

RESPUESTA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA EN FRUTOS DE CHILE

ANCHO (*Capsicum annuum* L.) BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS

SALINO

Rogelio Ramírez-Serrano, Juan Ángel Larrinaga-Mayoral, Bernardo Murillo-Amador, Norma Yolanda Hernández-Saavedra e Hideyasu Fujiyama

RESUMEN

Se estudió la respuesta de la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) en frutos de chile (*Capsicum spp. cv. Caballero*) al someter las plantas a estrés salino moderado. Las plantas fueron expuestas en macetas durante 90 días a cinco tratamientos: control (agua potable; $1,3\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$), NaCl (2,8 y $4,0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$) y agua de mar (2,8 y $4,0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$). Los frutos fueron cosechados en etapa de maduración y se midió pigmentación a la madurez, número, largo, ancho, peso fresco, contenido mineral (Ca, Mg, K, Mn, Na y Cl), proteínas, actividad de SOD y CAT, lipoperoxidación y ácido ascórbico. No hubo diferencias significativas en número de frutos, largo, ancho y peso fresco. Los tratamientos produjeron diferencias en pigmentación de los frutos en la madurez, cambiando al rojo en am-

bas fuentes salinas a $4,0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$. Las proteínas solubles aumentaron en $2,8\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$, pero disminuyeron al aumentar la CE en ambas fuentes salinas. Los contenidos de Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Mn^{2+} disminuyeron al incrementar la CE, mientras Na^+ y Cl^- aumentaron en $4,0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ (NaCl). El ácido ascórbico aumentó ligeramente en $2,8\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$. El estrés salino incrementó la lipoperoxidación y la actividad de SOD y CAT siendo mayores en $4,0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$, y la respuesta en $2,8\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ en ambas fuentes de salinidad pareció mantener la homeostasis celular sin alterar la maduración. Se sugiere la posibilidad de utilizar las enzimas SOD y CAT como biomarcadores de maduración en frutos de chile bajo estrés salino, al mostrar una alta actividad en la maduración cuando se utilizó NaCl o agua de mar.

Introducción

La salinidad o estrés salino es uno de los principales factores abióticos que afectan el crecimiento, rendimiento y calidad de los cultivos agrícolas a través del estrés iónico y osmótico, limitando con ello la producción de alimentos de origen vegetal (Serrano, 1999; Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2001; Cramer, 2002; Aktas *et al.*, 2005). La problemática global actual referente a la disponibilidad de agua dulce para el desarrollo sostenible ha conducido a la necesidad de reutilizar agua en la agricultura (Shannon y Grieve, 1999) y ante la escasez de agua en las zonas áridas, sur-

ge la necesidad de utilizar aguas salobres para el riego de los cultivos, entre ellos el de chile *Capsicum annuum* (Larrinaga-Mayoral, 2001; Maggio *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2006). Por otro lado, el agua dulce se define como aquella que contiene cantidades mínimas de sales disueltas, especialmente NaCl, y el agua salobre como aquella que tiene más sal disuelta que el agua dulce, pero menos que la de mar. Para el año 2001 había 275Mha de tierras irrigadas (<http://apps.fao.org>, enero 2004), de las que ~20% son afectadas por la salinidad (Flowers y Flowers, 2005).

En México, 10% de la superficie agrícola irrigada es

afectada por la salinidad y de ésta, ~64% se localiza en la parte norte del país (Umali, 1993), que corresponde al clima de zonas áridas y semiáridas donde el problema se agudiza a causa de que el agua es limitada, los suelos presentan drenaje deficiente y existe una alta evaporación, condiciones favorables para la acumulación de sales en el suelo. La península de Baja California, por su ubicación geográfica se encuentra dentro de las zonas de mayor aridez en el mundo (Aguilera y Martínez, 1996; Nieto-Garibay *et al.*, 2002) y se caracteriza por tener una baja precipitación. La baja disponibilidad de agua de riego,

además del contenido de sales tanto en el suelo como en el agua, hace de las actividades agrícolas una tarea difícil. A pesar de esta problemática, el cultivo de chile ancho es de los más rentables en función de los volúmenes de agua utilizados, con un rendimiento promedio de $30\text{t}\cdot\text{ha}^{-1}$ (SAGARPA-BCS, 2005). Varios estudios (Walker *et al.*, 1980; Maggio *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2006) han mostrado que el estrés salino acelera la maduración de los frutos, disminuyendo con ello la etapa intermedia entre la maduración organoléptica y el inicio de la senescencia y, por lo tanto, su periodo de vida postcosecha en anaquel.

PALABRAS CLAVE / Biomarcadores / Catalasa / Salinidad / Superóxido Dismutasa /

Recibido: 26/03/2007. Modificado: 28/03/2008. Aceptado: 01/04/2008.

Rogelio Ramírez-Serrano. Ingeniero Bioquímico, Instituto Tecnológico de La Paz (ITLP), México. Maestro en Ciencias y Estudiante de Doctorado, Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste (CIBNOR), México. e-mail: rramirez04@cibnor.mx.

Juan Ángel Larrinaga-Mayoral. Ingeniero Bioquímico, ITLP, México. Doctor en Ciencias,

CIBNOR, México. Investigador, CIBNOR, México. Dirección: Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, C.P. 23090, La Paz, Baja California Sur, México. e-mail: larrinag04@cibnor.mx

Bernardo Murillo-Amador. Ingeniero Agrónomo, Universidad Autónoma de Baja California Sur, México. Maestro en Ciencias, Universidad Autó-

noma Agraria Antonio Narro, México. Doctor en Ciencias, CIBNOR, México. Investigador, CIBNOR, México. e-mail: bmurillo04@cibnor.mx.

