



Instituto de Conservación y Mejora  
de la Agrodiversidad Valenciana



Instituto de Biología Molecular  
y Celular de Plantas

# Respuesta enzimática antioxidante en condiciones de estrés hídrico y salino en berenjena (*S. melongena*) y especies relacionadas

---

*Trabajo de Fin de Máster en Mejora Genética Vegetal*

**Andrea Solana García**

**Tutores:** Ana María Fita Fernández

Óscar Vicente Meana

María de la O Plazas Ávila

# Índice

Resumen.....	4
I. Introducción .....	6
1.1 Cambio Climático y su efecto sobre el rendimiento agrícola.....	6
1.2 Efecto del estrés hídrico sobre el crecimiento vegetal.....	7
1.2.1 Salinidad.....	7
1.2.2 Sequía.....	11
1.2.3 Mecanismos adaptativos de las plantas al estrés abiótico.....	15
1.3 Material vegetal para el estudio de estrés hídrico.....	23
1.3.1 Berenjena cultivada ( <i>Solanum melongena</i> ) .....	23
1.3.2 Especies silvestres relacionadas como recursos fitogenéticos.....	23
II. Objetivos.....	25
III. Materiales y Métodos.....	26
3.1 Material vegetal.....	26
3.2 Diseño experimental.....	27
3.3 Evaluación de los parámetros de crecimiento.....	28
3.4 Determinación de la actividad enzimática .....	29
3.4.1 Superóxido dismutasa (SOD).....	29
3.4.2 Catalasa (CAT).....	30
3.4.3 Glutación reductasa (GR).....	30
3.5 Determinación del contenido en peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	31
3.6 Análisis estadístico.....	31
IV. Resultados.....	32
4.1 Evaluación de parámetros del crecimiento.....	32
4.1.1 Tratamiento de salinidad.....	32
4.1.2 Tratamiento de sequía.....	34
4.2 Determinación de la actividad enzimática .....	36
4.2.1 Tratamiento de salinidad.....	36
4.2.2 Tratamiento de sequía.....	37
4.3 Determinación del contenido en peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	39
4.3.1 Tratamiento de salinidad.....	39
4.3.2 Tratamiento de sequía.....	40

V.	Discusión.....	42
5.1	Relevancia del proyecto.....	42
5.2	Evolución del crecimiento en condiciones de estrés abiótico.....	42
5.3	Respuesta al tratamiento de salinidad. ....	43
5.4	Respuesta al tratamiento de sequía. ....	44
5.5	Perspectivas futuras.....	45
VI.	Conclusiones.....	47
VII.	Bibliografía.....	48

*«Después de todo, ¿qué es un científico entonces? Es un hombre curioso que mira a través del ojo de una cerradura, la cerradura de la naturaleza, tratando de saber qué es lo que sucede»*

*Jacques Yves Cousteau*

## Resumen.

El cultivo en zonas semiáridas y con sequía son dos retos agrícolas antiguos. Sin embargo, la gran explosión poblacional de las últimas décadas junto con las consecuencias derivadas del Cambio Climático hace que la búsqueda de soluciones sea más acuciante. La berenjena es un cultivo muy extendido en el mundo sobre el cual no se han realizado estudios sobre su posible adaptación a estas condiciones y sobre el potencial genético de sus especies relacionadas. Una de las respuestas al estrés salino e hídrico es la acción de enzimas antioxidantes. En este contexto, los objetivos del trabajo fueron: i) evaluar la tolerancia al estrés abiótico en berenjena (*S. melongena*), en uno de sus parientes silvestres (*S. insanum*) y sus híbridos, ii) analizar las respuestas antioxidantes enzimáticas a la salinidad y a la sequía de dichas accesiones. Para ello, tras someter a las plantas a los estreses mencionados se analizó el desarrollo de las plantas, sus niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la actividad específica de las enzimas: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión reductasa. Las plantas evaluadas no se vieron afectadas gravemente en su desarrollo debido a los tratamientos de salinidad, mientras que la sequía sí afectó al desarrollo de las plantas. En ningún caso se observó una actividad enzimática antioxidante alterada frente al estrés. Al contrastar estos resultados con la bibliografía se puede concluir que los genotipos estudiados son capaces de mantener el balance osmótico a nivel celular sin necesidad de llegar a un estado de estrés oxidativo que induzca la actividad enzimática antioxidante. Para futuros estudios se recomienda aumentar el estrés para conseguir una respuesta más intensa y probar otros genotipos para comprobar si esta respuesta es generalizada en berenjena y sus especies relacionadas.

## Abstract.

Crops in semi-arid and drought areas are two old agricultural challenges. However, the great population explosion of the last decades together with the consequences derived from Climate Change makes the search for solutions more pressing. The eggplant is a widespread crop in the world on which no studies have been carried out on its possible adaptation to these conditions and on the genetic potential of its related species. One of the responses to saline and hydric stress is the action of antioxidant enzymes. In this context, the objectives of the work were: i) to evaluate the tolerance to abiotic stress in eggplant (*S. melongena*), in one of its wild relatives (*S. insanum*) and its hybrids, ii) to analyze the enzymatic antioxidant responses to the salinity and drought of these accessions. To this end, after subjecting the plants to the aforementioned stresses, the development of the plants, their H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels and the specific activity of the enzymes: superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase were analysed. The plants evaluated were not seriously affected in their development due to the salinity treatments, while the drought affected the development of the plants. In no case was

an antioxidant enzymatic activity altered in the face of stress observed. When contrasting these results with the bibliography, it can be concluded that the genotypes studied are capable of maintaining the osmotic balance at the cellular level without the need to reach a state of oxidative stress that induces antioxidant enzymatic activity. For future studies it is recommended to increase stress to achieve a more intense response and to test other genotypes to see if this response is generalized in eggplant and its related species.

# I. Introducción

## 1.1 Cambio Climático y su efecto sobre el rendimiento agrícola.

La gran explosión demográfica experimentada en el último siglo sitúa la población mundial en 7.6 mil millones actualmente. A pesar del cambio en el estilo de vida y a las pérdidas de fertilidad, se estima que la población alcance los 8.6 millones en 2030, los 9.8 mil millones en 2050 y los 11.2 mil millones en 2100 (Naciones Unidas, 2017). Este drástico incremento de la población supone un problema de abastecimiento que compromete a la agricultura mundial. Para poder abastecer a la humanidad, se estima que se deberá incrementar en un 70% la producción mundial de alimentos para el año 2050 (FAO, 2009). El 90% de este incremento de la producción de cultivos procederá del aumento del rendimiento y de la intensificación de los cultivos, lo que supone un desafío para la investigación en materia de mejora del rendimiento de sistemas agrarios (FAO, 2009).

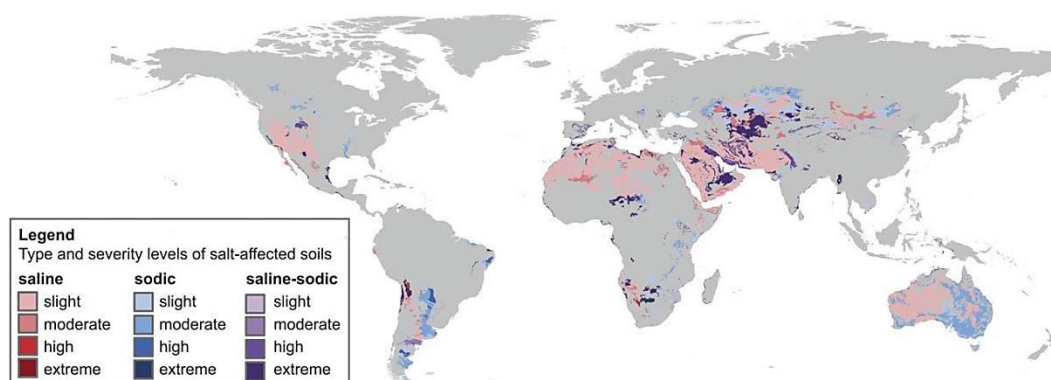
Sin embargo, no sólo nos enfrentamos a los problemas derivados del crecimiento demográfico y abastecimiento mundial. La mejora de los rendimientos de los cultivos se ve obstaculizada por los cambios que nuestro planeta está experimentando recientemente asociados a lo que llamamos “Cambio Climático”. La Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC), en su artículo 1, define el cambio climático como “cambio de clima atribuido directa o indirectamente a la actividad humana que altera la composición de la atmósfera global y que se suma a la variabilidad natural del clima observada durante períodos de tiempo comparables”. Los patrones climáticos erráticos y extremos de sequía y lluvias prolongadas diezman los cultivos a lo largo del mundo (FAO, 2019). Por lo tanto, la agricultura no sólo se enfrenta con el reto de abastecer a la población mundial creciente, sino que debe hacerlo adaptándose a los espacios reducidos debido a problemas en el ámbito del cambio climático tales como la sequía, las altas temperaturas y las inundaciones (Taher *et al.* 2017), estimándose una pérdida del 70% del rendimiento atribuido a dichos estreses abióticos (Bray *et al.*, 2000; Fig 1 y 4).

En definitiva, factores como la salinidad o la sequía son cruciales en el estudio de los cultivos con el fin de poder conseguir los rendimientos agrarios requeridos por la humanidad ya que producen cambios metabólicos que alteran el desarrollo de la planta y comprometen su producción y rendimiento (Kumar *et al.* 2018, Muchate *et al.* 2016).

## 1.2 Efecto del estrés salino e hídrico sobre el crecimiento vegetal.

### 1.2.1.1 Salinidad

Los suelos salinos se encuentran en 800 millones de hectáreas de la superficie cultivable del planeta (Munns, 2008; Fig.1). Podemos considerar un suelo como salino cuando su conductividad (EC) equivale a  $4 \text{ dSm}^{-1}$  o, lo que es lo mismo, 40 mM NaCl generando una presión osmótica de 0.2MPa lo cual reduce significativamente el rendimiento de la mayoría de los cultivos (Munns, 2008). Las consecuencias sobre los cultivos son, principalmente, toxicidad iónica, necrosis y clorosis producida por acumulación de iones  $\text{Na}^+$ .



**Fig.1:** Extensión mundial de suelos afectados por la salinización tanto salina como sódica de origen tanto natural como humano (Wicke *et al.* 2011).

Los efectos de la salinidad varían dependiendo de las condiciones climáticas, la intensidad lumínica, las condiciones del suelo y la especie (Tanx *et al.*, 2015).

Podemos clasificar los diferentes grupos de plantas en función de su tolerancia a la salinidad. Por un lado, tenemos las plantas glicófitas, dentro de las cuales se encuentran la mayoría de plantas cultivadas, que se caracterizan por no poder desarrollarse correctamente en presencia de altos niveles salinos incluso en exposiciones durante periodos de tiempo reducidos. Su crecimiento queda inhibido completamente a concentraciones de  $\text{NaCl} = 100\text{-}200 \text{ mM}$ , trayendo consecuentemente la muerte de la planta (Larcher, 2003). Por otro lado, tenemos las plantas euhalófitas, las cuales pueden sobreponerse a los efectos del estrés salino debido a que han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia. Estas plantas pueden regular su contenido salino mediante exclusión salina (previene la entrada de sal en el sistema vascular), eliminación de sal (a través de glándulas secretoras) y mediante succulencia (incrementando el volumen celular progresivamente para regular las concentraciones internas de sal) (Larcher, 2003).

Así pues, bajo condiciones salinas, las plantas son capaces de activar diferentes mecanismos fisiológicos y bioquímicos para hacer frente a las consecuencias del estrés.

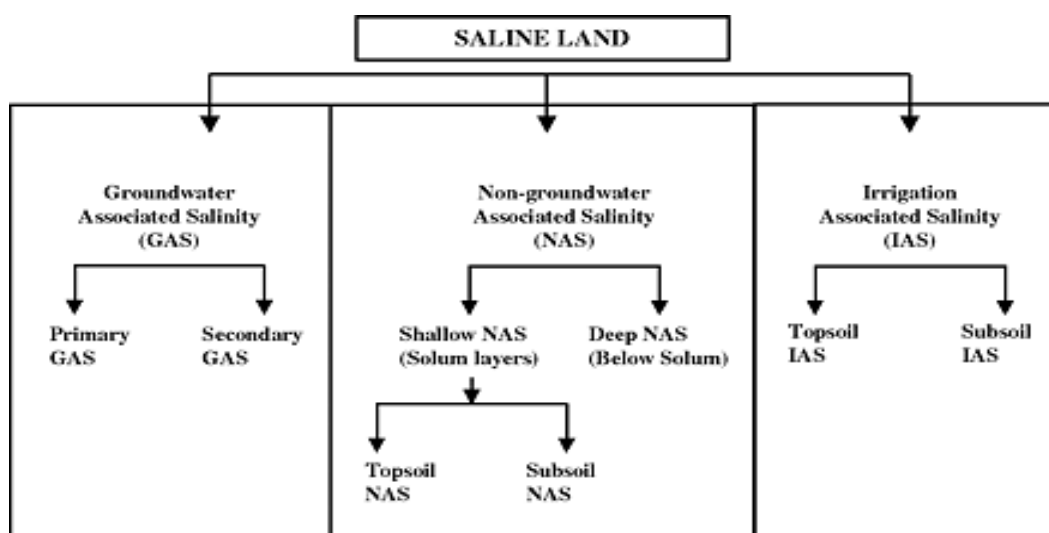


### 1.2.1.2 Factores que intervienen en la generación de suelos salinos.

Todos los suelos contienen sales solubles pero, cuando las condiciones ambientales y del suelo permiten una elevación de la concentración por encima de los niveles estipulados, la producción agrícola, la salud ambiental y el bienestar económicos disminuyen, convirtiéndose de esta forma en un problema (Rengasamy, 2006).

Los suelos salinos se forman mediante: salinización primaria que consiste en procesos geoquímicos y climatológicos de origen natural; y salinización secundaria potenciada por prácticas humanas (Schofiel & Kirkby, 2003). Además de la clasificación en función de cómo se ha formado el suelo salino, también podemos realizar otra clasificación de los tipos de salinidad basados en los procesos del suelo (Rengasamy, 2006; Fig. 2):

- I. *Salinidad asociada a aguas subterráneas (GAS)*: el agua emerge a la superficie del suelo arrastrando las sales disueltas en ella. La fuerza que impulsa este movimiento es la evaporación del suelo junto con la transpiración de la planta.
- II. *Salinidad no asociada a aguas subterráneas (NAS)*: acumulación de sales derivadas de la lluvia y la exposición al medio se acumulan en el suelo debido a que la capa freática es profunda. La acumulación en estas capas superficiales tiene efectos negativos sobre la productividad agrícola.
- III. *Salinidad asociada al riego (EEI)*: las sales introducidas por el agua de riego se almacenan en la zona de la raíz debido a una lixiviación insuficiente. Se da en riegos con mala calidad de las aguas y drenaje y manejos inadecuados.



**Fig. 2:** Principales tipos de salinidad en los suelos basados en procesos de salinización

### 1.2.1.3 Características de los suelos salinos y daños sobre los cultivos.

La salinidad del subsuelo inherente a procesos naturales confiere unas propiedades físicas de atracción y repulsión entre los iones y las partículas del suelo que permite la formación de agregados, consiguiéndose una conformación que permite la adecuada oxigenación del terreno y el correcto movimiento del agua, lo cual favorece el desarrollo vegetal (Rengasamy & Olsson, 1991). Sin embargo, un incremento en la cantidad de sal tanto subterránea como en la superficie del terreno se debe al uso de agua salina para irrigación, lo que afecta negativamente a los cultivos (Rengasamy & Olsson, 1991).

