitigating climate change through managing constructed-microbial communities in agriculture. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Volumen 216, pp. 304-308.
- Han, S. & Torii, K., 2016. Lineage-specific stem cells, signals and asymmetries during stomatal development.. *Development*, Volumen 143, pp. 1259-1270.
- Henry, G., Thonart, P. & Ongena, M., 2012. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, Volumen 16, pp. 257-268.
- Hepworth, C. y otros, 2015. Manipulating stomatal density enhances drought tolerance without deleterious effect on nutrient uptake. *New Phytologist*, Volumen 208, pp. 336-341.
- Hichri, I. y otros, 2011. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), pp. 2465-2483.
- Hossain, M. A. y otros, 2015. Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance : insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers in Plant Science*, Volumen 6, pp. 1-19.
- Hughes, J. y otros, 2017. Reducing stomatal density in barley improves drought tolerance without impacting on yield. *Plant Physiology*.
- Kim, S. y otros, 2013. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nature Genetics*, 46(3), pp. 270-279.
- Kissoudis, C., van de Wiel, C., Visser, R. G. F. & van der Linden, G., 2014. Enhancing crop resilience to combined abiotic and biotic stress through the dissection of physiological and molecular crosstalk.. *Frontiers in Plant Science*, Volumen 5, pp. 1-20.
- Krasensky, J. & Jonak, C., 2012. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks.. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), pp. 1593-1608.
- Lata, C. & Prasad, M., 2011. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), pp. 4731-4748.
- Latham, A. D. M. y otros, 2015. Climate change turns up the heat on vertebrate pest control. *Biological Invasions*, Volumen 17, pp. 2821-2829.
- Leng, X. y otros, 2017. Ectopic expression of CSD1 and CSD2 targeting genes of miR398 in grapevine is associated with oxidative stress tolerance.. *Functional & Integrative Genomics*, 17(6), pp. 697-710.

Liao, W.-b., Huang, G.-b., Yu, J.-h. & Zhang, M.-l., 2012. Plant Physiology and Biochemistry Nitric oxide and hydrogen peroxide alleviate drought stress in marigold explants and promote its adventitious root development. *Plant Physiology and Biochemistry*, Volumen 58, pp. 6-15.

Loizzo, M. R. y otros, 2015. Evaluation of chemical profile and antioxidant activity of twenty cultivars from *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chacoense* and *Capsicum chinense*: A comparison between fresh and processed peppers. *LWT - Food Science and Technology*, Volumen 64, pp. 623-631.

López-Huertas, E. & del Río, L. A., 2016. ROS Generation in Peroxisomes and its Role in Cell Signaling. *Plant & Cell Physiology*, Volumen 57, pp. 1364-1376.

López-Huertas, E. & del Río, L. A., 2016. ROS Generation in Peroxisomes and its Role in Cell Signaling Luis. *Plant & Cel Physiology*, 57(7), pp. 1364-1376.

Luna, E. y otros, 2012. Next-Generation Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiology*, Volumen 158, pp. 844-853.

Ma, D. y otros, 2014. Expression of flavonoid biosynthesis genes and accumulation of flavonoid in wheat leaves in response to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, Volumen 80, pp. 60-66.

Maillard, A. y otros, 2015. Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency. *Frontiers in Plant Science*, 6(317).

Marcelis, L. y otros, 2004. Flower and fruit abortion in sweet pepper in relation to source and sink strength. *Journal of Experimental Botany*, 55(406), pp. 2261-2268.

Markwell, J., Osterman, J. C. & Mitchell, J. L., 1995. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Photosynthesis Research*, Volumen 46, pp. 467-472.

Martel, A. B. & Qaderi, M. M., 2016. Does salicylic acid mitigate the adverse effects of temperature and ultraviolet-B radiation on pea (*Pisum sativum*) plants?. *Environmental and Experimental Botany*, Volumen 122, pp. 39-48.

Materska, M., 2014. Bioactive phenolics of fresh and freeze-dried sweet and semi-spicy pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Functional Foods*, Volumen 7, pp. 269-277.

Mejía-teniente, L. y otros, 2013. Oxidative and Molecular Responses in *Capsicum annuum* L. after Hydrogen Peroxide, Salicylic Acid and Chitosan Foliar Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, pp. 10178-10196.

Mejía-Teniente, L. y otros, 2013. Oxidative and molecular responses in *Capsicum annuum* L. after hydrogen peroxide, salicylic acid and chitosan foliar applications. *International Journal of Molecular Sciences*, Volumen 14, pp. 10178-10196.