Norma Yolanda Hernández-Saavedra. Licenciado en Biología, Universidad Autónoma de México. Maestría en Ciencias, CICIMAR-IPN, México. Doctor en Ciencias, CIBNOR, México. Investigador, CIBNOR,

México. e-mail: nhernan04@cibnor.mx.

Hideyasu Fujiyama. Ingeniero Agrónomo, Doctor en Ciencias, Universidad de Tottori (UT), Investigador del Laboratorio de Nutrición de Plantas, Facultad de Agricultura, Universidad de Tottori (UT), Japón. e-mail: fujiyama@muses.tottori-u.ac.jp.

ANTIOXIDANT ENZYMATIC RESPONSE OF HOT PEPPER (*Capsicum annuum* L.) UNDER SALINE STRESS CONDITIONS

Rogelio Ramírez-Serrano, Juan Ángel Larrinaga-Mayoral, Bernardo Murillo-Amador, Norma Yolanda Hernández-Saavedra and Hideyasu Fujiyama

SUMMARY

A pot experiment was carried out with hot pepper (*Capsicum* spp. cv. "Caballero") to investigate the response of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in fruits of this species under moderate saline conditions. The hot pepper plants were exposed during 90 days to five treatments: I) control (potable water: $1.3\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$), II) NaCl ($2.8\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$), III) NaCl ($4.0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$), IV) sea water ($2.8\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$), and V) sea water ($4.0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$). The hot pepper fruits were collected in the ripening phase and the ripening pigmentation, number of fruits, length, width, fresh weight, mineral contents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Mn^{2+} , Na^+ and Cl^-), proteins, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity, lipoperoxidation and ascorbic acid were measured. The results showed that morphological variables number, length, width and fresh weight of fruits remained without statistical significant differences between treatments but stayed the same as, or slightly less than that of the control. Saline treatments caused differences in fruit ripening pigmentation,

changing to red color at $4.0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ when NaCl or sea water were applied. Content of soluble proteins increased from the control to $2.0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ but decreased as electrical conductivity (EC) increased with NaCl or sea water. Calcium, magnesium, potassium and manganese content, decreased as CE increased, but sodium and chloride showed the contrary, being higher at $4.0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ with NaCl. Ascorbic acid remained unchanged between treatments, although slightly increased at $2.8\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ (NaCl). Salt stress was found to increase lipoperoxidation, superoxide dismutase and catalase activities being higher at $4.0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ when NaCl was used, but this enzymatic response in fruits at $2.8\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ in both saline sources, seemed to have maintained the cellular homeostasis, without altering its ripening. These findings suggest the possibility to use the enzymes SOD and CAT as ripening biomarkers in hot pepper fruits under saline stress, because they showed a high activity in the ripening of fruits when NaCl or sea water was used.

RESPOSTA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA EM FRUTOS DO "CHILE ANCHO" (*Capsicum annuum* L.) SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE SALINO

Rogelio Ramírez-Serrano, Juan Ángel Larrinaga-Mayoral, Bernardo Murillo-Amador, Norma Yolanda Hernández-Saavedra e Hideyasu Fujiyama

RESUMO

Estudou-se a resposta da superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) em frutos do chile (*Capsicum* spp. cv. Caballero) ao submeter as plantas a estresse salino moderado. As plantas foram expostas em macetas durante 90 dias a cinco tratamentos: controle (água potável; $1,3\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$), NaCl ($2,8$ e $4,0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$) e água de mar ($2,8$ e $4,0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$). Os frutos foram colhidos em etapa de amadurecimento e se mediu pigmentação na maturidade, número, comprimento, largura, peso fresco, conteúdo mineral (Ca, Mg, K, Mn, Na e Cl), proteínas, atividade de SOD e CAT, lipoperoxidação e ácido ascórbico. Não houve diferenças significativas em número de frutos, comprimento, largura e peso fresco. Os tratamentos produziram diferenças em pigmentação dos frutos amadurecidos, mudando ao vermelho em

ambas as fontes salinas a $4,0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$. As proteínas solúveis aumentaram em $2,8\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$, mas diminuíram ao aumentar a CE em ambas fontes salinas. Os conteúdos de Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Mn^{2+} diminuíram ao incrementar a CE, enquanto que Na^+ e Cl^- aumentaram em $4,0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ (NaCl). O ácido ascórbico aumentou ligeiramente em $2,8\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$. O estresse salino incrementou a lipoperoxidação e a atividade de SOD e CAT sendo maiores em $4,0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$, e a resposta em $2,8\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ em ambas fontes de salinidade pareceu manter a homeostases celular sem alterar o amadurecimento. Sugere-se a possibilidade de utilizar as enzimas SOD e CAT como biomarcadores de amadurecimento em frutos do "chile" sob estresse salino, ao mostrar uma alta atividade no amadurecimento quando se utilizou NaCl ou água de mar.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) tal como los radicales anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radicales hidroxilo (OH^{\cdot}) son subproductos que surgen como resultado de reacciones metabólicas normales y como respuesta al estrés. Algunos estudios (Gossett *et al.*, 1994; Hernández *et al.*, 1995; Burdon *et al.*, 1996; Shalata y Neumann, 2001; Aktas *et al.*, 2005) indican que las EROs están involucradas en daños a tejidos de plantas inducidos por salinidad. De esta manera, las EROs funcionan como media-