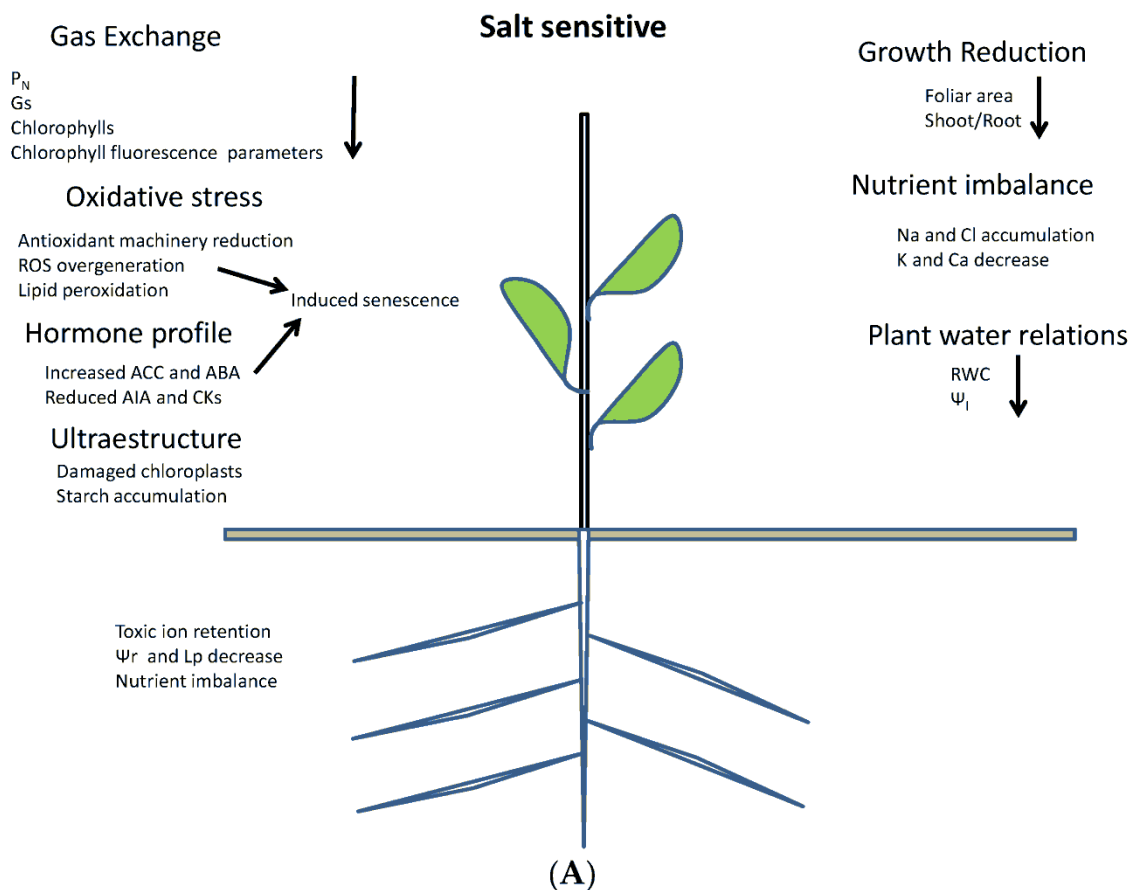
La salinidad genera efectos adversos en las plantas en diferentes fases de su desarrollo como la germinación, crecimiento, desarrollo del fruto y rendimiento, observándose una pérdida del 50% del mismo en suelos con una salinidad de  $8.5 \text{ dSm}^{-1}$  (Shahbaz *et al.* 2012). La determinación de la tolerancia a la sal en diferentes cultivos varía así como entre las diferentes variedades del mismo cultivo. En base a estas diferencias, se ha estudiado dicha tolerancia en fases tempranas del desarrollo vegetal (germinación y estadio de plántula) en diferentes variedades y se ha determinado que los efectos de la salinidad son más dañinos durante estas etapas tempranas. La tolerancia a la salinidad, por lo general, va incrementándose en plantas maduras y difiere de unas variedades a otras (Akincia *et al.* 2004).

La presencia de niveles mayores de solutos en el exterior respecto al interior de las raíces ocasiona una “sequía fisiológica” que genera una pérdida de balance osmótico que impide o dificulta la entrada de agua a la planta (Zhang *et al.* 2010; Fig.3). Por tanto, las sales absorbidas por la planta no afectan directamente sobre el crecimiento, sino indirectamente, afectando a la turgencia, fotosíntesis y/o actividad enzimática (Munns, 1992). Para demostrar la complejidad del estrés salino, Munns en 1992 desarrolló un modelo para ilustrar el efecto de la salinidad en dos fases del crecimiento de la planta. En una primera instancia, el crecimiento se reduce debido a una disminución del potencial hídrico del suelo (fase osmótica). Más tarde, aparecen efectos específicos como los daños foliares causados por la sal y la consecuente mortalidad debido al aumento de sal en las paredes celulares o el citoplasma (fase iónica). Al morir las hojas por acumulación de sal, disminuye el suministro de carbohidratos y/o hormonas del crecimiento a las regiones meristemáticas, inhibiéndose así el crecimiento.

Esta disminución del potencial hídrico durante la fase osmótica provoca que la planta tenga menos agua en su interior, cerrando sus estomas para evitar la pérdida de líquido a través de la transpiración (Fig.3). Sin embargo, esta respuesta incrementa considerablemente los niveles intracelulares de oxígeno y se inicia la formación de

cantidades dañinas de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Frary *et al.* 2010). Las ROS son moléculas entre las cuales destacan principalmente el peróxido de hidrógeno, el oxígeno singlete y el ión hidróxido. Se producen como subproductos de diversas vías metabólicas en compartimentos celulares como cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas. En condiciones estables, las ROS se eliminan mediante mecanismos de defensa antioxidante, estableciéndose un equilibrio. Sin embargo, este equilibrio puede verse alterado por el estrés abiótico, produciéndose un incremento repentino de ROS que produce un daño significativo en las estructuras celulares (Gill & Tuteja, 2010).

Los pigmentos fotosintéticos son unos de los principales afectados por la actividad de las ROS generadas durante el estrés salino tanto a corto como a largo plazo (Fig. 3). A corto plazo, la salinidad afecta a la fotosíntesis debido a las limitaciones estomáticas, lo que conlleva una disminución de la asimilación de carbono y produce una parada en el crecimiento (Parida & Das, 2005). A largo plazo, la acumulación de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en las hojas induce la producción de ROS que dañan las estructuras de la clorofila y carotenoides, dañando así el mecanismo fotosintético (Gupta & Huang, 2014).

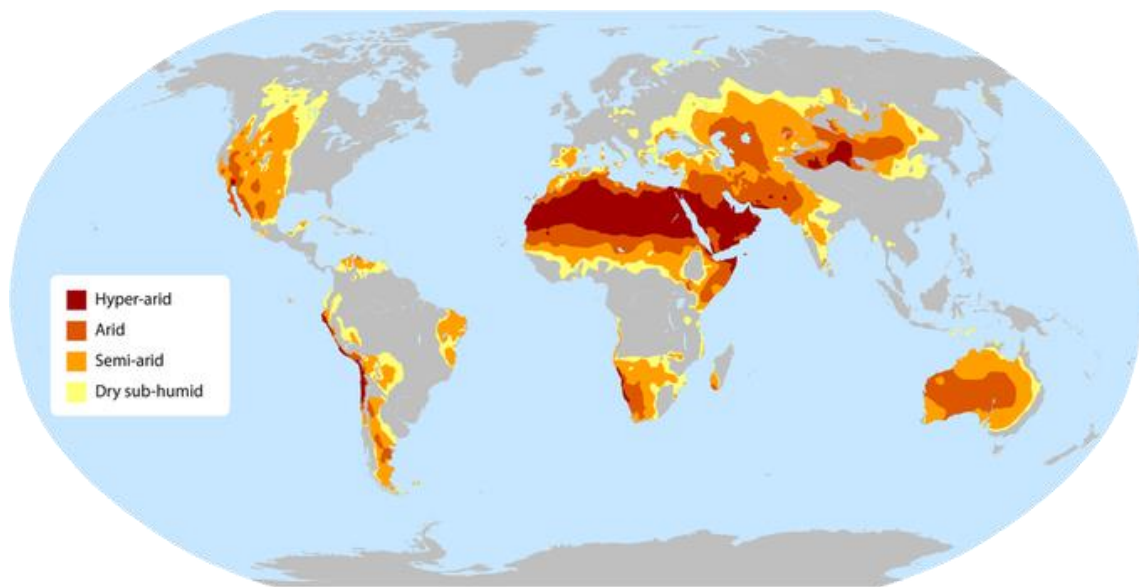


**Fig. 3:** Esquema que muestra los diferentes efectos del estrés salino en plantas susceptibles (Acosta-Motos *et al.* 2017)

### 1.2.2 Sequía.

El agua es el constituyente más importante de la planta, comprendiendo el 90% de su peso fresco en la mayoría de herbáceas. Debido a sus propiedades biofísicas, permite que se lleven a cabo reacciones bioquímicas y fisiológicas fundamentales para la planta, como ser el primer donador de electrones en la fotosíntesis o su contribución al mantenimiento de la turgencia (Wood, 2005).

Durante milenios, las tierras secas han sido modeladas por una combinación de bajas precipitaciones, olas de calor y actividades humanas como el pastoreo, la deforestación y los cultivos (FAO, 2007). Las tierras secas se clasifican según su Índice de aridez (IA), es decir, la relación entre la precipitación media anual y la evapotranspiración potencial. Una zona es considerada seca cuando su IA < 0.65, clasificándose las tierras secas en hiperáridas, semiáridas y secas subhúmedas (PNUMA, 2007; Fig. 4). Alrededor de un 35% de la superficie terrestre es considerada árida o semiárida (Wood, 2005). Estos suelos tienden a ser vulnerables a la erosión hídrica y eólica al estar expuestos a una intensa meteorización, lo que disminuye su contenido mineral y hace que su fertilidad sea baja (FAO, 2007).



**Fig. 4:** Tierras secas del mundo y sus subtipos. Elaborado a partir de datos de PNUMA- WCMC (2007)

Por tanto, la sequía es una forma fisiológica de déficit hídrico donde el agua del suelo disponible para la planta es inadecuado, generando efectos adversos para el metabolismo (Kumar *et al.* 2018). Sin embargo, las plantas cuentan con respuestas fisiológicas y bioquímicas inducidas bajo condiciones de sequía. De esta forma podemos clasificar las plantas según su economía hídrica bajo dos estrategias: plantas homoiohídricas y plantas polikilohídricas (Wood, 2005). Las plantas homoiohídricas han desarrollado una serie de mecanismos protectores que mantienen un contenido favorable de agua protoplásmica o son capaces de apaciguar los efectos deletéreos a

nivel celular causados por el estrés. Por el contrario, las plantas poikilohídricas son incapaces de controlar la pérdida de agua hacia el medio, por lo que el resultado se traduce en un contenido de agua celular fluctuante de acuerdo con las condiciones externas del medio (Wood, 2005).

Por otro lado, podemos realizar otra clasificación atendiendo a las estrategias y mecanismos funcionales para hacer frente a las condiciones de sequía y la resistencia al estrés hídrico (Vilagrosa *et al.* 2012):

- I. *Prevención de la sequía*: se basa en mantener unos niveles hídricos adecuados a nivel tisular en condiciones de déficit hídrico. Las especies que siguen esta estrategia pueden evitar la pérdida de agua mediante el cierre de estomas o aumentar la absorción de agua desde las raíces.
- II. *Tolerancia a la sequía*: consiste en una serie de rasgos fisiológicos que permiten el transporte continuo de agua, el intercambio gaseoso y la supervivencia celular a bajos potenciales hídricos mediante ajuste osmótico, mayor resistencia del xilema a sufrir embolismos y la capacidad de las células para permanecer con vida.
- III. *Huida de la sequía*: en este grupo se incluyen aquellas especies vegetativas que exhiben una dormancia parcial durante el verano, como especies caducifolias, especies semidecíduas o rizomatosas.

#### 1.2.2.1 Factores que intervienen en la generación de la sequía.

La sequía es la deficiencia de agua en un periodo prolongado en comparación con una condición normal que suele caracterizarse por su duración, gravedad, intensidad y extensión espacial, es decir, se trata de un fenómeno multivariante (Xu *et al.* 2015).

Podemos clasificar las sequías en cinco categorías (Ashok *et al.* 2010):

- I. *Sequía meteorológica*: falta de precipitación en una región durante un periodo de tiempo.
- II. *Sequía hidrológica*: está relacionada con un periodo donde los recursos hídricos superficiales y subterráneos son inadecuados para los usos establecidos del agua en un determinado sistema de gestión de recursos hídricos.
- III. *Sequía agrícola*: periodo con disminución de la humedad del suelo y consecuente fracaso de los cultivos. Este tipo de sequía reúne las definiciones de sequía meteorológica e hidrológica y además añade las diferencias generadas entre la evapotranspiración real y la evapotranspiración potencial. Además, intervienen las propias demandas de agua de la planta dependientes de las condiciones climáticas, las

características biológicas de la variedad, la etapa del crecimiento y las propiedades físico-químicas del suelo.

- IV. *Sequía socioeconómica*: se asocia con los problemas de los sistemas de recursos hídricos para satisfacer las demandas de agua.
- V. *Sequía de las aguas subterráneas*: disminución del nivel de agua almacenada en el suelo.

En las últimas décadas se han experimentado una mayor frecuencia de sequías debido a la creciente demanda de agua y a los cambios en los patrones climáticos, lo que sugiere una necesidad de mejora en la planificación de los recursos hídricos (Ashok *et al.* 2010). En este aspecto, uno de los factores para evitar la formación de sequía agrícola viene dado a través de la mejora de las prácticas agronómicas. El estudio de los parámetros del suelo, la planta y la atmósfera determinan cuándo y cuánta agua debe aplicarse a cada cultivo. Un riego deficitario provoca estrés por sequía que deriva en una disminución del crecimiento y del desarrollo, que afectan a la productividad y calidad de los frutos (Karam *et al.*, 2011).

Por tanto, la comprensión de la dinámica de humedad del suelo, el efecto del calentamiento global y la sequía agrícola y subterránea puede llevarnos a formular mejores prácticas de gestión en el uso del agua que nos ayuden a mitigar los riesgos derivados de la sequía contribuyendo al correcto funcionamiento de los cultivos agrícolas (Grillakis, 2019).

#### 1.2.2.2 Características de los suelos secos y daños sobre los cultivos.

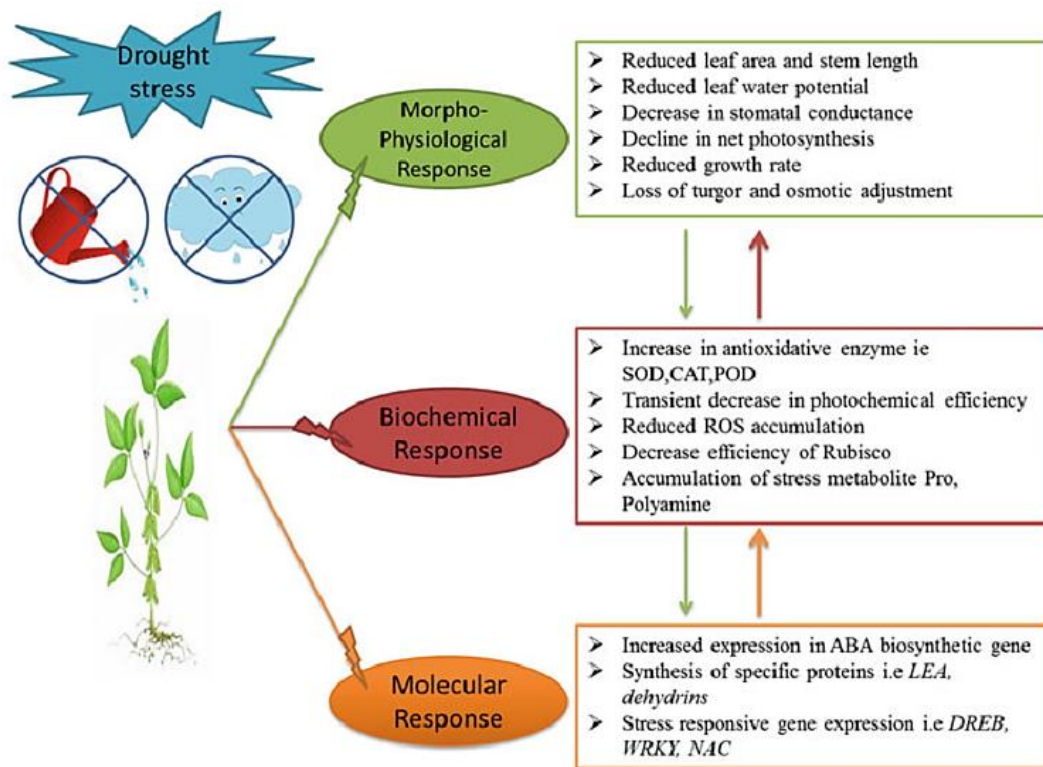
Los efectos que se manifiestan en los cultivos como consecuencia de la sequía son similares a los que podemos encontrar en los casos de salinidad, ya que en ambos casos se genera un déficit hídrico y tanto las consecuencias manifestadas por la planta como los mecanismos fisiológicos y bioquímicos empleados para solventarlos siguen la misma tendencia (Fig. 5).

Por un lado, las plantas afectadas por la escasez de agua tienden, a corto plazo, a ajustar la apertura de sus estomas para minimizar la pérdida de agua, aumentando de esta forma la eficiencia en el uso del agua. Sin embargo, al igual que ocurría en salinidad, un cierre de estomas genera a largo plazo una disminución de la fotosíntesis, así como una restricción en el anabolismo y la acumulación de sustancias nutricionales que afectan a la calidad de los frutos y al rendimiento de los cultivos (Bian *et al.* 2019).