Mhamdi, A., Noctor, G. & Baker, A., 2012. Plant catalases: Peroxisomal redox guardians. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), pp. 181-194.

Millan-Almaraz, J. R. y otros, 2013. FPGA-based wireless smart sensor for real-time photosynthesis. *Computers and Electronics in Agriculture*, Volumen 95, pp. 58-69.

Moncada, A. y otros, 2013. Effect of grafting on yield and quality of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Scientia Horticulturae*, Volumen 149, pp. 108-114.

Montes-Hernández, S., 2010. *Biodiversidad.gob.mx*. [En línea] Available at: http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/centrosOrigen/Capsicum/Informe_Final/Informe%20final%20Capsicum.pdf [Último acceso: 17 Junio 2016].

Mulero, J. y otros, 2015. Bioactive substances with preventive effect in cardiovascular diseases. *Nutrición Hospitalaria*, Volumen 32, pp. 1462-1467.

Munné-Bosch, S. & Alegre, L., 2004. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology*.

Nisar, N. y otros, 2015. Carotenoid Metabolism in Plants. *Molecular Plant*, Volumen 8, pp. 68-82.

Niu, L. & Liao, W., 2016. Hydrogen Peroxide Signaling in Plant Development and Abiotic Responses : Crosstalk with Nitric Oxide and Calcium. *Frontiers in Plant Science*, Volumen 7, pp. 1-14.

Paradiković, N. y otros, 2011. Effect of natural biostimulants on yield and nutritional quality: an example of sweet yellow pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volumen 91, pp. 2146-2152.

Parker, W. & Pallardy, S. G., 2011. Drought-induced leaf abscission and whole-plant drought tolerance of seedlings of seven black walnut families. *Canadian Journal of Forest Resesarch*, Issue 9839, pp. 818-821.

Pastor, V. y otros, 2013. Primed plants do not forget. *Environmental and Experimental Botany*, Volumen 94, pp. 46-56.

Phimchan, P., Chanthai, S., Bosland, P. W. & Techawongstien, S., 2014. Enzymatic Changes in Phenylalanine Ammonia-lyase, Cinnamic-4-hydroxylase, Capsaicin Synthase, and Peroxidase Activities in *Capsicum* under Drought Stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(29), pp. 7057-7062.

Pieterse, C. M. y otros, 2012. Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Volumen 28, pp. 489-521.

Poschenrieder, C. y otros, 2013. Do toxic ions induce hormesis in plants?. *Plant Science*, Volumen 212, pp. 15-25.

Quarrie, S. & Jones, H., 1977. Effects of abscisic acid and water stress on development and morphology of wheat.. *Journal of Experimental Botany*, Volumen 28, pp. 192-203.

- Rajabbeigi, E. y otros, 2013. Interaction of drought stress and UV-B radiation – impact on biomass production and flavonoid metabolism in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, Volumen 86, pp. 190-197.
- Ramegowda, V. & Senthil-kumar, M., 2015. The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen combination. *Journal of Plant Physiology*, Volumen 176, pp. 47-54.
- Raschke, K., 1970. Stomatal Responses to Pressure Changes and Interruptions in the Water Supply of Detached Leaves of *Zea mays* L.'. *Plant physiology*, Volumen 45, pp. 415-423.
- Reyes-Escogido, M., Gonzalez-Mondragon, E. & Vazquez-Tzompantzi, E., 2011. Chemical and Pharmacological Aspects of Capsaicin. *Molecules*, 16(2), pp. 1253-1270.
- Rochin-Wong, C. S., Gómez-Meza, N., Montoya-Ballesteros, L. C. & Medina-Juárez, L. A., 2013. EFECTO DE LOS PROCESOS DE SECADO Y ENCURTIDO SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS FITOQUÍMICOS DEL CHILTEPÍN (*Capsicum annum* L. var. *glabriusculum*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(2), pp. 227-239.
- Rosa, A. y otros, 2002. Antioxidant Activity of Capsinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volumen 50, pp. 7396-7401.
- Rosa, A. y otros, 2002. Antioxidant Activity of Capsinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, p. 7.
- Rosa, A. y otros, 2002. Antioxidant Activity of Capsinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), pp. 7396-7401.
- Ruiz-García, Y. & Gómez-Plaza, E., 2013. Elicitors: A Tool for Improving Fruit Phenolic Content. *Agriculture*, Volumen 3, pp. 33-52.
- Ruiz-García, Y. & Gómez-Plaza, E., 2013. Elicitors: A Tool for Improving Fruit Phenolic Content. *Agriculture*, Volumen 3, pp. 33-52.
- Sánchez-Rodríguez, E. y otros, 2012. Antioxidant response resides in the shoot in reciprocal grafts of drought-tolerant and drought-sensitive cultivars in tomato under water stress.. *Plant Science*, Volumen 188-189, pp. 89-96.
- Saxena, I., Srikanth, S. & Chen, Z., 2016. Cross Talk between H₂O₂ and Interacting Signal Molecules under Plant Stress Response. *Frontiers in Plant Science*, Volumen 7, pp. 1-16.
- Schreiner, M., Martínez-Abalgar, J., Glaab, J. & Jansen, M., 2014. UV-B Induced Secondary Plant Metabolites. *Optik & Photonik*, 9(2), pp. 34-37.
- Sewelam, N. y otros, 2014. Spatial H₂O₂ Signaling Specificity: H₂O₂ from Chloroplasts and Peroxisomes Modulates the Plant Transcriptome Differentially. *Molecular Plant*, pp. 1191-1210.