dores primarios del daño oxidativo en la senescencia de las plantas (Thompson *et al.*, 1987; Del Río *et al.*, 1998; Halliwell y Gutteridge, 1999). En las plantas, la producción y remoción de las EROs debe ser estrictamente controlada, realizando su eliminación principalmente por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes no enzimáticos incluyen los principales amortiguadores celulares redox ascorbato y glutatión (GSH), así como ácido ascórbico, tocoferol, flavonoides, alcaloides y carotenoides. Los mecanismos

enzimáticos en plantas incluyen enzimas secuestradoras de EROs como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT) (Mittler, 2002; Apel y Hirt, 2004). Foyer (1993) sugirió que la tolerancia al estrés se debe a un incremento en la capacidad antioxidante de las plantas, lo cual puede probarse mediante la caracterización bioquímica de los antioxidantes y su análisis molecular.

Según Brennan y Frenkel (1977) la maduración de los frutos y la senescencia pue-

den considerarse como un fenómeno oxidativo. Durante la maduración se presenta un daño oxidativo fuerte y en esta situación los sistemas antioxidantes pueden ayudar en limitar el incremento de las EROs (Jiménez *et al.*, 2002). Por su parte, Masia (1998) sugirió que la variación en las actividades de SOD y CAT determinadas a intervalos regulares desde el inicio de la cosecha, puede ayudar a esclarecer algunos aspectos fisiológicos de la maduración de los frutos y proveer un criterio más racional para una correcta

cosecha de cada cultivar. Si bien existen estudios sobre los efectos del estrés salino en frutos de chile (Walker *et al.*, 1980; Larrinaga-Mayoral, 2001; Maggio *et al.*, 2003; Aktas *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2006), no hay información suficiente sobre los efectos del estrés salino en la actividad de los sistemas de defensa antioxidante enzimáticos durante la maduración y su posible inducción benéfica dentro de un rango de salinidad tolerable ($\leq 4,0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$).

En este contexto, el objetivo de la presente investigación fue estudiar la respuesta de defensa antioxidante en frutos de chile ancho *cv.* Caballero bajo condiciones de estrés salino moderado a partir de dos fuentes de salinidad (NaCl y agua de mar) y de esta forma caracterizar biomarcadores antioxidantes como señalizadores de la maduración del cultivo, determinando además los umbrales de salinidad y su efecto en frutos de chile ancho durante el uso de aguas salobres en zonas áridas.

Materiales y Métodos

Sitio de estudio

El estudio se realizó en una estructura tipo invernadero con malla sombra, en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR), en los terrenos costeros de la localidad de El Comitán, ubicada a $19\text{-}31^\circ\text{N}$, en la porción meridional de la Península de Baja California, México.

Diseño experimental

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento. Agua potable de pozo con cantidades mínimas de sales disueltas, especialmente NaCl, y con una conductividad eléctrica (CE) de $1,3\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$, fue considerada como control (tratamiento I) y utilizada para la preparación y dilu-

ción de las soluciones salinas tanto de NaCl como de agua de mar. Los tratamientos salinos cuya fuente utilizada fue NaCl (Sigma) se ajustaron a conductividades de $2,8\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ y $4,0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ y se designaron como tratamientos II y III, respectivamente. Para los tratamientos salinos cuya fuente utilizada fue agua de mar filtrada igualmente tuvieron CE de 2,8 y $4,0\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$, obtenidas por dilución con agua potable y designados como tratamientos IV y V, respectivamente.

Las semillas de chile ancho, *Capsicum annuum* L. híbrido Caballero (Sakata SPP 7502) fueron sembradas en recipientes de germinación y posteriormente trasplantadas en macetas de plástico de 20cm de diámetro y 30cm de altura, con sustrato comercial tipo "peat-moss" (Sunshine, Sun Gro Horticulture, Canadá). Durante 10 días y previo al inicio de los tratamientos salinos, las plantas se regaron con Triple 20 (fertilizante comercial Fertipron: $\text{N}:\text{P}_2\text{O}_5:\text{K}_2\text{O}$) con una dosis de $150\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Posteriormente se inició la aplicación diaria de los tratamientos salinos por un período de 90 días, hasta la cosecha de los frutos. En cada tratamiento se cosecharon frutos de manera aleatoria e inmediatamente se registraron las variables morfológicas y el peso de los frutos. Para los análisis de aniones y cationes, los frutos se almacenaron en bolsas de papel y se deshidrataron en un horno (Shel Lab FX-5, Cornelius, EEUU) a 80°C durante 48h. El tejido del pericarpio del fruto se pulverizó en un molino eléctrico (Hamilton-Beach, EEUU) hasta obtener un material fino y homogéneo. Para los estudios de actividad bioquímica (proteína total, antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos y nivel de lipoperoxidación) las muestras se colocaron en bolsas de polietileno y se congelaron a -80°C en un ultra-congelador (Revco ULT-2186-9, Asheville, EEUU).