En estas condiciones de sequía, está bien documentado que la fotosíntesis neta, la eficiencia en el fotosistema II (PSII), la composición de los pigmentos fotosintéticos, la integridad de la membrana celular y la estabilidad proteica juegan un papel muy

importante en la resistencia celular al estrés por sequía. Bajo estas condiciones, los fosfolípidos de las membranas biológicas experimentan transiciones de fase y fusiones de membrana que son perjudiciales para la estructura y función de las mismas (Vilagrosa *et al.* 2010).

Otra de las consecuencias fisiológicas de la sequía es la cavitación del xilema y la pérdida de conductividad hidráulica. La cavitación es el fenómeno por el cual se forman burbujas al fluir un líquido hacia una región donde la presión del líquido es menor a su presión de vapor. Este fenómeno tiene lugar en el xilema de las plantas vasculares cuando la tensión de la savia se incrementa lo suficiente para que el aire del interior se expanda hasta llenar las traqueidas. Como consecuencia, los conductos embolizados ya no transportan savia, disminuyendo la conductancia hidráulica del xilema y provocando el cierre de estomas. La consecuencia última de este proceso va desde la abscisión de las hojas hasta la muerte de la planta (Vilagrosa *et al.* 2012).



**Fig. 5:** Respuestas de la planta ante condiciones de estrés por sequía (Kumar *et al.* 2018)

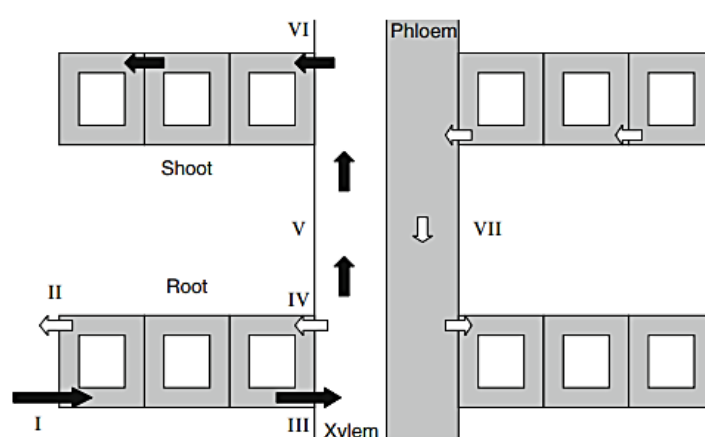
### 1.2.3 Mecanismos adaptativos de las plantas al estrés abiótico.

Los mecanismos adaptativos al estrés abiótico que han ido desarrollando las plantas a lo largo de la evolución intentan, por lo general, evitar la entrada de iones, secretarlos o aumentar el volumen celular para el mantenimiento de estos valores (Acosta-Motos *et al.* 2017). Las principales respuestas empleadas son el control del flujo y la compartimentalización iónica, la producción de moléculas antioxidantes, la regulación osmótica y la variación en el contenido de pigmentos fotosintéticos (Muchate *et al.* 2016; Acosta-Motos *et al.* 2017). Con todo esto, el hecho de que una planta sea más o menos sensible al estrés abiótico no viene dado por unos mecanismos diferentes de los habituales, sino por la eficiencia en su activación y desarrollo (Wang *et al.* 2003).

#### 1.2.3.2 Control del flujo y compartimentalización iónica.

Las plantas deben mantener un nivel específico de iones  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  para poder realizar funciones relacionadas con la expresión génica, síntesis de proteínas, producción de energía y señalización celular para el correcto mantenimiento del metabolismo (Amtmann & Beilby, 2010).

La tasa de  $Na^+$  que encontramos en los brotes está determinada por la absorción de  $Na^+$  en las raíces y su translocación al resto de la planta. Los iones se introducen en la planta a través de los apoplastos y cruzando la membrana plasmática de las células epidérmicas de la raíz. Una vez dentro, pueden llegar al xilema y desplazarse a la parte aérea de la planta. El movimiento de salida ocurre de manera contraria, trasportándose los iones desde la parte aérea a través del floema hasta las células de la raíz, por donde regresan al sustrato (Amtmann & Beilby, 2010; Fig.6).



**Fig. 6:** Flujo de  $Na^+$  a través de la planta (Amtmann & Beilby, 2010); I: Flujo unidireccional de  $Na^+$  hacia las células de la raíz; II: flujo unidireccional de  $Na^+$  hacia el medio externo; III: carga de  $Na^+$  en el xilema de la raíz; IV: recuperación de  $Na^+$  desde el xilema de la raíz; V: translocación raíz-ápice de  $Na^+$  en el xilema; VI: descarga de  $Na^+$  desde el xilema hacia el ápice; VII: reciclaje de  $Na^+$  a través del floema.



Uno de los mecanismos para el mantenimiento de los niveles iónicos es la compartimentalización de iones tóxicos y/o solutos compatibles para aumentar la tolerancia osmótica (Türkan *et al.* 2009). La compartimentalización iónica consiste en el traslado de iones desde el citosol hasta las vacuolas a través de diferentes tipos de transportadores, disminuyendo la concentración de iones en el citosol y aumentando el potencial osmótico celular, ayudando a mantener la presión de turgencia y el resto de las funciones celulares bajo condiciones de estrés (Yadav *et al.* 2011; Acosta-Motos *et al.* 2017).

En general, los mecanismos de exclusión de sal son funcionales con niveles moderados de salinidad mientras que la acumulación de iones es el principal mecanismo utilizado por plantas halófitas debido a su capacidad de compartimentalizar iones en las vacuolas (Yadav *et al.* 2011).

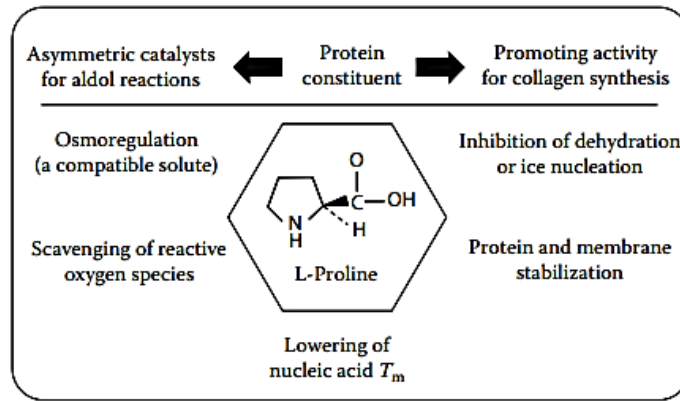
### 1.2.3.2 Producción y acumulación de osmolitos.

El proceso de regulación osmótica de apertura de estomas se produce a través del movimiento de solutos, llamados osmolitos, que influyen en el movimiento de agua entre las células con propósito de la hidratación celular y la absorción radicular (Acosta-Motos *et al.* 2017).

Los *osmolitos*, o solutos compatibles, son moléculas orgánicas de bajo peso molecular que se acumulan en presencia de estrés hídrico y no interfieren con las reacciones químicas normales (Yadav *et al.* 2011). Algunos de estos compuestos son: carbohidratos (sacarosa, sorbitol, manitol, glicerol); compuestos nitrogenados (glicina, betaína, prolina, putrescina) y ácidos orgánicos (malato y oxalato) (Acosta-Motos *et al.* 2017). El grado de ajuste osmótico difiere entre las especies vegetales. También puede verse afectado por la velocidad a la que se impone el estrés, la edad de la planta y el estado de desarrollo, entre otros factores (Xiaoli *et al.* 2015).

Entre los osmolitos orgánicos, la prolina y la glicina-betaína son los solutos compatibles más importantes y eficientes:

- I. *Prolina*: es un compuesto nitrogenado que además de su papel en el ajuste osmótico celular, actúa como osmoprotector y tiene propiedades antioxidantes, funcionando como una chaperona molecular de bajo peso molecular para proteger la estructura de las macromoléculas durante los procesos de deshidratación, confiriendo resistencia al estrés ambiental (Xiaoli *et al.* 2015)(Fig. 7). Un aumento en los niveles de prolina en general se correlaciona positivamente con los niveles de tolerancia a la sal (Yadav *et al.* 2011).



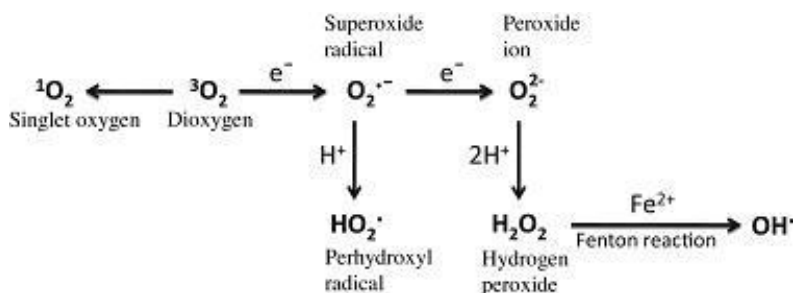
**Fig. 7:** Funciones fisiológicas de la prolina en situaciones de estrés abiótico (Heuer, 2010)

- II. *Glicina-Betaína*: es un compuesto nitrogenado que se sintetiza y acumula bajo condiciones de estrés abiótico. Actúa como osmolito para proteger el PSII y protege la integridad de las membranas y la actividad enzimática en situaciones de estrés osmótico (Jagendorf & Takabe, 2001). También tiene funciones de almacenamiento del nitrógeno para el mantenimiento del pH celular, desintoxicación celular y eliminación de radicales libres (Yadav *et al.* 2011).

### 1.2.3.3 Estrés Oxidativo.

El estrés oxidativo se puede definir como “un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, lo que lleva a la interrupción de la señalización redox y el control y/o daño molecular” (Gebika & Krych-Modej, 2019).

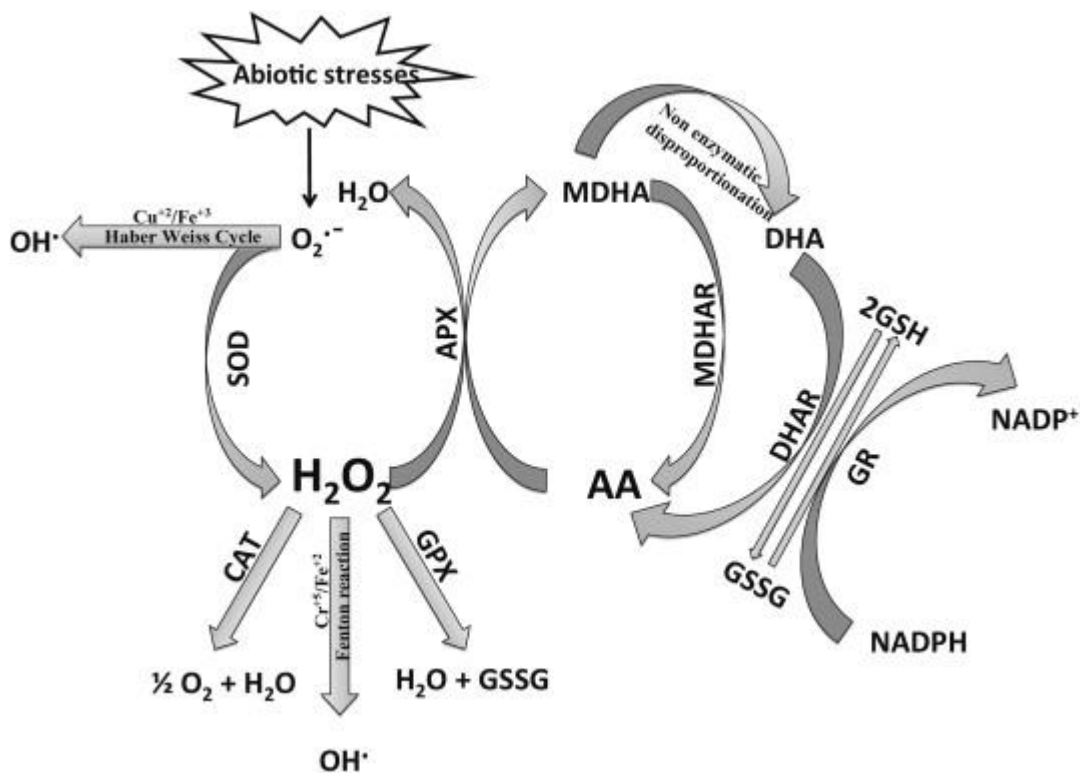
La salinidad y la sequía se caracterizan, entre otras cosas, por inducir este tipo de estrés. Durante el estrés hídrico, la disponibilidad de CO<sub>2</sub> atmosférico disminuye debido al cierre estomático, disminuyendo el consumo de NADPH en el ciclo de Calvin. Cuando la ferredoxina se reduce en exceso durante la transferencia de electrones estos pueden transferirse del PS-I al oxígeno, formando radicales superóxido mediante la reacción de Mehler e iniciando reacciones en cadena para la generación de más ROS (Türkan & Demiral, 2009; Fig. 8).



**Fig. 8:** Generación de ROS por transferencia de energía (Gill & Tuteja, 2010)

Aunque todas las ROS son extremadamente reactivas y citotóxicas, en este apartado haremos una breve mención especial al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Este compuesto se forma durante reacciones como la dismutación de  $O_2^{\cdot-}$  por la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), fotorrespiración,  $\beta$ - oxidación de ácidos grasos y descomposición inducida por protones de  $O_2^{\cdot-}$  y en defensa contra patógenos (Sharma & Ahamad, 2014). El peróxido de hidrógeno desempeña un papel doble en las plantas: a bajas concentraciones actúa como molécula señalizadora implicada en procesos de respuesta ante el estrés biótico y abiótico; y, a altas concentraciones, activa los procesos de muerte celular programada (Gill & Tuteja, 2010; Quan *et al.* 2008).

Por tanto, la exposición de las plantas a condiciones ambientales desfavorables como temperaturas extremas, sequía, salinidad y deficiencia de nutrientes, entre otro, puede aumentar la producción de ROS. Para protegerse de los daños citotóxicos causados por estos compuestos, las células vegetales cuentan con diferentes tipos de defensa antioxidante tanto enzimáticos como no enzimáticos (Gill & Tuteja, 2010; Fig. 9) que veremos en los siguientes apartados.



**Fig. 9:** Mecanismo de defensa a las ROS. Abreviaturas: SOD (superóxido dismutasa); APX (ascorbato peroxidasa); CAT (catalasa); GPX (glutatión peroxidasa); MDHA (monodeshidroascorbato); MDHAR (monodeshidroascorbato reductasa); DHA (deshidroascorbato); DHAR (deshidroascorbato reductasa); GSH (glutatión reducido); GSSG (glutatión oxidado); GR (glutatión reductasa) (Gill & Tuteja, 2010)

#### 1.2.3.3.1 Sistemas antioxidantes no enzimáticos.

##### **I. Compuestos fenólicos.**

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de la planta derivados exclusivamente del fenilpropanoide derivado del shikimate y/o las vías del policétido, que presentan más de un anillo fenólico y están desprovistos de cualquier grupo funcional basado en el nitrógeno en su expresión estructural más básica (Quideau *et al.* 2011).

Los polifenoles “verdaderos” se clasifican en tres grupos: *taninos condensados*, como las proantocianidinas y prodelfinidinas; *taninos hidrolizables*, derivados del metabolismo del ácido gálico, derivado del shikimate; y los *florotaninos*, que se encuentra en rodofitas (algas rojas) (Quideau *et al.* 2011) y están implicados en procesos de protección de la planta contra el estrés biótico y abiótico. Tienen múltiples formas de actuación: secuestro de radicales con actividad oxidativa, quelatar iones metálicos y supresión de enzimas implicadas en la síntesis de ROS (Cheynier, 2012).

Algunos compuestos fenólicos están extremadamente extendidos, mientras que otros son específicos de ciertas familias de plantas o solo se encuentran en determinados órganos o en ciertas etapas del desarrollo (Cheynier, 2012).

##### **II. Carotenoides**

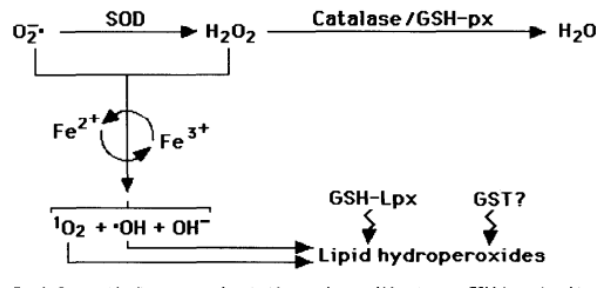
Los carotenoides son un grupo de pigmentos tetraterpenoides de origen natural distribuidos ampliamente en plantas, algas, hongos y bacterias (Sun *et al.* 2018). Tanto los carotenoides como los productos derivados de ellos a través de la escisión oxidativa y enzimática (apocarotenoides) son cruciales para diversos procesos biológicos en plantas, como el ensamblaje de fotosistemas y complejos antenas de la captación de luz para la fotosíntesis y la fotoprotección, y la regulación del crecimiento y desarrollo, así como su papel en la señalización celular (Nisar *et al.* 2015).