Sharma, S., Arora, S. & Lohani, P., 2015. Effect of drought on antioxidant system at seedling and vegetative stage of *Eleusine coracana*. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 3(4), pp. 642-650.

Shojaie, B., Mostajeran, A. & Ghannadian, M., 2016. Flavonoid dynamic responses to different drought conditions: amount, type, and localization of flavonols in roots and shoots of *Arabidopsis thaliana* L.. *Turkish Journal of Biology*, Volumen 40, pp. 612-622.

SIAP, 2015. *SIAP*. [En línea] Available at: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/identidad/index.jsp [Último acceso: 03 10 2016].

SIAP, 2016. *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. [En línea] Available at: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> [Último acceso: 09 Febrero 2016].

Singh, R. y otros, 2016. Reactive oxygen species (ROS): Beneficial companions of plants' developmental processes. *Frontiers in Plant Science*, p. In press.

Sinha, A. K., Jaggi, M., Raghuram, B. & Tuteja, N., 2011. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior*, 6(2), pp. 196-203.

Sukrasno, N. & Yeoman, M. M., 1993. Phenylpropanoid Metabolism during Growth and Development of *Capsicum frutescens* Fruits.. *Phytochemistry*, Volumen 32, pp. 839-844.

Sung, Y., Chang, Y. & Ting, N., 2005. Capsaicin biosynthesis in water-stressed hot pepper fruits. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, Volumen 46, pp. 35-42.

Sunkar, R., 2010. MicroRNAs with macro-effects on plant stress responses. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, Volumen 21, pp. 805-811.

Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R. & Miller, G., 2012. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*, Volumen 35, pp. 259-270.

Tendall, D. M. & Gaillard, G., 2015. Environmental consequences of adaptation to climate change in Swiss agriculture : An analysis at farm level. *Agricultural Systems*, Volumen 132, pp. 40-51.

Thakur, M. & Sohal, B. S., 2013. *Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection: A Review*, s.l.: s.n.

Tricker, P. J. y otros, 2012. Low relative humidity triggers RNA-directed de novo DNA methylation and suppression of genes controlling stomatal development.. *Journal of Experimental Botany*, 63(10), p. 3799-3813.

UN, 2015. *United Nations Framework Convention on Climate Change*. [En línea] Available at: http://unfccc.int/documentation/documents/advanced_search/items/6911.php?preref=600008831 [Último acceso: 18 November 2016].

- Vera-Guzmán, A. M. y otros, 2017. Flavonoid and Capsaicinoid Contents and Consumption of Mexican Chili Pepper (*Capsicum annuum* L.) Landraces. En: *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. s.l.:Intech, pp. 406-437.
- Wahyuni, Y. y otros, 2011. Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: Variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry*, Volumen 72, pp. 1358-1370.
- Wang, X. y otros, 2014. Drought priming at vegetative growth stages improves tolerance to drought and heat stresses occurring during grain filling in spring wheat. *Plant Growth Regul.*
- White, P., 2012. Long-distance Transport in the Xylem and Phloem. En: *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. s.l.:Marschner P, pp. 49-70.
- Xu, K. y otros, 2015. Spatio-temporal variation of drought in China during 1961–2012: A climatic perspective. *Journal of Hydrology*, Volumen 526, pp. 253-264.
- You, J. & Chan, Z., 2015. ROS Regulation During Abiotic Stress Responses in Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*, Volumen 6, pp. 1-5.
- Zorov, D. B., Juhaszova, M. & Sollott, S. J., 2014. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews*, 94(3), pp. 909-950.
- Zunun-Perez, A. y otros, 2017. Effect of foliar application of salicylic acid, hydrogen peroxide and a xyloglucan oligosaccharide on capsiate content and gene expression associated with capsinoids synthesis in *Capsicum annuum* L.. *J. Biosci.*, 42(2), pp. 245-250.