Variables morfológicas y peso de frutos

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

Análisis de aniones y cationes

Para determinar el contenido de Cl^- , se pesaron 0,3g de cada muestra seca y molida. Para su digestión, las muestras se calentaron a ebullición durante 1min, se filtraron con papel Whatman N° 2 y posteriormente con jeringa y filtro de rosca de $0,2\mu\text{m}$, depositando los filtrados en viales. El contenido de Cl^- se determinó mediante cromatografía de iones (Shimadzu HIC-6a, Japón). Para el análisis de cationes, se pesaron 0,2g, realizando la extracción mediante digestión ácida, adicionando 5ml de solución digestora $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HClO}_4:\text{HNO}_3$ (1:4:10). Las muestras se colocaron en plancha caliente por 20-45min. Una vez digeridas, se adicionaron 3ml de HCl 50% (v/v). La concentración de cationes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+ y Na^+) se analizó por espectrofotometría de absorción atómica (Shimadzu AA-660, Japón) de acuerdo a Klutte (1996).

Extracción enzimática

A partir de los frutos de chile ancho almacenados a -80°C , se tomó 1g de material vegetal de la región ecuatorial del fruto, que fue cortado y posteriormente congelado adicionando N_2 líquido e inmediatamente fue triturado en mortero. Al homogenizado obtenido se añadieron 2ml de solución amortiguadora de fosfatos de potasio conteniendo 100mM NaKP_i , pH 7,0; 0,3g polivinil-polipi-

rolidona (PVPP) y $200\mu\text{l}$ de fluoruro-fenil-metil-sulfonil (PMSF). La mezcla se agitó en vortex y se mantuvo por 30min en baño de hielo. El material sólido se concentró, centrifugando a 1000g por 10min y el sobrenadante recuperado se centrifugó nuevamente a 10000g por 20min. Posteriormente, el volumen obtenido se dividió en alícuotas de 1ml para realizar los análisis de proteína total, actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Todo el procedimiento de extracción se realizó a 4°C .

Proteína total

El contenido total de proteínas se determinó de acuerdo a una modificación del método descrito por Bradford (1976) mediante el procedimiento de micro-ensayo en microplaca, el cual implicó la adición del colorante ácido azul brillante de Coomassie G-250 (Bio-Rad). Las determinaciones de proteína se realizaron por triplicado, expresándose en $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Actividad de superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de SOD total (E.C. 1.15.1.1) fue determinada de acuerdo al método descrito por Paoletti *et al.* (1986) en extractos de proteína cruda, utilizando el sistema xantina/xantina oxidasa como generador constante de radical superóxido, el cual al entrar en contacto con el nitroazul de tetrazolio (NBT) lo reduce y forma un producto llamado formazan, cuyo cambio puede ser detectado por espectrofotometría cuando la enzima superóxido dismutasa (SOD) inhibe la reducción del NBT (Beauchamp y Fridovich, 1971). Todas las muestras se mantuvieron a 25°C . Para registrar la actividad enzimática se midió el cambio de la absorbancia a 560nm cada 30s durante 5min en un espec-

trofotómetro (Jenway 6505, EEUU). El método define una unidad de SOD como la cantidad de enzima que causa el 50% de la máxima inhibición de NBT a azul de formazan, expresando la actividad de los extractos como unidades SOD por mg de proteína. La determinación de cada extracto se realizó por triplicado.

Actividad de catalasa (CAT)

La actividad de la enzima catalasa (E.C. 1.11.1.6) se determinó a 25°C de acuerdo al método descrito por Aebi (1984), mediante la desaparición del H₂O₂ en solución amortiguadora y seguida a una longitud de onda de 240nm en un espectrofotómetro (Jenway, 6505, EEUU). La actividad catalasa se expresó como unidades de CAT por mg proteína, realizando la determinación de cada extracto por triplicado.

Peroxidación de lípidos

Se determinó la concentración de malondialdehído, el cual se utiliza como un índice adecuado para determinar el daño oxidativo resultado de la peroxidación de la membrana celular, de acuerdo al método indirecto descrito por Persky *et al.* (2000). De la región ecuatorial del tejido vegetal de frutos de Chile almacenados a -80°C, se cortaron y pesaron trozos de 0,1g, colocándose luego en un mortero al cual se le añadió 1,0ml del reactivo tiobarbitúrico TCA-TBA-HCl, seguido de una homogenización. Los tubos se incubaron durante 30min a 90°C, para después colocarse en baño de hielo y centrifugarse a 12000g durante 15min. Para corregir la turbidez no específica del sobrenadante de las muestras, el malondialdehído se midió a dos longitudes de onda, 535 y 600nm, debido a que el material puede suspenderse por la incubación a 90°C. El nivel de TBARS se expresó como nmol TBARS por mg proteína.

TABLA I
NÚMERO DE FRUTOS, LONGITUD, ANCHO, PESO FRESCO, PIGMENTACIÓN Y PROTEÍNA TOTAL DE FRUTOS DE CHILE ANCHO CV. CABALLERO

Tratamiento*	Número frutos	Longitud (mm)	Ancho (mm)	Peso fresco (g)	Maduración pigmentación	Proteína total (mg·ml ⁻¹)
I	5,0 ±1,6	110,0 ±13,5	50,0 ±8,0	63,1 ±13,7	Verde maduro	0,018 ±0,0048
II	5,0 ±2,2	97,4 ±11,6	48,9 ±6,8	49,4 ±17,0	Verde maduro	0,022 ±0,0072
III	7,0 ±2,3	106,0 ±8,7	49,9 ±10,8	51,9 ±13,0	Rojo-completo	0,011 ±0,0067
IV	5,8 ±2,8	98,6 ±18,2	52,0 ±4,7	58,1 ±14,9	Verde-rojo	0,019 ±0,0095
V	5,7 ±2,1	100,5 ±7,5	48,8 ±6,2	53,1 ±10,5	Rojo-completo	0,014 ±0,0065

* Tratamientos. I: Control 1,3dS·m⁻¹; II: NaCl 2,8dS·m⁻¹; III: NaCl 4,0dS·m⁻¹; IV: agua de mar 2,8dS·m⁻¹; y V: agua de mar 4,0dS·m⁻¹. Los valores representan la media ± desviación estándar.