Su papel como antioxidante es la eliminación de oxígeno singlete y radicales peróxido y en la desactivación de moléculas involucradas en la generación de los mismos (Stahal & Sies, 2003). Además de su papel como fotoprotectores y antioxidantes, actúan como “sensor” y “señalizador” del estrés oxidativo tras la oxidación por ROS (Nisar *et al.* 2015).

### 1.2.3.3.2 Compuestos antioxidantes enzimáticos.

#### **I. Superóxido dismutasa**

La enzima superóxido dismutasa (SOD) es probablemente una enzima tan antigua como el propio metabolismo aeróbico y el proceso de generación de ATP a partir de glucosa y  $O_2$  a través del citocromo oxidasa (James, 1994). Esta enzima va a catalizar el procesamiento de superóxido ( $O_2^-$ ) en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) mediante una serie de reacciones químicas (Skalická *et al.* 2012; Fig. 10). En este proceso, el  $O_2$  se reduce en cuatro electrones a  $H_2O$ . Ocasionalmente (alrededor del 5% de las veces) tiene lugar la reducción de un único electro del  $O_2$ , produciendo superóxido ( $O_2^- \cdot$ ). Las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa completan la reducción de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  (James, 1994).



**Fig. 10:** Superóxido dismutasa y rutas antioxidantes. Abreviaturas: GSH-px (glutatión peroxidasa); GSH-Lpx (glutatión hidropoxidasa lipídica); GST (glutatión-S-transferasa) (James, 1994)

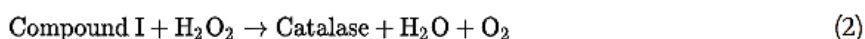
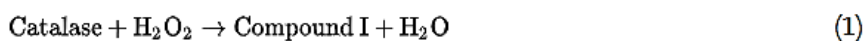
Se ha visto que esta enzima tiene unas implicaciones importantes en la tolerancia al estrés en plantas y proporciona la primera línea de defensa contra los efectos tóxicos de los niveles elevados de ROS, aumentándose la actividad de SOD en presencia de las mismas (Gill & Tuteja, 2010).

Se han realizado muchos estudios sobre producción de plantas transgénicas tolerantes al estrés abiótico mediante la sobreexpresión de diferentes SOD. Un ejemplo de ello lo encontramos en el trabajo de Badawi *et al.* 2004 en el cual se realizó una transformación mediada por *Agrobacterium* para insertar la secuencia de ADNc de Cu/Zn-SOD citosólico de una planta de arroz (*Oryza sativa* L.) en los cloroplastos de una planta de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). En los resultados se observó que la planta de tabaco que sobreexpresaba el Cu/Zn-SOD mejoraba su rendimiento fotosintético durante las tensiones fotooxidativas provocadas por estrés salino y sequía en comparación con plantas no transformadas.

## **II. Catalasa.**

La catalasa es una enzima hemo del grupo de las oxidoreductasas con el potencial de dismutar  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ , algo indispensable para la desintoxicación de las ROS durante condiciones de estrés (Gill & Tuteja, 2010). Al igual que las otras enzimas de eliminación de ROS, la catalasa está regulada a nivel transcripcional tras la exposición a altas concentraciones salinas (Nagamiya *et al.* 2007).

La eficiencia enzimática de la catalasa tiene un valor muy alto ya que reside en su límite de difusión y, por tanto, muestra una excelencia catalítica. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  interacciona con los sitios activos del grupo hemo y conduce a una transferencia de protones entre los átomos de  $\text{O}_2$ , liberándose una molécula de agua y  $\text{E-Fe}^{4+} = \text{O}$  (Compuesto I) (Fig. 11.1). Este Compuesto I reacciona con una segunda molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para producir agua y  $\text{O}_2$  (Sharma & Ahmad, 2014; Fig. 11.2).



**Fig. 11:** Reacción bioquímica de la catalasa (Gebika & Kry-Modej, 2019)

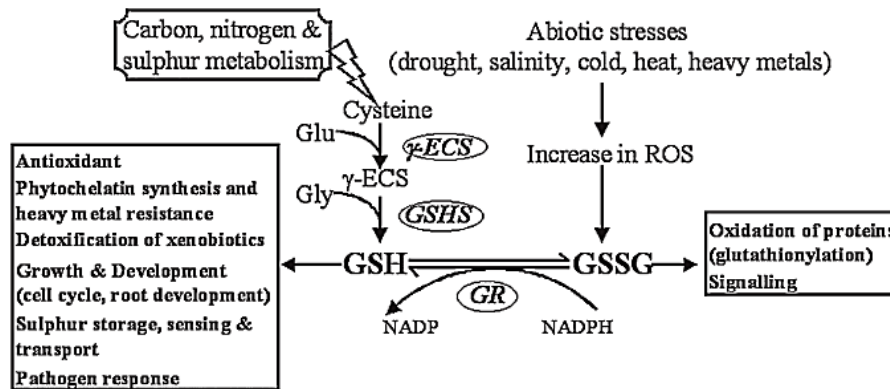
En este caso, también se han realizado estudios con plantas transgénicas que sobreexpresan catalasa con el fin de aumentar la tolerancia al estrés abiótico. Nagamiya *et al.* 2007 estudiaron la mejora de la tolerancia a la salinidad en arroz al sobreexpresar el gen de catalasa de *Escherichia coli* (*katE*) mediante transformación mediada por *Agrobacterium*. En los resultados se observó que las plantas transformadas mostraban una actividad de catalasa 1.5-2.5 veces mayor que las plantas de arroz silvestres. Esto se manifestó como una mayor tolerancia a condiciones salinas.

## **III. Glutación reductasa.**

La glutación reductasa es una flavoenzima que convierte el glutación oxidado (GSSG) en su forma reducida (GSH) con la intervención de la oxidación de NADPH (Gil & Tuteja, 2010). El tripéptido glutación es el principal compuesto tiol libre intracelular en las plantas, donde funciona como agente reductor manteniendo los tioles de las proteínas en su estado reducido y protegiendo las membranas contra la peroxidación causada por las ROS (Romero-Puertas *et al.* 2006).

La glutación reductasa se ha relacionado con situaciones en las que se produce estrés oxidativo, como salinidad, sequía, radiación UV, alta intensidad lumínica, enfriamiento o contaminación con ozono u otros metales pesados o herbicidas (Romero-Puertas *et al.* 2006). Entre sus múltiples funciones dentro de la planta, su principal papel es como agente antioxidante en la protección y defensa celular, pudiendo actuar de diferentes

maneras (Fig.12). Por un lado, forma parte del ciclo ascorbato-glutati3n el cual es esencial para la eliminaci3n de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y donde se emplea el glutati3n como agente reductor. Tambi3n puede actuar directamente eliminando radicales libres al interactuar con super3xido, ox3geno singlete y radicales hidroxilo. Adem3s, es un sustrato para la glutati3n peroxidasa (GPX) y glutati3n-S-transferasa (GST), implicadas en la eliminaci3n de ROS (Rao & Reddy, 2008).



**Fig. 12:** Biosíntesis de glutati3n y sus funciones en las células vegetales. Abreviaturas:  $\gamma$ -ECS ( $\gamma$ -Glutamyl-Cistein sintasa); Glu (ácido glutámico); GR (glutati3n reductasa); GSHS (glutati3n sintasa); Gly (glicina); GSSG (glutati3n oxidado); NADP (nicotinamida adenina dicucle3tico fosfato); GSH ( glutati3n reducido); NADPH (nicotinamida adenina dicucle3tico fosfato reducido) (Rao & Reddy, 2008)

En 2008, Ding *et al.* realizaron un trabajo para investigar los mecanismos de la glutati3n reductasa en la determinaci3n de la tolerancia al estr3s oxidativo. Para ello, transformaron, mediante *Agrobacterium*, plantas de tabaco para disminuir en un 30-70% la actividad de dicha enzima empleando construcciones de ARNi de glutati3n reductasa cloropl3stico. En los resultados del estudio se vio que, bajo estr3s oxidativo, hab3a una mayor disminuci3n en la relaci3n GSH/GSSG pero un aumento mayor de GSH en las plantas transformadas, adem3s de una disminuci3n del ascorbato foliar y el estado redox del ascorbato, lo cual limitaría la desintoxicaci3n de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, acumulándolo y causando mayor daño oxidativo que el observado en las plantas silvestres. Por tanto, la capacidad de regeneraci3n del glutati3n mediante la glutati3n reductasa juega un papel importante en la protecci3n contra el estr3s oxidativo.

## **1.3 Material vegetal para el estudio de estrés abiótico.**

### **1.3.1 Berenjena cultivada (*Solanum melongena*)**

La berenjena comercial, *Solanum melongena* L. (2n= 24), también conocida como calabaza de Guinea o brinjal, es uno de los cultivos de hortaliza más populares a lo largo del mundo y, especialmente, en la India (FAO, 2013). Posee un fruto interesante para el consumo ya que contiene fitoquímicos, principalmente fenólicos y esteroides, que se consideran que tienen efectos beneficiosos para la salud debido a su capacidad antioxidante (Menella *et al.* 2012).

Se cultiva en más de 1.86 millones de hectáreas y su producción anuales es de 52.34 millones de toneladas, siendo China el mayor productor (58% de la producción total) seguido por India (25% de la producción mundial) (FAO, 2017).

*Solanum melongena* pertenece al subgénero *Leptostemonum*, el cual agrupa aquellas especies de *Solanum* caracterizadas por su carácter espinoso (Weese & Bohs, 2007). Es una especie cuyas flores son grandes, púrpuras y hermafroditas, y en la cual la dehiscencia del polen y la maduración del estigma ocurren al mismo tiempo, lo que trae como resultado la autopolinización (Premabati *et al.* 2015). Sin embargo, una parte de la polinización también se realiza a través de insectos, por lo que podríamos definirla como alógama facultativa (Kaloo, 1993). Debido a esta forma de reproducción, la generación de híbridos interespecíficos partiendo de *Solanum melongena* se presenta interesantes para la incorporación de genes de interés provenientes de especies silvestres relacionadas para la mejora y la ampliación de la base genética del cultivo (Plazas *et al.* 2016).

Para poder llevar a cabo esta mejora, debemos conocer la diversidad y las relaciones filogenéticas existentes entre las diferentes especies de berenjena así como su origen. En base a la cuestión sobre el origen y la domesticación de la berenjena existe un consenso general de que las berenjenas se domesticaron en el sudeste asiático a partir de la especie silvestre *Solanum incanum* L. Esta especie se distribuye principalmente por África y Oriente Medio y se desconoce cuál fue exactamente su difusión, aunque se postula que no fue intencionada. En cualquier caso, al igual que ocurre en otras especies, la domesticación resultó en un importante cuello de botella para el acervo genético de la berenjena (Hurtado *et al.* 2012).

### **1.3.2 Especies silvestres relacionadas como recursos fitogenéticos.**

Una práctica común en mejora es la generación de líneas puras con el fin de desarrollar nuevos híbridos comerciales. Sin embargo, estos métodos de mejora pueden restringir la diversidad del acervo genético del cultivo y, a largo plazo, podemos encontrar dificultades para seguir realizando avances genéticos (Muñoz-



Falcon *et al.* 2009). Por lo tanto, la introducción de parientes silvestres relacionados supone una nueva fuente de variación para muchos rasgos de interés en la mejora de la berenjena debido a su crecimiento en una amplia gama de condiciones ambientales, en muchos casos extremas (Plazas *et al.* 2016). En este caso de estudio, el carácter a mejorar es el incremento de la tolerancia a estrés abiótico debido a que los parientes silvestres poseen atributos de resistencia a estreses tanto bióticos como abióticos (Premabati *et al.* 2015) que podrían jugar un papel importante en la mejora del cultivo en su adaptación a condiciones de cambio climático (Plazas *et al.* 2016).

La disponibilidad de datos de caracterización para rasgos de interés agronómico en generaciones parentales, híbridas y segregantes es esencial en los programas de mejora para poder establecer los cruces (Prohens *et al.* 2012). Dependiendo de las relaciones filogenéticas y la capacidad de cruzamiento con berenjena, los parientes silvestres se engloban en grupos genéticos primarios, secundarios o terciarios (Meyer *et al.* 2012). En el caso de *S. insanum* nos encontramos ante un grupo genético primario que proporciona híbridos fértiles con *S. melongena* ya que se encuentran en el mismo clado, por lo que su relación filogenética es muy estrecha (Plazas *et al.* 2016). Otra cuestión importante a la hora de realizar hibridación interespecífica es la dirección del cruce. Respecto a esto, generalmente se emplea *S. melongena* como progenitor femenino, ya que permite la recuperación en la primera generación del citoplasma de *S. melongena* (Plazas *et al.* 2016) y de esta forma se evitan problemas de esterilidad, se obtiene un mayor número de semillas por fruto y éstas no presentan periodos de latencia que puedan dificultar la germinación (Gisbert *et al.* 2011).

En este trabajo, la especie silvestre empleada ha sido *Solanum insanum* L., que es una especie de berenjena perteneciente al grupo de solanáceas espinosas (*Leptostemonum*), originaria de Asia y estrechamente relacionada con la berenjena comercial. Se presenta como una especie útil para la mejora de berenjena ya que presenta una buena adaptación a la sequía y otros estreses ambientales abióticos (Ranil *et al.* 2017). Las diferencias con *S. melongena* las encontramos asociadas a los procesos de domesticación y posterior evolución. Estos incluyen una reducción en el número de espinas y frutos más grandes y carnosos (Knapp *et al.* 2013). Debido a que *S. melongena* y *S. insanum* son interfértiles se pueden observar individuos intermedios (Knapp *et al.* 2013). Por ello, en este trabajo también se han analizados los híbridos generados entre ambas especies y su adaptación a condiciones de estrés abiótico.

## II. Objetivos.

- Evaluar la tolerancia al estrés abiótico en berenjena cultivada (*S. melongena*) y en uno de sus parientes silvestres (*S. insanum*).
- Analizar las respuestas antioxidantes enzimáticas a la salinidad y a la sequía de dichas especies.

### III. Materiales y Métodos.

#### 3.1 Material vegetal.

El material vegetal empleado en este estudio consta de 2 genotipos de especies de *Solanum*: la berenjena cultivada (*S. melongena*); una especie silvestre relacionada (*S. insanum*) compuesta por dos accesiones diferentes (INS1 e INS2); y los híbridos interespecíficos entre *S. melongena* y las dos accesiones de *S. insanum*: MEL1 x INS1 y MEL1 x INS2, empleando como primer nombre el genotipo del parental femenino y el segundo, el del parental masculino. Las semillas empleadas se obtuvieron del banco de germoplasma del Instituto de Conservación y Mejora de Agrobiodiversidad Valenciana (COMAV)(Tabla 1; Fig. 13).

Especie	Accesión	Código de accesión en el banco de germoplasma	País de origen	Acervo genético	Híbridos interespecíficos con MEL1
<i>S. melongena</i>	MEL1	BBS-118/B	Costa de marfil		
<i>S. insanum</i>	INS1	SLKINS-1	Sri Lanka	Primario	MEL1 x INS1
<i>S. insanum</i>	INS2	SLKINS-2	Sri Lanka	Primario	MEL1 x INS2

Tabla 1: Especies del género *Solanum* utilizadas en el estudio

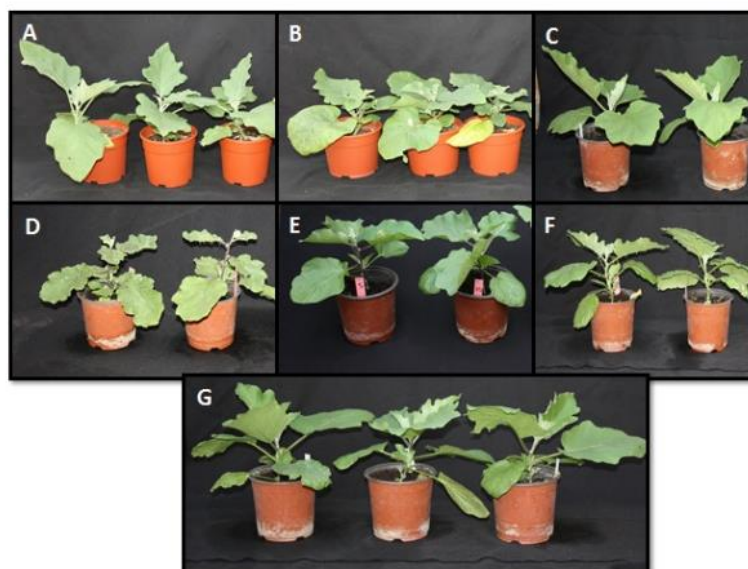


Fig. 13: Imágenes de las plantas que participaron en el ensayo previo a la administración de los diferentes tratamientos. A: MEL1 salinidad; B: INS2 salinidad; C: MEL1 sequía; D: INS1 sequía; E: INS2 sequía; F: MEL1 x INS1 sequía; G: MEL1 x INS2 sequía

Se empleó MEL1 ya que se ha visto que produce muchas flores y resulta muy exitoso a la hora de obtener híbridos interespecíficos, pudiendo emplearse también en la mejora por introgresión o como especie puente (Plazas *et al.* 2016). Por otro lado, *S.insanum* es una especie filogenéticamente muy cercana a *S. melongena*, silvestres pero ocasionalmente cultivada en el sudeste asiático, por lo que los híbridos resultantes entre ambas pueden tener interés comercial (Plazas *et.al* 2016).