ANEXOS

A. TAXONOMÍA DE *Capsicum annuum* L.

Cuadro 14. Jerarquía Taxonómica de *Capsicum annuum* L (ITIS, 2016).

Jerarquía Taxonómica de <i>Capsicum annuum</i> L.	
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Viridiplantae</i>
Infrareino	<i>Streptophyta</i>
Superdivisión	<i>Embryophyta</i>
División	<i>Tracheophyta</i>
Subdivisión	<i>Spermatophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Superorden	<i>Asteranae</i>
Orden	<i>Solanales</i>
Familia	<i>Solanaceae</i>
Género	<i>Capsicum</i>
Especie	<i>Capsicum annuum</i> L.

B. CONDICIONES AMBIENTALES DENTRO DEL INVERNADERO

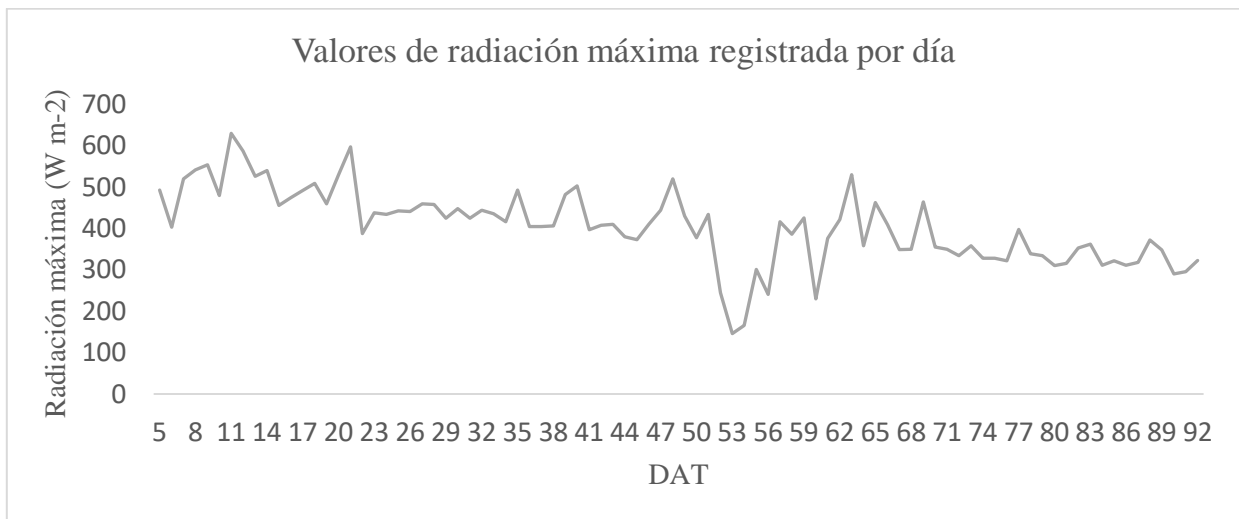
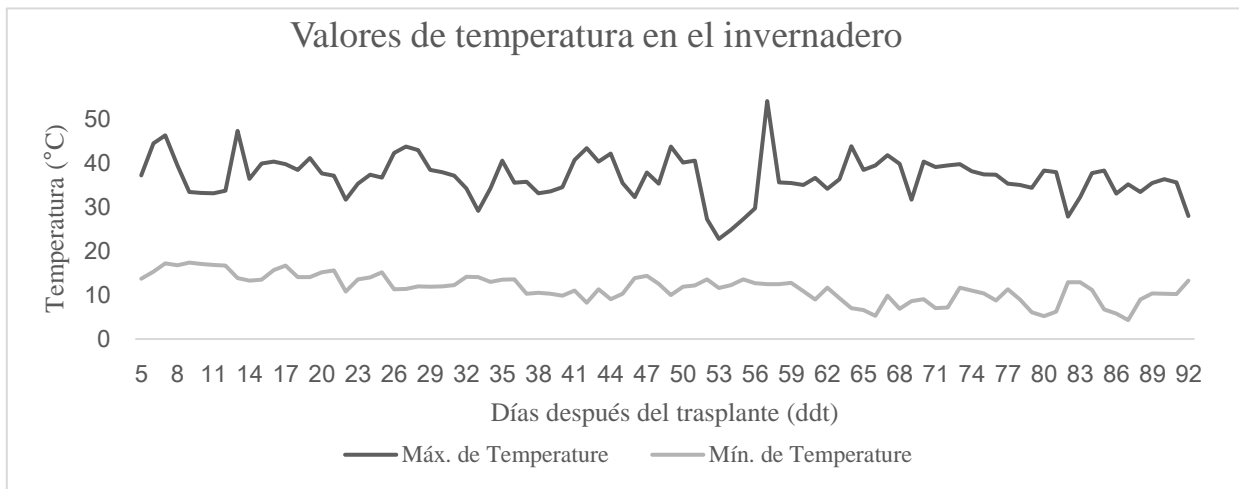
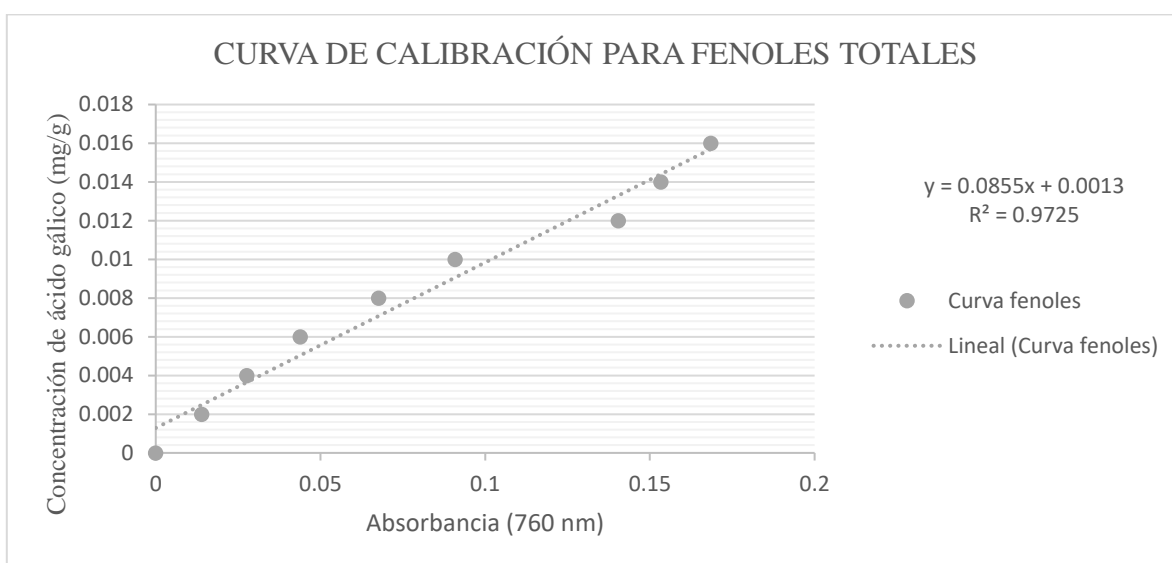
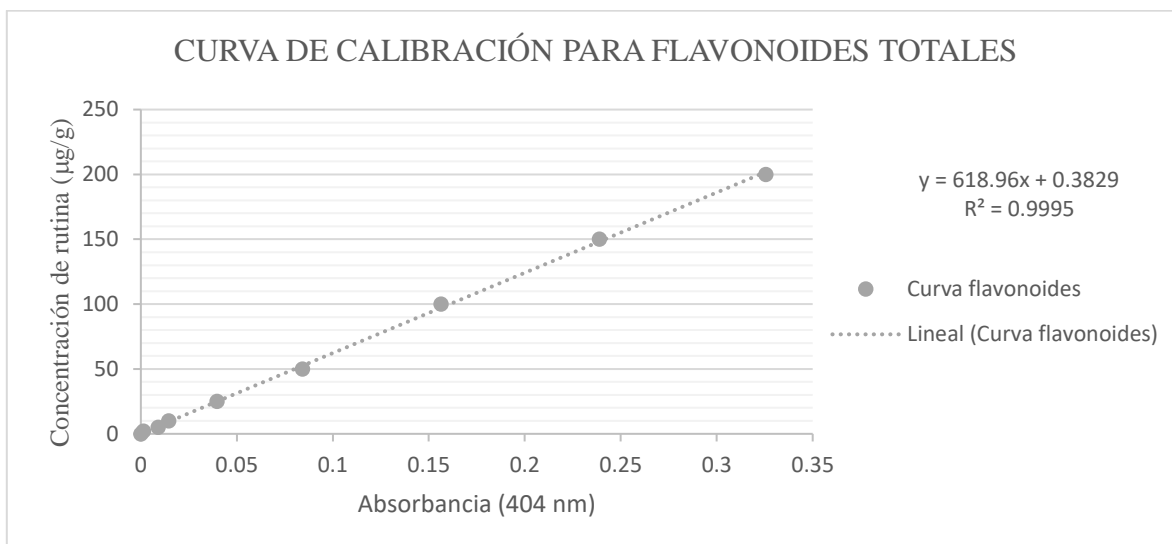