TABLA II
CONTENIDO DE IONES EN BASE A PESO SECO EN FRUTOS DE CHILE ANCHO CV. CABALLERO

Tratamiento*	CE (dS·m ⁻¹)	Ca ²⁺ (mg)	Mg ²⁺ (mg)	K ⁺ (mg)	Mn ²⁺ (mg)	Na ⁺ (mg)	Cl ⁻ (mg)
I	1,3	0,177 a	0,510 a	7,530 a	0,0082 a	0,091 a	0,812 a
II	2,8	0,118 b	0,330 b	5,397 b	0,0076 b	0,175 b,c	1,066 a,b
III	4,0	0,094 b	0,319 b	5,492 b	0,0072 b	0,209 c	1,123 b
IV	2,8	0,105 b	0,326 b	5,660 b	0,0074 b	0,164 b	1,081 b
V	4,0	0,120 b	0,330 b	5,197 b	0,0074 b	0,132 a,b	1,079 b

* Tratamientos. I: Control 1,3dS·m⁻¹; II: NaCl 2,8dS·m⁻¹; III: NaCl 4,0dS·m⁻¹; IV: agua de mar 2,8dS·m⁻¹; y V: agua de mar 4,0dS·m⁻¹. Los valores representan la media ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).

Ácido ascórbico

De la región ecuatorial de cada fruto, se cortaron y pesaron 10g de tejido. El tejido vegetal se comprimió empleando un exprimidor de acero inoxidable para obtener la fase hidrofílica del tejido. A partir de cada muestra extraída se realizó una dilución 1:20 con ácido metafosfórico. Inmediatamente después se introdujo una tira indicadora de ácido ascórbico del kit RQflex plus (Merck 1.6981.0001, Alemania) en el vaso conteniendo la muestra diluida, eliminando el exceso de líquido con papel absorbente. El contenido de ácido ascórbico reducido y total se midió de acuerdo a la prueba de ácido ascórbico de Merck, el cual reduce el ácido molibdofosfórico amarillo a azul de fosfomolibdeno que fue determinado reflectométricamente. Como control positivo se utilizó L-ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, EEUU). Las determinaciones se realizaron por triplicado y el contenido se expresó en mg·l⁻¹.

Análisis estadísticos

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y cuando se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, se utilizó la prueba múltiple de comparación de medias de Tukey (P=0,05). Los análisis estadísticos y las gráficas se realizaron con el programa estadístico Statística 6.1 (Statística, 2001).

Resultados y Discusión

La Tabla I muestra los resultados correspondientes al número de frutos cosechados, longitud y ancho de frutos, peso fresco, estado de maduración al momento de la cosecha y el contenido de proteína total de frutos. El análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre los tratamientos para ninguna de las variables mencionadas. Sin embargo, los resultados del contenido de proteína indican que éste se incrementó en los frutos bajo los tratamientos II y IV. De acuerdo con Hernández-Saavedra y Ramírez-Serrano

(2004) la exposición a un estrés moderado induce un mejoramiento en la resistencia a un estrés mucho más severo (tolerancia cruzada) y, por lo tanto, como respuesta a una condición de estrés, la célula produce una serie de proteínas adicionales a aquellas que se sintetizaban antes de la condición de estrés. Los frutos del tratamiento III presentaron una disminución en la concentración de proteína total con respecto al resto de los tratamientos, sugiriendo que altas concentraciones de NaCl afectan el balance o estabilidad de los enlaces H-H que controlan la estructura secundaria de las proteínas (Serrano, 1999).

El análisis de varianza para el contenido de Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺ y Mn²⁺ en los frutos mostró diferencias significativas entre los tratamientos, observándose que su concentración disminuyó en los cuatro tratamientos salinos (Tabla II). Los contenidos de Na⁺ y Cl⁻ en frutos mostraron diferencias significativas entre los tratamientos, aumentando

significativamente en todos los tratamientos salinos, observándose los valores mayores en el tratamiento III (NaCl; 4,0dS·m⁻¹). La disminución del contenido de Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺ y Mn²⁺ confirma la presencia de estrés salino, registrándose en los frutos de plantas sometidas a este tratamiento daños por necrosis celular en el fruto. Un estudio realizado por Aktas *et al.* (2005) con frutos de chile ancho cv. Mazurca determinó que la disminución de Mn²⁺, y no la de Ca²⁺, era la causa principal de la formación de zonas necróticas conocidas como “podredumbre apical” (*blossom end rot* o BER) en los frutos de chile. Los resultados del presente estudio confirman ese hallazgo, ya que el contenido de Mn²⁺ en frutos disminuyó en los tratamientos salinos de 2,8 y 4,0dS·m⁻¹, conforme se incrementó el contenido de Na⁺ y Cl⁻ (Tabla II). Al considerar que el presente estudio se realizó dentro de un rango de salinidad moderada, acorde con las clasificaciones de Maas y Hoffman (1977) y Rhoades *et al.* (1992), el contenido máximo de sales tolerables fue menor a 4,0dS·m⁻¹. De esta manera, los resultados permiten entender el efecto de dosis específicas mínimas y máximas de sales en los frutos de chile, especie considerada como moderadamente sensible a la salinidad (Larrinaga-Mayoral, 2001).