Para la germinación se empleó el protocolo optimizado por Ranil *et al.* (2015). En primer lugar, se colocaron las semillas a remojo: las primeras 24h en agua y, las siguientes 24h, en una solución de AG<sub>3</sub> a 500 ppm. Tras esto, se trasladaron las semillas a placas Petri y se empleó como humectante una solución de KNO<sub>3</sub> a 1000 ppm. Después, se realizó un tratamiento de choque térmico a 37°C durante 24h. Por último, se trasladaron las semillas a la cámara de cultivo donde se programaron unas condiciones controladas de 16h luz/8h oscuridad a una temperatura de 25°C hasta completar el proceso de germinación.

Una vez germinadas, se sembraron en semilleros y se mantuvieron en las mismas condiciones de cultivo (16h luz/8h oscuridad, 25°C) durante dos semanas. Tras este tiempo, se seleccionaron plántulas cuyos tamaños fueran homogéneos y se trasplantaron a macetas pequeñas y, posteriormente, a macetas de 1.3 litros con 500 g de sustrato comercial Huminsubstrate N3 (Klasmann-Deilmann, Alemania).

Antes de comenzar los ensayos, las plantas se llevaron al invernadero para someterlas a un proceso de aclimatación durante 20 días. Los ensayos se iniciaron cuando las plantas habían desarrollado 6-8 hojas expandidas.

### **3.2 Diseño experimental.**

Los experimentos se llevaron a cabo en los invernaderos libres de polinizadores pertenecientes al COMAV, en la Universidad Politécnica de Valencia. Tanto para el experimento de salinidad como para el de sequía se emplearon cinco réplicas biológicas por accesión y las bandejas se rotaban periódicamente para que todas las plantas recibieran la misma cantidad de luz solar.

En el caso del experimento de salinidad, se emplearon las accesiones MEL1 e INS2. Se emplearon riegos cada cuatro días con 1.25L de solución acuosa salina, distinguiendo cinco tratamientos en función de su concentración de NaCl: 0mM (Control); 50mM; 100mM; 200mM; y 300mM. Este experimento se llevó a cabo durante 25 días (Brenes-Martínez, 2018).

En cuanto al experimento de sequía, las accesiones empleadas fueron MEL1, INS1, INS2 y los dos híbridos (MEL1xINS1 y MEL1xINS2). En este caso se emplearon dos tratamientos: por un lado las plantas control estaban sometidas a riegos de 250 ml de

agua cada cuatro días; mientras que las plantas pertenecientes al tratamiento de sequía no recibían aporte alguno. El experimento se llevó a cabo durante 18 días (Ribera, 2019).

### **3.3 Evaluación de los parámetros de crecimiento.**

Durante los experimentos, se llevó a cabo un seguimiento del crecimiento y desarrollo de las plantas para ver su evolución y respuesta ante condiciones de estrés. Los parámetros morfológicos medidos fueron: altura del tallo ( $Al_{ta}$ ); número de hojas ( $N_{ho}$ ) y diámetro del tallo ( $\emptyset$ ).

Tras los experimentos, se recogieron las plantas y se determinó el peso fresco de la parte aérea (hojas y tallo) y de la raíz con una balanza de precisión. También se midió la longitud máxima de la raíz ( $L_r$ ), empleando una regla; y el área de la hoja más grande de cada planta (AF) en  $cm^2$  utilizando el programa ImageJ desarrollado por el National Institutes of Health.

Después, se determinó el contenido en humedad (H) de las diferentes partes de la planta (parte aérea y raíz) sometiéndolas a un proceso de secado a  $60^\circ C$  durante 4-5 días. Para ello, se midió antes del proceso de secado y tras el mismo, y se empleó la siguiente ecuación para el cálculo del porcentaje de humedad:

$$\%H = \frac{PF-PS}{PF} \times 100$$

Siendo PF el peso en fresco y PS el peso seco.

Gracias a los valores de peso seco, se pudo calcular la eficiencia en el uso del agua como el incremento de la biomasa seca generado durante el tratamiento por los litros de agua aportados.

Los ensayos enzimáticos y la determinación de peróxido de hidrógeno se realizaron utilizando el material fresco procedente de segmentos foliares que en una primera instancia se ultracongelaron empleando  $N_2$  líquido y, más tarde, se conservaron en un congelador a  $-75^\circ C$ .

Tanto el material procedente de la raíz como el material seco se emplearon para otros estudios de evaluación de tolerancia a estrés abiótico dado que, en este estudio en concreto, los parámetros analizados han sido únicamente a nivel de enzimas antioxidantes.

### **3.4 Determinación de la actividad enzimática.**

Las enzimas que se han determinado en este estudio han sido: superóxido dismutasa (SOD); catalasa (CAT); y glutatión reductasa (GR).

Para determinar su actividad específica, en primer lugar, se realizó una extracción de proteínas a partir de 0.1 g de material foliar ultracongelado y almacenado a -75°C. Se procedió a triturar cada muestra y, tras ello, se realizó la extracción empleando 20mM de HEPES; 50mM de KCl; 1mM de EDTA; Triton X – 100 al 0.1% (v/v); Polivinilpirrolidona al 0.2% (p/v); Polivinilpolipirrolidona al 0.2% (p/v); y glicerol al 5% (v/v). se añadió un volumen del 10% de “tampón de alta sal” compuesto por 225mM de HEPES; 1.5M de KCl; y 22.5 mM de MgCl<sub>2</sub> a pH 7.5.

Se homogenizó la muestra con los buffer empleando un vórtex y, tras ello, se centrifugó a 13500 rpm a 4°C durante 15 minutos. Los sobrenadantes se dividieron en 4 alícuotas: una diluida que constaba de 25 µl de sobrenadante + 175 µl de EEB; y otras tres con 100 µl de sobrenadante para cada uno de los tres ensayos enzimáticos. Se conservaron en un congelador a -75°C.

Para la cuantificación del contenido en proteína de cada uno de los extractos, se empleó el método Bradford (1976), utilizando seroalbumina bovina (BSA) para realizar la curva patrón.

Durante todo el proceso y posteriores protocolos se trabajó en hielo para reducir al mínimo la posible pérdida de estructura proteica y evitar así errores debido a la sensibilidad de las estructuras enzimáticas. A su vez, se realizaron tres extracciones de proteínas y se repitieron los ensayos enzimáticos tres veces para verificar los resultados de un total de 90 muestras, lo que supone un total 270 muestras analizadas.

#### **3.4.1 Superóxido dismutasa (SOD).**

La actividad total de la superóxido dismutasa se determinó según el método propuesto por Beyer & Fridovich (1987) mediante monitoreo de la fotorreducción espectrofotométrica de la inhibición del nitroblue de tetrazolio (NBT).

Para ello, se realizó una mezcla de reacción compuesta por: KPO<sub>4</sub> 50mM (pH 7.8); 9.9 ml de L-metionina 100mM; 0.025% (v/v) de Tritón X-100. Se empleó 980.4 µl de la mezcla de reacción por cada 10 µl de muestras de un total de 90 muestras realizándose tres repeticiones de cada una de ellas. Después, se añadió 4.8 µl de riboflavina 0.5mM y 5.8 µl de NBT 10mM. Las muestras se irradiaron con tubos fluorescentes de 15W durante 10 minutos a 25°C. Tras ello, se midió la absorbancia de las muestras a 560 nanómetros, empleando como blanco la mezcla de reacción.

La unidad de SOD se definió como la cantidad de enzima que causa el 50% de la inhibición de fotorreducción del NBT bajo condiciones de ensayo. Las unidades de enzima por miligramo en proteína de cada extracto se obtuvieron a través del coeficiente de extinción molar del NADPH ( $6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) y de la cantidad de proteína obtenida por microlitro de extracto obtenido previamente mediante el método Bradford (1976).

### **3.4.2 Catalasa (CAT).**

La actividad de la catalasa se determinó empleando el método descrito por Aebi (1984), el cual se basa en el consumo de peróxido de hidrógeno. Para ello, se empleó 20  $\mu\text{l}$  de extracto de cada una de las 90 muestras junto con 750  $\mu\text{l}$  de agua miliQ; 80  $\mu\text{l}$  EEB; 50  $\mu\text{l}$  de Tris 1M; y 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10mM. Se midió la absorbancia a tiempo 0 y a tiempo 1 minuto a una longitud de onda de 240 nanómetros en cubetas de cuarzo. Se realizó el ensayo tres veces para verificar los resultados.

Una unidad de CAT se definió como la cantidad de enzima que descompondrá 1 mol de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto a  $25^\circ\text{C}$ . Las unidades de CAT por miligramo de proteína de cada extracto se obtuvieron empleando el coeficiente de extinción molar del peróxido de hidrógeno ( $39.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) y la cantidad de proteína contenida en el extracto.

### **3.4.3 Glutación reductasa (GR).**

La actividad de la glutatión reductasa se determinó de acuerdo con el método de Connell & Mullet (1986) basado en la capacidad del NADPH de reducir glutatión (GSSG) en presencia de la glutatión reductasa, produciendo como consecuencia glutatión reducido (GSH) y NADP+.

Para ello, se preparó una mezcla de reacción que contenía: 5ml de Hepes 100mM; 100  $\mu\text{l}$  de EDTA 1mM; 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  3mM; 44.15 ml de agua miliQ; y 250  $\mu\text{l}$  de GSSG 0.5mM. Se utilizó 110  $\mu\text{l}$  de esta mezcla de reacción, junto 480  $\mu\text{l}$  de EEB, 380  $\mu\text{l}$  de agua miliQ; y 10  $\mu\text{l}$  de NADPH para cada 20  $\mu\text{l}$  de muestra de un total de 90 muestras. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 340 nanómetros, necesaria para la detección de la actividad del NADPH, en cubetas de cuarzo, a tiempo 0 y tiempo 25 minutos. El ensayo se repitió tres veces para verificar los resultados.

Definimos una unidad de GR como la cantidad de enzima que oxidará 1 mol de NADPH por minuto a  $25^\circ\text{C}$ . Por ello, para calcular las unidades de GR por miligramo de proteína, se empleó el coeficiente de extinción molar del NADPH ( $6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) junto con la cantidad de proteína contenida por extracto.

### **3.5 Determinación del contenido en peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Para la determinación del contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se empleó el método propuesto por Loreto & Velikova, 2001; Baptista *et al.* 2001.

Para ello, se tomó una muestra de 0.1g de material vegetal ultracongelado de cada una de las 90 muestras y fueron conservadas a -75°C. Se homogenizaron las muestras empleando 2 ml de TCA. Se centrifugaron las muestras a 13500 rpm, a 4°C durante 17 minutos.

Se repartió el sobrenadante en alícuotas de 0.5ml. Después, a cada alícuota de 0.5ml se le añadió 1ml de KI 1M y 0.5ml de Tris 1M (pH 7.0) y se dejó reposar a temperatura ambiente y oscuridad durante 1 hora, tras la cual se procedió a medir la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 390 nanómetros en cubetas de cuarzo. Como blanco se empleó la mezcla original sustituyendo el volumen de muestra por TCA. Se repitió el protocolo tres veces para verificar los resultados.

Para poder cuantificar la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se utilizó una curva patrón empleando la mezcla original y sustituyendo el volumen de muestra por diferentes cantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1mM.

### **3.6 Análisis estadístico.**

Los datos obtenidos se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) empleando el software Statgraphics Centurion XVII (*Statpoint Technologies, Inc;* Warrenton, EE.UU).

Se realizaron ANOVAS simples para determinar diferencias entre tratamientos para cada una de las enzimas analizadas. A su vez, se realizaron ANOVAS multifactoriales para estudiar las diferencias entre tratamientos y entre genotipos así como sus interacciones. La significación estadística se evaluó mediante el valor-P de la prueba F, determinando la existencia de diferencias significativas a valores P < 0.05 (intervalo de confianza mínimo del 95%).

Aquellas diferencias significativas se analizaron mediante Prueba de Rangos Múltiples, empleando para la discriminación de medias estadísticamente diferentes el procedimiento de Student-Newman-Keuls.

Se obtuvieron las medias aritméticas y las desviaciones estándar de cada tratamiento en cada genotipo para la construcción de los diagramas de barras.



## IV. Resultados.

### 4.1 Evaluación de parámetros del crecimiento.

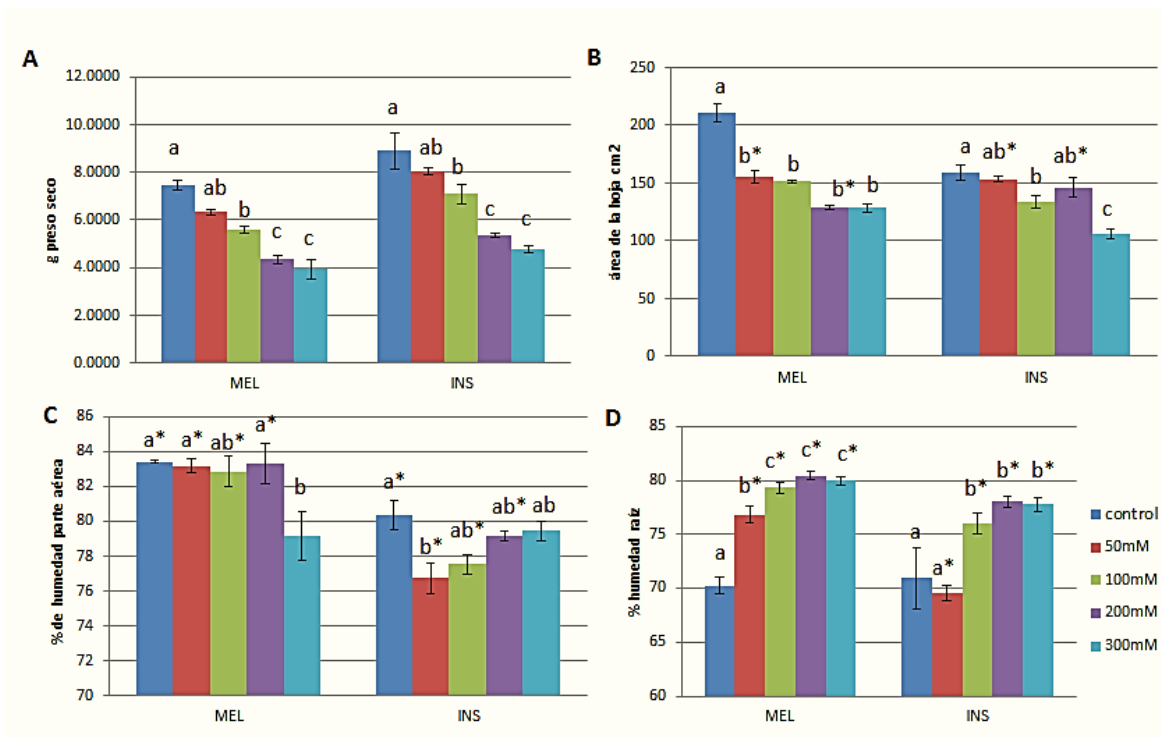
#### 4.1.1 Tratamiento de salinidad.

Se puede observar que los tratamientos de salinidad indujeron cambios significativos en los diferentes parámetros del crecimiento medidos: peso seco total ( $PS_T$ ), área foliar (AF), humedad de la parte aérea ( $H_{pa}$ ) y humedad de la raíz ( $H_r$ ) (Tabla 2; Fig. 14). Podemos apreciar la progresiva disminución en los valores de peso seco total ( $PS_T$ ) y área foliar (AF), al aumentar el contenido en NaCl del tratamiento. Al analizar la humedad, vemos como al disminuir la humedad en la parte aérea, aumenta la humedad en la raíz a medida que empleamos tratamientos más salinos (Tabla 2; Fig. 14). El ANOVA multifactorial también reveló la existencia de diferencias significativas entre MEL e INS para los diferentes tratamientos en los parámetros peso seco total ( $PS_T$ ), área foliar (AL), humedad de la parte aérea ( $H_{pa}$ ) y humedad de la raíz ( $H_r$ ), obteniéndose una mayor disminución de los parámetros peso seco total ( $PS_T$ ) en *S. melongena*, mientras que para humedad de la parte aérea ( $H_{pa}$ ) y humedad de la raíz ( $H_r$ ) la mayor reducción tuvo lugar en *S. insanum*.