Figura 27. Temperaturas y radiación registradas en el invernadero durante el ciclo de cultivo Agosto-Diciembre 2016, desde 5 hasta 92 ddt.

C. ENSAYO CONTENIDO TOTAL DE FENOLES Y FLAVONOIDES. CURVAS DE CALIBRACIÓN.



El factor de dilución fue 1:10 en todas las muestras, por lo que los valores calculados por la ecuación de la recta posteriormente se multiplicaron por este factor de dilución para obtener los valores finales.

D. ANÁLISIS MOLECULARES. PRIMERS Y MARCADOR DE PESO MOLECULAR UTILIZADO.

Mn-SUPEROXIDO DISMUTASA.

NCBI data base: AF036936

Forward: CATGCAGCTTCATCACCAGA

Rerverse: ATAACAAGGCGCTTCAGCTC

FENILALANINA AMONIO LIASA

NCBI data base: EU616575

Forward: TGGTGGATTTTTCGAGTTGCAGCCG

Reverse: TGGCAAAGCGCCACGAGATAGGTTG

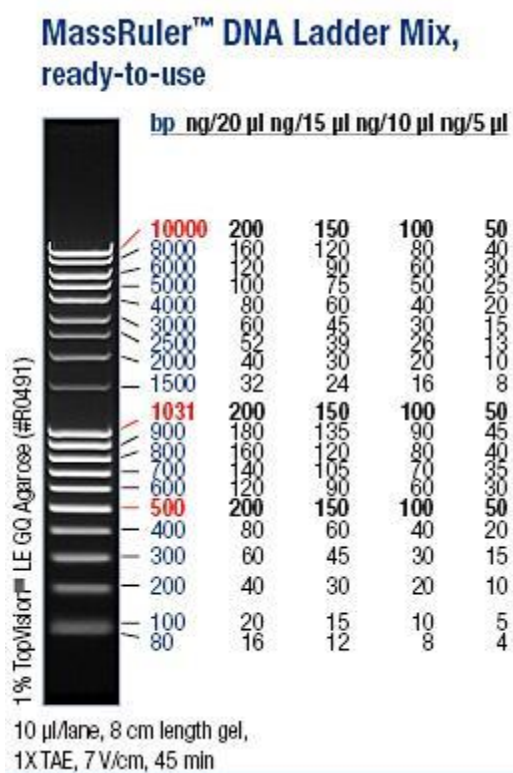


Figura 28. Marcador de peso molecular utilizado en los ensayos moleculares.

Cuadro 15. Porcentaje de metilación de 5-metilcitosina del DNA genómico (%5-metC) 10 días posteriores a la primera aplicación de H₂O₂. Control: Capacidad de campo asperjado solo agua (CC).

	Control	2 mM H ₂ O ₂	20 mM H ₂ O ₂	200 mM H ₂ O ₂
%5-metC				
CC	6.227 a	3.787 a	4.690 a	4.870 a
DH	11.170 a	12.170*	13.440**	16.360***
SQ	9.930 a	5.738 a	6.720 a	15.020***

Valores seguidos por la misma letra no presentaron diferencias significativas a un nivel de confianza $p < 0.05$ – (Prueba de comparaciones múltiples Dunnett). Verde: control. Anaranjado: Valores significativamente menores al control. Amarillo: Valores significativamente mayores al control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$