Por otro lado, el nivel de la actividad SOD se incrementó significativamente en los tratamientos salinos (Figura 1). La activación del sistema de defensa antioxidante enzimático surgió como respuesta específica a la formación de especies reactivas de O₂ (EROs), que se crean por el cambio en el metabolismo basal de la célula y como respuesta al estrés iónico inducido por las altas concentraciones de Na⁺ y Cl⁻ y la disminución de Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ y K⁺, caracterizados por su antagonismo. En este sentido, el

tratamiento III presentó un incremento importante en la actividad SOD (311,1 unidades SOD por mg de pro-

teína), para dismutar o convertir radicales superóxido (*O₂⁻) a H₂O₂. Este aumento se debe a un incremento en la actividad total y/o nivel de enzimas SOD, es decir, la activación de mayor número de isoenzimas SOD como respuesta a un nivel moderado de estrés oxidativo generado por el

frutos de los tratamientos II, III y V (Figura 1). Este aumento se relacionó directamente con el aumento de la actividad SOD, que al catalizar el radical *O₂⁻ a H₂O₂ hace necesaria la participación de enzimas CAT para convertir el H₂O₂ formado en agua y O₂, inhibiendo así la formación de radicales ·OH y sus subsecuentes daños a la célula. La baja actividad catalasa obtenida en el tratamiento IV, pudo deberse a que en las plantas el peróxido de hidrógeno es usualmente removido por dos tipos de enzimas: catalasas y peroxidasas. Sin embargo, la participación de ambas es dependiente de la concentración del peróxido de hidrógeno dismutado por la SOD. Cuando los niveles de catalasa son bajos, la enzima ascorbato peroxidasa al igual que la catalasa puede reducir el peróxido de hidrógeno para formar agua. Esta enzima se encuentra en todas las partes de las plantas, incluyendo el espacio apoplástico, en donde bajo condiciones de estrés salino se produce un aumento de especies reactivas de oxígeno. Los niveles intermedios de actividad SOD y CAT, sugieren que a estas concentraciones salinas se logró mantener un equilibrio óxido-reductor entre la generación de EROs y la respuesta inmediata de los sistemas de defensa antioxidante. La peroxidación de lípidos mostró diferencias significativas entre tratamientos (Fig. 2). El nivel más alto de lipoperoxidación se observó en el tratamiento III, que presentó el mayor efecto tóxico por estrés iónico, acelerando la maduración de los frutos y causando daños a sus tejidos (necrosis celular), característicos de la deficiencia de Ca²⁺ en los frutos. No obstante que se cuantificó la mayor actividad enzimática SOD y CAT en el tratamiento III, dicha respuesta celular no fue suficiente para disminuir o evitar la peroxidación de lípidos. Este resultado se relaciona directamente

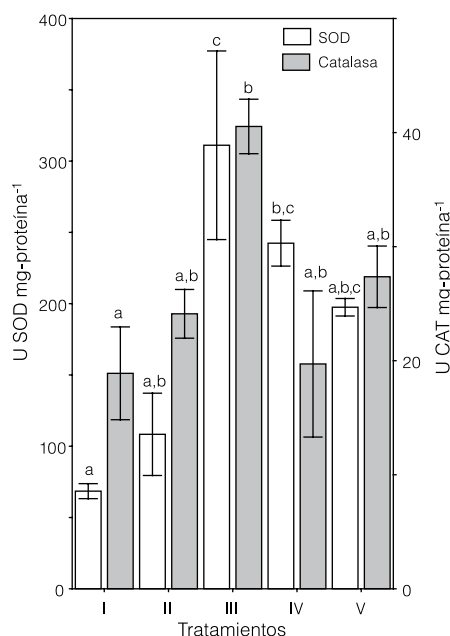


Figura 1. Actividad superóxido dismutasa (SOD) y actividad catalasa (CAT) en frutos de chile ancho cv. Caballero. Tratamientos. I: Control 1,3dS·m⁻¹; II: NaCl 2,8dS·m⁻¹; III: NaCl 4,0dS·m⁻¹; IV: agua de mar 2,8dS·m⁻¹; y V: agua de mar 4,0dS·m⁻¹. Las barras en columnas representan la media ± error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).

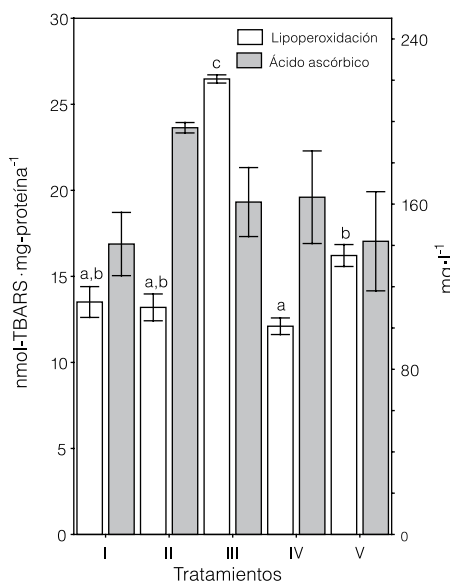


Figura 2. Actividad lipoperoxidasa y concentración de ácido ascórbico en frutos de chile ancho cv. Caballero. Tratamientos. I: Control 1,3dS·m⁻¹; II: NaCl 2,8dS·m⁻¹; III: NaCl 4,0dS·m⁻¹; IV: agua de mar 2,8dS·m⁻¹; y V: agua de mar 4,0dS·m⁻¹. Las barras en columnas representan la media ± error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05).