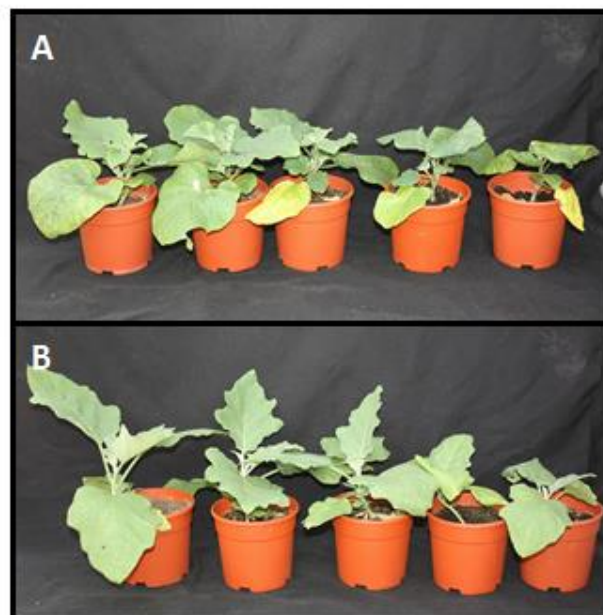
En cuanto a las interacciones, encontramos interacción para área foliar (AF), y humedad de la parte aérea ( $H_{pa}$ ) así como humedad de la raíz ( $H_r$ ). Así pues, MEL e INS se comportan de manera diferente en función del tratamiento empleado en cada caso para dichos parámetros de crecimiento (Tabla 2; Fig. 14 y 15).

Efectos	gl <sup>2</sup>	PS <sub>T</sub>	AF	H <sub>pa</sub>	H <sub>r</sub>
<b>Principales</b>					
A: Genotipo	1	18.27***	2504.49***	150***	90.59***
B: Tratamiento	4	20.83***	4808.82***	8.68*	117.43***
<b>Interacciones</b>					
AB	4	0.29 <sup>NS</sup>	1355.74***	14.7***	16.78***
<b>Residuos</b>	34	0.33	124.74	2.66	3.42

**Tabla 2:** Análisis de la varianza para parámetros de crecimiento y humedad de la planta para plantas control y sus diferentes tratamientos salinos (50mM, 100mM, 200mM, 300mM) para las accesiones MEL e INS según el test Student-Newman-Keuls. Las columnas muestran los grados de libertad y los resultados de los análisis para peso seco total ( $PS_T$ ), área foliar (AF), humedad de la parte aérea ( $H_{pa}$ ) y humedad de la raíz ( $H_r$ ). En las filas tenemos el resultado de los cuadrados medios. Los asteriscos hacen referencias al P-valor obtenido: \*\*\*= valor-P < 0.001; \*\*= valor-P < 0.01; \*= valor-P < 0.05; <sup>NS</sup> = No significativo (valor-P > 0.05)



**Fig. 14:** Diagrama de columnas donde se recogen las variaciones en los diferentes parámetros de crecimiento A=peso seco total ( $PS_T$ ), B=área foliar (AF), C=humedad de la parte aérea ( $H_{pa}$ ) y D=humedad de la raíz ( $H_r$ ) para MEL e INS en el control y los diferentes tratamientos de salinidad empleados (50mM, 100mM, 200mM, 300mM) a partir de sus valores medios. Las barras representan la desviación estándar de cada parámetro. Las barras con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas (P-valor < 0.05) entre tratamientos dentro de un mismo genotipo mientras que los asteriscos representan diferencias significativas entre las dos especies dentro de cada tratamiento.



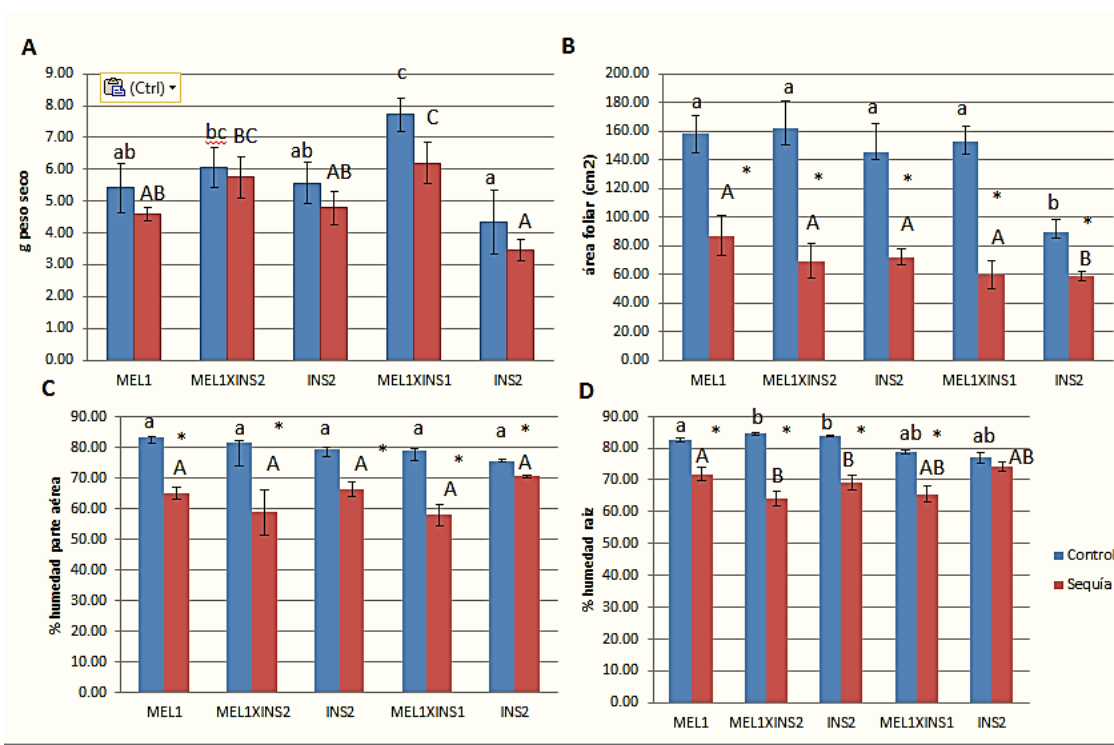
**Fig. 15:** Imagen de las plantas tras el tratamiento. Cada maceta corresponde a un tratamiento en el siguiente orden: Control, 50mM, 100mM, 200mM, 300mM. A: MEL1; B: INS2

### 4.1.2 Tratamiento de sequía.

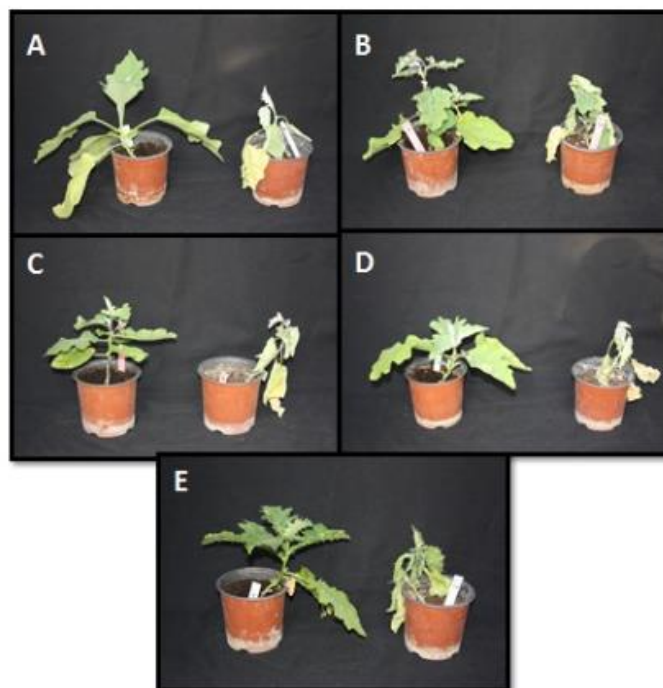
En el ensayo de sequía se pudieron observar cambios significativos en los parámetros morfológicos evaluados (Tabla 3; Fig. 16 y 17). El tratamiento de sequía fue especialmente influyente en los parámetros área foliar (AF), humedad de la parte aérea ( $H_{pa}$ ) y humedad de la raíz ( $H_r$ ). Al realizar el ANOVA multifactorial, también se observaron diferencias significativas entre las diferentes accesiones para todos los parámetros evaluados a excepción de la humedad de la parte aérea. Se observa interacción significativa únicamente para los parámetros relacionados con la humedad, teniendo una respuesta específica para cada tratamiento en cada accesión.

Efectos	gl <sup>2</sup>	PS <sub>T</sub>	AF	H <sub>pa</sub>	H <sub>r</sub>
<b>Principales</b>					
A: Genotipo	5	11.7***	3020.66***	54.65 <sup>NS</sup>	41.33**
B: Tratamiento	1	8.74*	62309.2***	2998.56***	1813.01***
<b>Interacciones</b>					
AB	5	0.48 <sup>NS</sup>	1414.48 <sup>NS</sup>	111.38*	91.6***
<b>Residuos</b>	46	1.8	805.7	40.25	13.08

**Tabla 3:** Análisis de la varianza para parámetros de crecimiento y humedad de la planta para plantas control y sequía en MEL, INS1, INS2, MEL1xINS1, MEL1xINS2 empleando el test Student-Newman-Keuls. Las columnas muestran los grados de libertad y los resultados de los análisis para peso seco total (PS<sub>T</sub>), área foliar (AF), humedad de la parte aérea (H<sub>pa</sub>) y humedad de la raíz (H<sub>r</sub>). En las filas tenemos el resultado de los cuadrados medios. Los asteriscos hacen referencias al P-valor obtenido: \*\*\*= valor-P < 0.001; \*\*= valor-P < 0.01; \*= valor-P < 0.0; <sup>NS</sup> = No significativo (valor-P > 0.05)



**Fig. 16:** Diagrama de columnas donde se recogen las variaciones en los diferentes parámetros de crecimiento A=peso seco total ( $PS_T$ ), B=área foliar (AF), C=humedad de la parte aérea ( $H_{pa}$ ) y D=humedad de la raíz ( $H_r$ ) para MEL, INS1, INS2, MEL1xINS1, MEL1xINS2 en el control y sequía a partir de sus valores medios. Las barras con distinta letra minúscula indican diferencias significativas ( $P$ -valor  $< 0.05$ ) en el tratamiento “control” mientras que las letras mayúsculas representan diferencias en el tratamiento “sequía” entre los diferentes genotipos. Las barras de error representan la desviación estándar de cada parámetro. Los asteriscos representan diferencias significativas entre “control” y “sequía” entre los diferentes genotipos.



**Fig. 17:** Imagen plantas tras el tratamiento de sequía. A: MEL1; B:INS1; C: INS2; D: MEL1 x INS1; E: MEL1 x INS2

## 4.2 Determinación de la actividad enzimática.

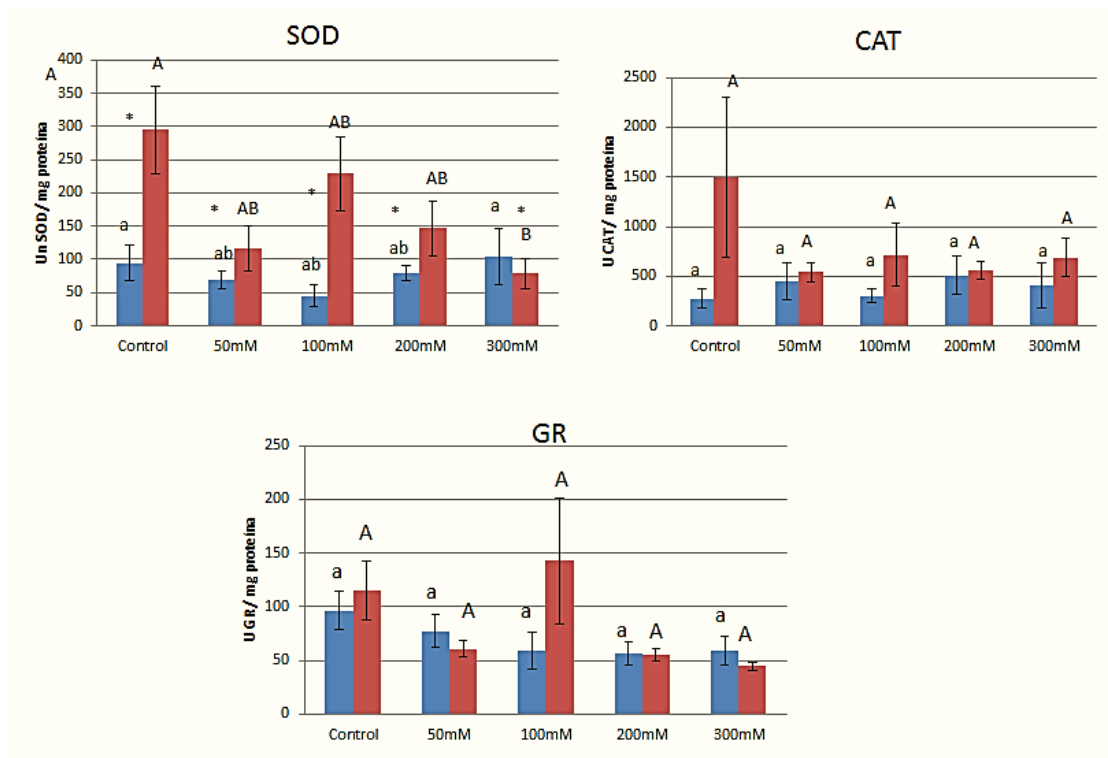
### 4.2.1 Tratamiento de salinidad.

Al analizar el efecto de los antioxidantes enzimáticos en los tratamientos con NaCl, sólo encontramos diferencias significativas en la actividad específica de enzima superóxido dismutasa (Tabla 4). Esta diferencia es apreciable en los niveles de actividad enzimática de cada una de las dos especies de berenjena analizadas. A su vez, se encontraron diferencias significativas entre el Control y el tratamiento a 300mM de NaCl en *S. insanum* (Fig. 18). También se observa el efecto de la interacción, ya que cada tratamiento tiene un efecto determinado dentro de cada especie.

No se encontraron diferencias significativas para las otras dos enzimas analizadas (catalasa y glutatión reductasa).

Efectos	gl <sup>2</sup>	SOD	CAT	GR
<b>Principales</b>				
<b>A: Genotipo</b>	1	107982***	1.913E6 <sup>NS</sup>	2321.82 <sup>NS</sup>
<b>B: Tratamiento</b>	4	17890.1*	265,292 <sup>NS</sup>	5978.96 <sup>NS</sup>
<b>Interacciones</b>				
<b>AB</b>	4	20800.3*	558,787 <sup>NS</sup>	4230.86 <sup>NS</sup>
Residuos	38	6782.66	475,459	2838.31

**Tabla 4** : Análisis de la varianza para las enzimas analizadas (superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión reductasa (GR)) para plantas control y sus diferentes tratamientos salinos (50mM, 100mM, 200mM, 300mM) para las accesiones MEL e INS empleando el test Student-Newman-Keuls. Las columnas muestran los grados de libertad y los resultados para cada una de las enzimas. En las filas tenemos el resultado de los cuadrados medios. \*\*\*= valor-P < 0.001; \*\*= valor-P < 0.01; \*= valor-P < 0.05; <sup>NS</sup> = No significativo (valor-P > 0.05)



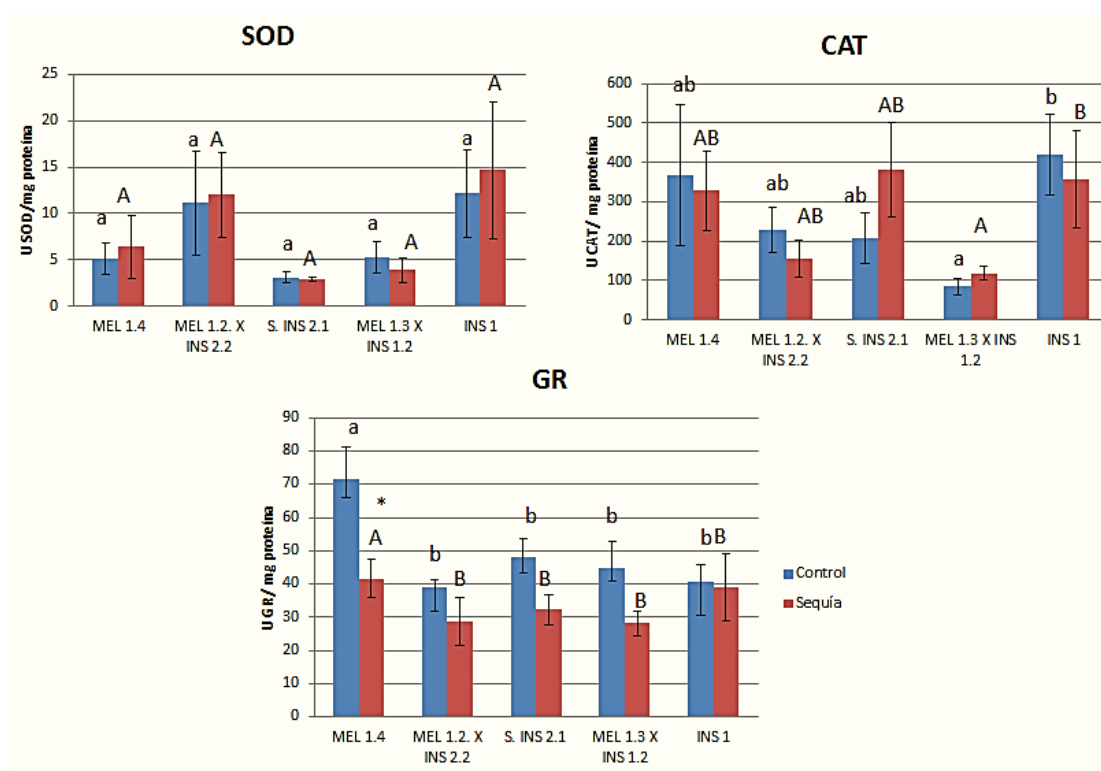
**Fig. 18:** Diagrama de columnas donde se recogen Los resultados de la cuantificación enzimática para las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión reductasa (GR) para MEL e INS en el ensayo de salinidad a partir de sus valores medios. Las barras con distinta letra minúscula indican diferencias significativas (P-valor < 0.05) dentro del genotipo MEL (barras azules), mientras que las letras mayúsculas representan diferencias dentro del genotipo INS (barras rojas). Las barras de error representan la desviación estándar de cada parámetro. Los asteriscos representan diferencias significativas entre ambos genotipos para un mismo tratamiento.

#### 4.2.2 Tratamiento de sequía.

En cuanto al tratamiento de sequía, se observaron diferencias significativas muy leves entre las diferentes accesiones y sus híbridos en la actividad específica de la superóxido dismutasa, pero no se apreciaron diferencias entre el control y el tratamiento con sequía dentro de cada una de ellas. Ocurre algo similar en el caso de catalasa, aunque en este caso se aprecian claras diferencias entre la accesión INS1 y el híbrido MEL1xINS1. En el caso de la actividad específica de la glutatión reductasa, encontramos diferencias significativas tanto a nivel de genotipo como de tratamiento. Se aprecia que MEL1 se diferencia significativamente del resto de accesiones y la actividad de la glutatión reductasa entre el control y el tratamiento de sequía para esta accesión también muestra diferencias significativas. (Tabla. 5; Fig. 19).

Efectos	gl <sup>2</sup>	SOD	CAT	GR
<b>Principales</b>				
<b>A: Genotipo</b>	4	173.049*	11530*	790.394**
<b>B: Tratamiento</b>	1	4.06372 <sup>NS</sup>	468.478 <sup>NS</sup>	2595.13***
<b>Interacciones</b>				
<b>AB</b>	4	4.52551 <sup>NS</sup>	25237.5 <sup>NS</sup>	246.579 <sup>NS</sup>
Residuos	38	64.8533	39471.2	208.299

**Tabla 5 :** Análisis de la varianza para las enzimas analizadas (superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión reductasa (GR)) para plantas control y el tratamiento de sequía para las accesiones MEL1, INS1, INS2 y sus híbridos (MEL1xINS1 y MEL1xINS2). Las columnas muestran los grados de libertad y los resultados para cada una de las enzimas. En las filas tenemos el resultado de los cuadrados medios. \*\*\*= valor-P < 0.001; \*\*= valor-P < 0.01; \*= valor-P < 0.0; <sup>NS</sup> = No significativo (valor-P > 0.05) según el test de Student-Newman-Keuls.



**Fig. 19:** Diagrama de columnas donde se recogen los resultados del análisis de enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión reductasa (GR) para MEL, INS1, INS2, MEL1xINS1, MEL1xINS2 en el control y sequía a partir de sus valores medios. Las barras con distinta letra minúscula indican diferencias significativas (P-valor < 0.05) en el tratamiento “control” mientras que las letras mayúsculas representan diferencias en el tratamiento “sequía” entre los diferentes genotipos. Las barras de error representan la desviación estándar de cada parámetro. Los asteriscos representan diferencias significativas entre “control” y “sequía” entre los diferentes genotipos.

### 4.3 Determinación del contenido en peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

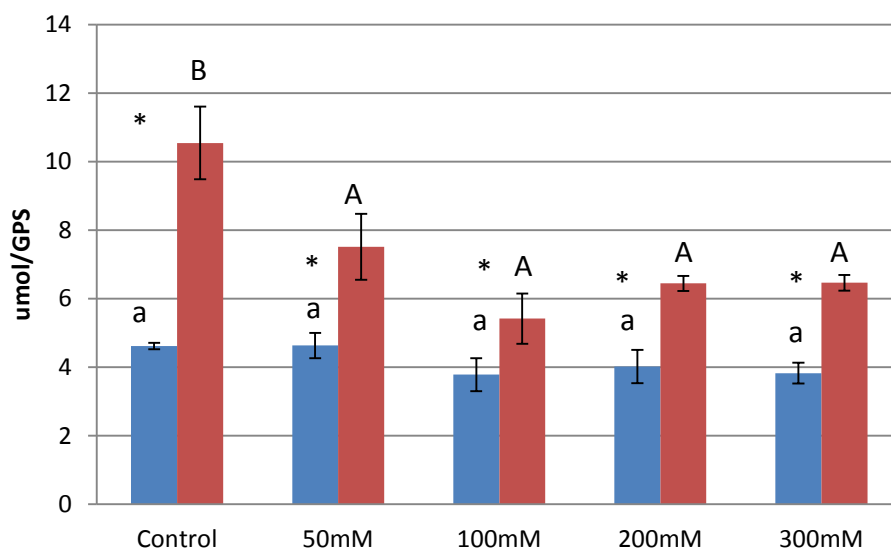
#### 4.3.1 Tratamiento de salinidad.

En la cuantificación del contenido de peróxido de hidrógeno durante el tratamiento salino se observaron diferencias altamente significativas tanto a nivel de genotipo como entre los tratamientos, teniendo un gran peso las diferencias a nivel de genotipo ya que se aprecia una diferencia significativa desde las plantas control, demostrando que el contenido basal de peróxido de hidrógeno ya diferiría entre los genotipos independientemente del tratamiento aplicado. En cuanto a las diferencias entre tratamiento, solo se observaron diferencias significativas entre el control y el resto de los tratamientos, no apreciándose diferencias a diferentes concentraciones salinas. (Tabla 6; Fig. 20).

Efectos	gl <sup>2</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Principales</b>		
<b>A: Genotipo</b>	1	117.311***
<b>B: Tratamiento</b>	4	13.4047***
<b>Interacciones</b>		
<b>AB</b>	4	6.76265**
<b>Residuos</b>	39	1.71631

**Tabla 6** : Análisis de la varianza para la cuantificación del peróxido de hidrógeno para plantas control y sus diferentes tratamientos salinos (50mM, 100mM, 200mM, 300mM) para las accesiones MEL e INS empleando el test Student-Newman-Keuls. Las columnas muestran los grados de libertad y los resultados para cada una de las enzimas. En las filas tenemos el resultado de los cuadrados medios. \*\*\*= valor-P < 0.001; \*\*= valor-P < 0.01; \*= valor-P < 0.05; <sup>NS</sup> = No significativo (valor-P > 0.05)





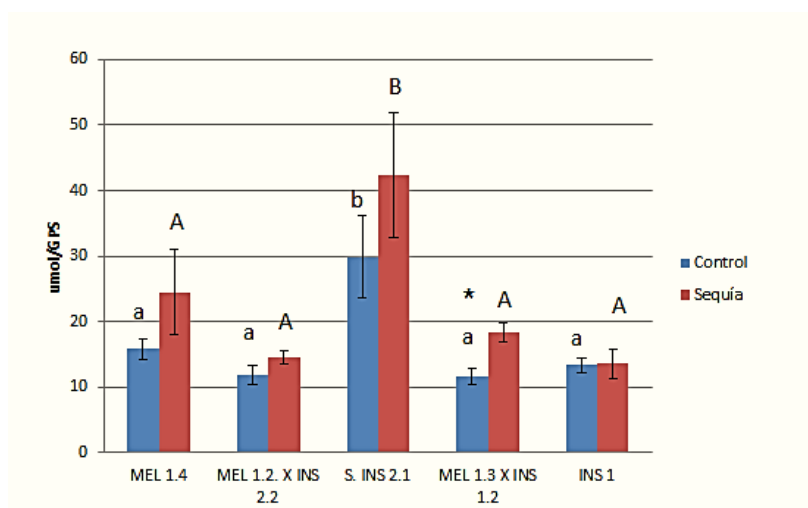
**Fig. 20:** Diagrama de columnas donde se recogen Los resultados de la cuantificación de peróxido de hidrógeno para MEL e INS en el ensayo de salinidad a partir de sus valores medios. Las barras con distinta letra minúscula indican diferencias significativas (P-valor < 0.05) dentro del genotipo MEL (barras azules), mientras que las letras mayúsculas representan diferencias dentro del genotipo INS (barras rojas). Las barras de error representan la desviación estándar de cada parámetro. Los asteriscos representan diferencias significativas entre ambos genotipos para un mismo tratamiento.

### 4.3.2 Tratamiento de sequía.

Respecto al tratamiento de sequía, al igual que en el caso anterior, se observan diferencias significativas tanto a nivel de genotipo como a nivel de tratamiento. Encontramos que el genotipo INS2 difiere en su contenido en peróxido de hidrógeno significativamente en comparación con el resto de genotipos. En cuanto al tratamiento, solo se observaron diferencias estadísticamente significativas en el caso del híbrido MEL1 x INS1 (Tabla 7; Fig. 19).

Efectos	gl <sup>2</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Principales</b>		
<b>A: Genotipo</b>	4	1178.21***
<b>B: Tratamiento</b>	1	827.618***
<b>Interacciones</b>		
<b>AB</b>	4	146.905
<b>Residuos</b>	36	57.916

**Tabla 7:** Análisis de la varianza para la cuantificación del contenido en peróxido de hidrógeno para plantas control y sequía en MEL, INS1, INS2, MEL1xINS1, MEL1xINS2 empleando el test Student-Newman-Keuls. Las columnas muestran los grados de libertad y los resultados de los análisis para peso seco total (PS<sub>T</sub>), área foliar (AF), humedad de la parte aérea (H<sub>pa</sub>) y humedad de la raíz (H<sub>r</sub>). En las filas tenemos el resultado de los cuadrados medios. Los asteriscos hacen referencias al P-valor obtenido: \*\*\*= valor-P < 0.001; \*\*= valor-P < 0.01; \*= valor-P < 0.0; <sup>NS</sup> = No significativo (valor-P > 0.05)



**Fig. 21:** Diagrama de columnas donde se recogen los resultados de la cuantificación de peróxido de hidrógeno para MEL, INS1, INS2, MEL1xINS1, MEL1xINS2 en el control y sequía a partir de sus valores medios. Las barras con distinta letra minúscula indican diferencias significativas (P-valor < 0.05) en el tratamiento “control” mientras que las letras mayúsculas representan diferencias en el tratamiento “sequía” entre los diferentes genotipos. Las barras de error representan la desviación estándar de cada parámetro. Los asteriscos representan diferencias significativas entre “control” y “sequía” entre los diferentes genotipos.

## V. Discusión.

### 5.1 Relevancia del proyecto.

En la actualidad, los cambios en el clima como consecuencia del Cambio Climático generan un estrés abiótico en los cultivos que supone uno de los factores más devastadores en la agricultura, causando grandes pérdidas anuales a nivel mundial (Bray *et al.* 2000). Se pueden lograr avances significativos en la producción de alimentos a nivel global mejorando las prácticas agrícolas y creando entornos de políticas más favorables. Sin embargo, estas medidas serían soluciones a corto plazo. Para aumentar los rendimientos agrícolas será crucial adaptar la agricultura a las condiciones ambientales cada vez más desafiantes mediante la mejora de nuevas variedades empleando la diversidad genética que podemos encontrar en las variedades locales o en las especies silvestres relacionadas (Dempewolf *et al.* 2014). La berenjena (*S. melongena* L.) es el segundo cultivo de *Solanáceas* más importante a nivel mundial tras el tomate (*S. lycopersicum* L.) por lo que el mantenimiento de su producción tiene un gran interés. Además, se ha visto que dentro de la gran diversidad del taxón, muchas especies son capaces de vivir en zonas desérticas o bajo condiciones extremas (Knapp *et al.* 2013).

Por tanto, en este trabajo se ha evaluado la resistencia al estrés abiótico, generado tanto por sequía como por salinidad, en accesiones de berenjena comercial, silvestre y sus híbridos a través del estudio de los mecanismos de respuesta bioquímica relacionados con la tolerancia. Los resultados obtenidos pueden ser útiles en un futuro en programas de mejora de berenjena.

### 5.2 Evolución del crecimiento en condiciones de estrés abiótico.

Las plantas glicófitas suelen desarrollarse adecuadamente en suelos salinos por debajo de cierta concentración determinada por el límite específico de cada especie. Sin embargo, a concentraciones superiores, son capaces de activar mecanismos de defensa y tolerancia que conlleva una limitación del crecimiento (Al Hassan *et al.* 2016). Lo mismo ocurre con las plantas tolerantes a la sequía, ya que el aporte energético necesario para tolerar dicho estrés a través de diversos mecanismo, conlleva una reducción del crecimiento (Bian *et al.* 2019).

La berenjena es una especie moderadamente sensible al estrés abiótico producido por salinidad o sequía, demostrando una reducción en los parámetros de crecimiento, como la biomasa, ocasionados por el aumento de estrés (Akinci *et al.* 2004).

En este estudio, durante el tratamiento de salinidad, se observó que *S. insanum* estuvo menos afectada por la salinidad que *S. melongena*, observándose diferencias significativas a nivel de genotipo entre los parámetros del crecimiento medidos (Tabla 2). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en muchos dichos parámetros, o estas diferencias solo se apreciaban a partir de los tratamientos con mayor concentración salina (Fig. 14). El grado de tolerancia de *S. melongena* fue mayor que el previsto dado que es una especie domesticada y adaptada a condiciones propias de terrenos agrícolas. Por tanto, y debido a que este experimento no tuvo la efectividad buscada, deberán realizarse pruebas con otras para determinar si dicha tolerancia se debe a la especie o si es una característica propia de la variedad.

En el caso del tratamiento de sequía, se observaron diferencias altamente significativas en el contenido de humedad entre las plantas control y las plantas sometidas a sequía (Tabla 3). Además, se observa una mayor reducción de los parámetros del crecimiento en *S. melongena* respecto a las dos accesiones de *S. insanum* al ser sometidas a estrés hídrico, por lo que esta especie silvestre relacionada mostraría una mayor tolerancia. En el caso de los híbridos, se observó que MEL1xINS1 mostraba resultados heteróticos para algunos de los parámetros de crecimiento medidos (peso y altura) mientras que MEL1xINS2 no mostró mejores resultados que sus parentales.

Por tanto, y a diferencia del ensayo en salinidad, el ensayo de sequía fue efectivo al cabo de dieciocho días para la observación de diferencias significativas en el crecimiento de berenjenas sometidas a estrés hídrico.

### **5.3 Respuesta al tratamiento de salinidad.**

En el caso del ensayo de salinidad, empleando MEL (*S. melongena*) e INS (*S. insanum*) la actividad de las enzimas antioxidantes fue prácticamente inexistente. Como se ha mencionado anteriormente, el estrés salino genera estrés oxidativo sobre la planta, activando la síntesis de ROS (Gil & Tuteja, 2010). Para este ensayo, se evaluó la cantidad de peróxido de hidrógeno generado por la planta en situaciones de no estrés (control) y en cuatro situaciones de estrés salino diferentes (Concentración de NaCl = 50mM, 100mM, 200mM, 300mM). Mientras que si se observaron diferencias en el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre las diferentes especies, el contenido no varió significativamente en los diferentes tratamientos aplicados a *S. melongena* (Tabla 6). En el caso de *S. insanum*, si encontramos diferencias significativas en el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre el control y el tratamiento a 300mM (Tabla 6). Por tanto, podemos deducir que, al no haberse generado un incremento en la concentración de ROS, el estrés oxidativo sufrido por las plantas fue menor.