con el contenido de Na⁺ y Cl⁻ en los frutos irrigados con NaCl a una C.E. de 4.0 dS·m⁻¹, determinándose esta concentración de sales como el umbral de salinidad para el chile ancho *cv.* Caballero. El índice de peroxidación de lípidos se ha utilizado como un marcador del grado de estrés oxidativo a nivel de la membrana celular. Los radicales libres si no son inactivados, inducen peroxidación de lípidos (Dhindsa *et al.*, 1982) lo cual conduce al rompimiento de la membrana celular asociada con la maduración de los frutos. Por otro lado, no se presentaron diferencias significativas en el contenido de ácido ascórbico en los frutos en la etapa de maduración analizada. Sin embargo, los resultados muestran que en los frutos del tratamiento II se incrementó la biosíntesis de este ácido (Fig. 2). Posiblemente este incremento haya sido inducido como respuesta a la formación de radicales *O²⁻, actuando como mecanismo de defensa antioxidante (Kader y Lee, 2000). Los resultados del presente estudio muestran que la maduración de los frutos se relacionó directamente con el nivel de estrés oxidativo generado a su vez por estrés iónico y osmótico en el fruto del chile. La maduración de los frutos de los tratamientos a 2,8dS·m⁻¹ no se modificó cualitativamente por las concentraciones de sales (Tabla I). En cambio, los frutos cosechados de los tratamientos a 4,0dS·m⁻¹ de ambas fuentes salinas, mostraron cambios evidentes en la etapa de maduración, con una mayor pigmentación de coloración roja, debida a carotenoides, capsantina y criptoxantina. De acuerdo con el estudio de Collera-Zúñiga *et al.* (2005), este incremento surge como respuesta a la generación de EROs por el estrés osmótico y su efecto directo en la inducción de la biosíntesis de cromoplastos carotenoides y en la transformación de cloroplastos

a cromoplastos (Bouvier *et al.*, 1998). Los carotenoides tienen un papel importante en la coloración de los frutos y actúan como antioxidantes, reaccionando con las EROs como el radical *O²⁻, por lo que es posible inferir que el incremento rápido de pigmentos de coloración roja en los frutos es una respuesta celular para reducir los niveles altos de estrés oxidativo generados en los tratamientos III y V. Esto se relaciona directamente con las altas actividades SOD y CAT y el nivel de lipoperoxidación, causados por el incremento significativo de Na⁺ y Cl⁻. En general, los resultados mostraron que la respuesta del sistema antioxidante enzimático a través de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa tuvieron una respuesta específica, como mencionan Kotchoni y Gachomo (2006), de acuerdo con el grado de estrés oxidativo generado por la salinidad, y en base a su incremento y/o disminución es posible determinar etapas de maduración de frutos de chile en condiciones basales y bajo estrés salino. Estos resultados indican que los riegos con aguas salobres con CE de 2,8dS·m⁻¹ permitirán obtener frutos de chile ancho de calidad aceptable y con un contenido de antioxidantes significativamente alto. Los resultados del presente estudio permiten proponer el uso de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa como biomarcadores del estrés salino y de la maduración de los frutos de chile ancho, ya que en base a su nivel de actividad permiten diferenciar el grado de lipoperoxidación y los estados de madurez del fruto bajo condiciones de estrés salino moderadas. Por otro lado, la principal diferencia encontrada entre los tratamientos con NaCl (II y III) y agua de mar (IV y V) correspondió al contenido de Na⁺, lo que indica que las CE ajustadas a 2,8 y 4,0dS·m⁻¹ de los tratamientos IV y V, respectivamente, que

fueron preparados a partir de la mezcla de agua dulce de pozo y de agua de mar (diluciones), no se obtuvieron únicamente por el contenido de iones Na⁺, sino también por la conductividad eléctrica de otras sales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Mario Benson Rosas, María del Carmen Mercado Guido, Lidia Hiraes Lucero y Orlando Lugo Lugo por su apoyo técnico, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca N° 144425.

REFERENCIAS

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 105: 121-126.
- Aguilera CM, Martínez R (1996) *Relaciones agua, suelo, planta, atmósfera*. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 256 pp.
- Aktas H, Karni L, Dong-Chil C, Turhan E, Bar-Tal A, Alón B (2005) The suppression of salinity-associated oxygen radicals production, in pepper (*Capsicum annuum*) fruit, by manganese, zinc and calcium relation to its sensitivity to blossom-end rot. *Physiol. Plant.* 123: 67-74.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-287.
- Bouvier F, Backhans RA, Camara B (1998) Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 273: 30651-30659.
- Bradford M (1976) A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brennan T, Frenkel C (1977) Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiol.* 59: 411-416.
- Burdon RH, O'Kane D, Fadzillah N, Gill V, Boyd PA, Finch RP (1996) Oxidative stress and responses in *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* sub-

jected to chilling and salinity stress. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 468-472.

- Collera-Zúñiga O, García FJ, Meléndez RG (2005) Comparative study of carotenoid composition in three Mexican varieties of *Capsicum annuum* L. *Food Chem.* 90: 109-114.
- Cramer GR (2002) Sodium-calcium interactions under salinity stress. En Läubli A, Lüttge U (Eds.) *Salinity: environment-plants-molecules*. Kluwer. Dordrecht, The Netherlands. pp. 205-227.
- Del Río LA, Pastori GM, Palma JM, Sandalio LM, Sevilla F, Corpas FJ, Jiménez A, López-Huertas E, Hernández JA (1998) The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. Update on Biochemistry. *Plant Physiol.* 116: 1195-1200.
- Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Reid DM (1982) Leaf senescence and lipid peroxidation: Effects of some phytohormones, and scavengers of free radicals and singlet oxygen. *Physiol. Plant.* 56: 453-457.
- Flowers TJ, Flowers SA (2005) Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders? *Agric. Water Manag.* 78: 15-24.
- Foyer CH (1993) Ascorbic Acid. En Alscher RG, Hess JL (Eds.) *Antioxidants in higher plants*. CRC. Boca Ratón, FL, EEUU. pp. 51-58.
- Gossett DR, Millhollon EP, Lucas MC, Don D (1994) Antioxidant response to salt stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars in cotton. *Crop Sci* 34: 706-714.
- Halliwel B, Gutteridge JMC (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3a ed. Oxford University Press. Oxford, RU. 936 pp.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Ann. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 51: 463-499.
- Hernández-Saavedra NY, Ramírez-Serrano R (2004) Differential expression and function of copper-zinc superoxide dismutases under metal stress in the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. *J. Mar. Biotechnol.* 6: S1-S5.
- Hernández JA, Olmos E, Corpas FJ, Sevilla F, del Río LA (1995) Salt induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Sci.* 105: 151-167.
- Jiménez A, Gómez JM, Navarro E, Sevilla F (2002) Changes

- in the antioxidative systems in mitochondria during ripening of pepper fruits. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 515-520.
- Kader AA, Lee SK (2000) Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharv. Biol. Technol.* 20: 207-220.
- Kawano T, Kawano N, Muto S, Lapeyrie F (2002) Retardation and inhibition of the cation-induced superoxide generation in BY-2 tobacco cell suspension culture by Zn and Mn. *Physiol. Plant.* 114: 395-404.
- Klutte A (1996) Physical and mineralogical methods. En *Methods of Soil Analysis*. Part 1. 2ª ed. American Society of Agronomy / Soil Science Society. Madison, WI, EEUU. pp. 901-926.
- Kotchoni SO, Gachomo EW (2006) The reactive oxygen species network pathways: An essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *J. Biosci.* 31: 389-404.
- Larrinaga-Mayoral JA (2001) *Efecto de NaCl sobre la fisiología, crecimiento y producción en plantas de chile (Capsicum annuum L.)*. Tesis. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, BCS, México. 142 pp.
- Maggio A, De Pascale S, Ruggiero C, Barbieri G (2003) Physiological responses of pepper to salinity and drought. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 128: 48-54.
- Maas EV, Hoffman GJ (1977) Crop salt tolerance-current assessment. *J. Irrig. Drain.* 103: 115-134.
- Masia A (1998) Superoxide dismutase and catalase activities in apple fruit during ripening and post-harvest and with special reference to ethylene. *Physiol. Plant.* 104: 668-672.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.
- Navarro JM, Garrido C, Carvajal M, Martínez V (2006) Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chem.* 96: 66-73.
- Nieto-Garibay A, Murillo-Amador B, Troyo-Diéguez E, Larrinaga-Mayoral JA, García-Hernández JL (2002) El uso de compostas como alternativa ecológica para la producción sostenible del chile (*Capsicum annuum L.*) en zonas áridas. *Interciencia* 27: 417-421.
- Paoletti FD, Alduccini A, Caparrini A (1986) A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase in tissue extracts. *Anal. Biochem.* 154: 536-541.
- Persky AM, Green P, Stublely L, Howell C, Zaulyanov L, Brazeau G, Simpkins J (2000) Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223: 59-66.
- Rhoades J, Kandiah A, Mashali A (1992) *The Use of Saline Waters for Crop Production*. FAO Irrigation and Drainage Paper 48. Roma, Italia. 133 pp.
- SAGARPA-BCS (2005) Estadísticas del cierre agrícola 2005. www.sagarpa.gob.mx/dlg/bajacaliforniasur/Agricultura/index.htm. (Cons. 01/2008).
- Serrano R (1999) A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J. Exp. Bot.* 50: 1023-1036.
- Shalata A, Neumann PM (2001) Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. *J. Exp. Bot.* 52: 2207-2211.
- Shannon MC, Grieve CM (1999) Tolerance of vegetable crops to salinity. *Sci. Hort.* 78: 5-38.
- Statistica (2001) *System Reference*. Statsoft. Tulsa, OK, EEUU. 1098 pp.
- Thompson JE, Ledge RL, Barber RF (1987) The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytol.* 105: 317-344.
- Umali DL (1993) Irrigation induced salinity. Technical Paper N° 215. World Bank. Washington, DC, EEUU. pp. 3-25.
- Walker RR, Hawker JS, Torokfalvy E (1980) Effect of NaCl on growth, ion composition and ascorbic acid concentrations of capsicum fruit. *Sci. Hort.* 12: 211-220.
- Zhu JK (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6: 66-71.