El análisis de la actividad enzimática antioxidante aportó información que corroboraba esta teoría. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos salinos para MEL e INS en catalasa y glutatión reductasa. En el caso de la superóxido dismutasa, si se observaron diferencias significativas entre los niveles de

enzimas de ambas especies, sin embargo, estos niveles no tuvieron una variación significativa en los diferentes tratamientos, a excepción de INS-Control e INS-300mM, donde sí se obtuvieron diferencias significativas (Fig. 18). Este resultado se ajusta con lo obtenido en la cuantificación de peróxido de hidrógeno, ya que la superóxido dismutasa va a ser la enzima que intervenga en la conversión del superóxido ( $O_2^-$ ) en  $H_2O_2$  (Skalická *et al.* 2012). Sin embargo, los niveles de  $H_2O_2$  producidos bajo estas situaciones de estrés no fueron suficientes para la activación de catalasa y glutatión reductasa, encargadas de la eliminación de  $H_2O_2$  (Gebika & Kry-Mudeja, 2019), Rao & Reddy, 2008). Por tanto, podemos decir que en este trabajo no se encontró actividad enzimática significativa para el estrés salino.

Consecuentemente y para dar una mejor explicación a esta ausencia de respuesta enzimática, en el trabajo de Brenes-Martínez (2018) se analizaron el contenido en MDA y prolina de estas mismas plantas. En sus resultados, el MDA tuvo una disminución con el aumento de la salinidad, lo cual, teóricamente, es un indicativo de que las plantas sometidas a estrés no llegaron a alcanzar el estado de estrés oxidativo (Munns & Tester, 2008). Por tanto, si no se alcanza un estado de estrés oxidativo, no se produce la activación de mecanismos antioxidantes.

Por otro lado, se observó un aumento en la síntesis de prolina al aplicar los tratamientos salinos. La acumulación de prolina como osmolito es una respuesta común en plantas sometidas a estrés osmótico debido a que permite disminuir el potencial osmótico celular y así permite el ingreso de agua en el interior celular (Munns & Tester 2008; Heuer, 2010). Este mecanismo puede haber sido suficiente en las variedades empleadas en el estudio para hacer frente al estrés salino al que fueron sometidas, por lo que no se generaría estrés oxidativo, no aumentarían significativamente los niveles celulares de ROS y, por tanto, no habría activación enzimática.

#### **5.4 Respuesta al tratamiento de sequía.**

En el ensayo de sequía tampoco se obtuvo actividad por parte de los antioxidantes enzimáticos para los genotipos empleados (MEL1, INs1 e INS2) ni para sus híbridos (MEL1xINS1 y MEL1xINS2). En este caso, al analizar el contenido en  $H_2O_2$  vemos que el único genotipo que difiere significativamente del resto es INS2, que manifiesta un mayor contenido en peróxido de hidrógeno tanto en el control como en el tratamiento con sequía, sin que la diferencia entre los tratamientos llegue a mostrarnos diferencias significativas en este caso. Por lo general, el tratamiento con sequía no produjo cambios significativos en la concentración de este compuesto. Sólo observamos diferencias en el híbrido MEL1xINS1, que a su vez había demostrado cierta heterosis al analizar sus parámetros morfológicos. Al igual que en el caso anterior, una ausencia de estrés oxidativo produce una ausencia en la generación de especies reactivas de

oxígeno, o por lo menos, una ausencia de cambios significativos en sus concentraciones.

Por tanto, al analizar la actividad de las enzimas antioxidantes, no se encontraron diferencias significativas a nivel de tratamiento para cada una de las tres enzimas analizadas (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión reductasa). En cuanto a los genotipos, tampoco se encontraron diferencias significativas entre ellos, salvo alguna excepción aislada.

Al igual que el en caso de salinidad, analizamos los niveles de MDA y prolina (Ribera, 2019) para justificar la respuesta enzimática. En el caso del MDA, no encontramos diferencias significativas entre el control y el tratamiento de sequía para los genotipos MEL1 e INS1, mientras que si observamos diferencias en INS2 y los dos híbridos. Sin embargo, la existencia de diferencias entre el estado de estrés hídrico y una situación basal no quiere decir que los niveles de MDA se consideren lo suficientemente altos como para determinar que nos encontramos ante una situación de estrés oxidativo. Como hemos visto al cuantificar los niveles de peróxido de hidrógeno, la producción de ROS no se ve alterada por la inducción del estrés.

Respecto a los niveles de prolina, encontramos diferencias altamente significativas entre el control y el tratamiento de sequía en todos los genotipos analizados y sus híbridos (Ribera, 2019). Sin embargo, las concentraciones de prolina no difieren significativamente entre dichos genotipos e híbridos. Como se dedujo en el caso del ensayo de salinidad, la prolina se acumula como osmolito en el citosol para ajustar el equilibrio osmótico y así contribuir a la tolerancia al estrés sin interferir con el metabolismo celular (Heuer, 2010). Por tanto, y como se ha visto en el caso de salinidad o en otros trabajos con estrés hídrico en berenjena como en el caso de Sarker *et al.* (2015), la prolina tiene un importante papel en el mantenimiento del equilibrio osmótico, incrementando la tolerancia de las berenjenas a situaciones de estrés abiótico sin necesidad de llegar a un estado de estrés oxidativo y activar otros mecanismos metabólicos más costosos como la producción de antioxidantes enzimáticos.

## **5.5 Perspectivas futuras.**

En este trabajo se ha analizado la respuesta enzimática antioxidante que presentan diferentes especies de berenjena al ser sometidas a condiciones de estrés hídrico y salino en invernadero. A la vista de los resultados, podemos concluir que de los diversos mecanismos que poseen las plantas para hacer frente a estas situaciones de estrés abiótico y siendo los antioxidantes enzimáticos una de las primeras líneas de defensa, las especies que presentan cierta tolerancia al estrés se decantan en una primera instancia por mecanismos que supongan un menor coste energético. En este

estudio, se ha evidenciado que tanto en el caso de salinidad como en el de sequía, el papel de la prolina como osmolito ha sido suficiente para reestablecer el balance osmótico, evitando así que la planta alcanzase unos niveles de estrés oxidativo que activasen los mecanismos enzimáticos analizados en este trabajo.

Por otro lado, no se ha demostrado en ningún caso un alto nivel de estrés oxidativo inicial, por lo que no se han observado diferencias significativas entre los tratamientos respecto al control. Esto nos lleva a pensar que las variedades escogidas dentro de cada especie presentan una buena tolerancia al estrés abiótico. Esta teoría es más contundente en el caso de *S. melongena*, la cual se esperaba que presentase una mayor susceptibilidad respecto a su pariente silvestre relacionado, *S. insanum*. Sin embargo, el hecho de que nuestra accesión tenga buena respuesta frente al estrés abiótico no asegura que otras accesiones tengan una respuesta similar. De hecho, existen estudios que constatan grandes diferencias en las respuestas según el genotipo (Plazas *et al.* 2019; Mustafa *et al.* 2017). En este caso, la accesión de *S. melongena* procede de Costa de Marfil, donde presumiblemente encontramos condiciones más áridas. Por tanto, sería interesante comprobar que las variedades más cultivadas presentan también estos niveles de tolerancia.

Puesto que el efecto del estrés depende del estado fisiológico de la planta, debería considerarse realizar este estudio en estadios más tempranos del desarrollo, ya que de esta forma se podrá determinar con mayor claridad qué variedades presentan mayor tolerancia frente a condiciones adversas si éstas se producen durante la germinación o durante el estadio de plántula.

También sería interesante realizar estos ensayos en campo para obtener una respuesta más acorde con las condiciones reales tanto a nivel climático como a nivel de desarrollo morfológico. En el caso de salinidad, también sería recomendable alargar el tiempo del ensayo en invernadero para poder ver la evolución de las plantas sometidas a menores concentraciones de NaCl.

Por último, se ha visto que uno de los híbridos (MEL1 x INS1) presenta heterosis en los parámetros morfológicos medidos en condiciones de sequía pero eso no significa que sea más tolerante a estas condiciones que los parentales (Ribera, 2019). En el caso de sequía, no se aprecian grandes diferencias en la tolerancia al estrés entre los híbridos analizados y sus parentales. Sin embargo, deben realizarse más estudios para completar la información obtenida hasta el momento, ya que puede ser interesante la mejora de especies silvestres así como el aumento de base genética de las especies cultivadas de cara a la adaptación a condiciones de cambio climático (Plazas *et al.* 2016)

## VI. Conclusiones.

- Las accesiones de *Solanum* spp. Evaluadas mostraron diferencias a nivel morfológico y de desarrollo en las plantas tras ser sometidas a estrés hídrico, mientras que las consecuencias para las plantas sometidas a estrés salino fueron menores. Se recomienda aumentar el tiempo de exposición al estrés salino.
- No se obtuvieron diferencias significativas a nivel enzimático como respuesta al estrés oxidativo a los diferentes tratamientos aplicados. De hecho, no se aprecia la manifestación de estrés oxidativo en las plantas empleadas en el estudio.
- Podemos concluir tras integrar información de otros estudios, que para las accesiones empleadas, el ajuste osmótico por producción de prolina es suficiente, sobretodo en el tratamiento de salinidad, para hacer frente a la perturbación sin necesidad de llegar a un estado de estrés oxidativo que active otros mecanismos de defensa.
- Este estudio ha proporcionado información sobre la tolerancia basal de las accesiones empleadas para ensayos futuros y para la optimización de los protocolos actuales.
- Dada la diversidad genética de la berenjena, se recomienda ampliar el estudio a un número mayor de accesiones en condiciones experimentales optimizadas.



## VII. Bibliografía

1. ACOSTA-MOTOS, J., ORTUÑO, M., BERNAL-VICENTE, A., DIAZ-VIVANCOS, P., SANCHEZ-BLANCO, M., & HERNANDEZ, J. (2017). Plant Responses to Salt Stress: Adaptive Mechanisms. *Agronomy*, 7(1), 18. doi:10.3390/agronomy7010018
2. AEBI, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105: 121–126
3. AKINCI I. E., AKINCI, S., YILMAZ, K. & DIKICI, H. (2004) Response of eggplant varieties (*Solanum melongena*) to salinity in germination and seedling stages, *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 32:2, 193-200, DOI: 10.1080/01140671.2004.9514296
4. AL HASSAN, M., MOROSAN, M., LÓPEZ-GRESA, M., PROHENS, J., VICENTE, O., & BOSCAIU, M. (2016). Salinity-Induced Variation in Biochemical Markers Provides Insight into the Mechanisms of Salt Tolerance in Common (*Phaseolus vulgaris*) and Runner (*P. coccineus*) Beans. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1582. doi:10.3390/ijms17091582
5. AMTMANN, ANNA & BEILBY, MARY JANE. (2010). The Role of Ion Channels in Plant Salt Tolerance. 10.1007/978-3-642-10494-7\_2.
6. ASHOK K. MISHRA, VIJAY P. SINGH, (2010) A review of drought concepts, *Journal of Hydrology*, Volume 391, Issues 1–2, Pages 202-216, ISSN 0022-1694, doi:10.1016/j.jhydrol.2010.07.012.
7. BADAWI, G.H., YAMAUCHI, Y., SHIMADA, E., SASAKI, R., KAWANO, N., TANAKA, K., KIYOSHI TANAKA, (2004) Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts, *Plant Science*, Volume 166, Issue 4, Pages 919-928, ISSN 0168-9452, doi:10.1016/j.plantsci.2003.12.007.
8. BEYER, WF., FRIDOVICH, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161:559–566.
9. BIAN, Z., ZHANG, X., WANG, Y., LU, CH., (2019) Improving drought tolerance by altering the photosynthetic rate and stomatal aperture via green light in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedlings under drought conditions, *Environmental and Experimental Botany*, Volume 167, 103844, ISSN 0098-8472, doi:10.1016/j.envexpbot.2019.103844.
10. BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J. & WERETILNYK, E. (2000). Responses to abiotic stress: Biochemistry & molecular biology of plants. Grisse, W. and Jones, R.; Eds.; *American Society of Plant Physiologist*, 1158-1203.
11. BRENES-MARTINEZ, M (2018). Análisis comparativo de las respuestas a estrés salino en berenjena cultivada (*S. melongena*) y dos especies silvestres relacionadas (*S. insanum* y *S. torvum*). *Trabajo de Fin de Grado en Ingeniería Biotecnológica*. Instituto Tecnológico de Costa Rica e Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Valencia.

12. CHEYNIER, V. (2012). Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, 11(2-3), 153-177. doi:10.1007/s11101-012-9242-8
13. CONNELL, J. P., MULLET, J. E. (1986). Pea chloroplast glutathione reductase: purification and characterization. *Plant Physiology*, 82:351–356.
14. DEMPEWOLF, H., EASTWOOD, R. J., GUARINO, L., KHOURY, C. K., MÜLLER, J. M., & TOLL, J., (2014) Adapting Agriculture to Climate Change: A Global Initiative to Collect, Conserve, and Use Crop Wild Relatives, *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 38:4, 369-377, doi: 10.1080/21683565.2013.870629
15. DING, S., LU, Q., ZHANG, Y., YANG, Z., XIAOGANG, W., ZHANG, L., LU, C., (2008) Enhanced sensitivity to oxidative stress in transgenic tobacco plants with decreased glutathione reductase activity leads to a decrease in ascorbate pool and ascorbate redox state. *Plant Molecular Biology*, ISSN 1573-5028, Springer (Netherlands), doi:10.1007/s11103-008-9440-3
16. FRARY, A., GÖL, D., KELEŞ, D., ÖKMEN, B., PINAR, H., ŞİĞVA, H. Ö, DOĞANLAR, S. (2010). Salt tolerance in *Solanum pennellii*: Antioxidant response and related QTL. *BMC Plant Biology*, 10(1), 58. doi:10.1186/1471-2229-10-58
17. GEBICKA, L, KRYCH-MADEJ, J., (2019) The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress, *Journal of Inorganic Biochemistry*, Volume 197, 110699, ISSN 0162-0134, doi:10.1016/j.jinorgbio.2019.110699.
18. GILL, S. S., TUTEJA, N. (2010), Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 48, Issue 12, Pages 909-930, ISSN 0981-9428, doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.
19. GISBERT C. PROHENS J. NUEZ F. (2011) Treatments for improving seed germination in eggplant and related species. *Acta Hort.* 898, 45-51
20. GRIGORE, M. N., VILLANUEVA, M., BOSCAIU, M. & VICENTE, O. (2012). Do Halophytes Really Require Salts for Their Growth and Development? An Experimental Approach. *Not Sci Biol*, 4(2):23-29.
21. GRILLAKIS, M. G., (2019) Increase in severe and extreme soil moisture droughts for Europe under climate change, *Science of The Total Environment*, Volume 660, Pages 1245-1255, ISSN 0048-9697, doi:10.1016/j.scitotenv.2019.01.001.
22. GUPTA, B., & HUANG, B. (2014). Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. *International Journal of Genomics*, 1-18. doi:10.1155/2014/701596
23. HEUER, B. (2010). Role of Proline in Plant Response to Drought and Salinity. doi:10.1201/b10329-1
24. HURTADO, M.; VILANOVA, S.; PLAZAS, M.; GRAMAZIO, P. Y FONSEKA, H. H. (2012). Diversity and Relationships of Eggplants from Three Geographically Distant Secondary Centers of Diversity. *PLoS ONE*, 7(7), 41748. doi:10.1371/journal.pone.0041748
25. JAGENDORF, AT; TAKABE, T. (2001) Inductores de la síntesis de glicinabetaína en cebada. *Plant Physiol.* 127 , 1827-1835, doi:10.1104/pp.010392

26. JAMES, E.R., (1994) Superoxide dismutase, *Parasitology Today*, Volume 10, Issue 12, Pages 481-484, ISSN 0169-4758, doi:10.1016/0169-4758(94)90161-9.
27. KALLOO, G., (1993) 43 - Eggplant: *Solanum melongena* L., Editor(s): G. KALLOO, B.O. BERGH, *Genetic Improvement of Vegetable Crops*, Pergamon, Pages 587-604, ISBN 9780080408262, doi:10.1016/B978-0-08-040826-2.50047-3.
28. KARAM, R. Saliba, S. Skaf, J. Breidy, Y. Rouphael, J. Balendonck, (2011) Yield and water use of eggplants (*Solanum melongena* L.) under full and deficit irrigation regimes, *Agricultural Water Management*, Volume 98, Issue 8, Pages 1307-1316, ISSN 0378-3774, doi:10.1016/j.agwat.2011.03.012.
29. KNAPP S, VORONTSOVA MS, PROHENS J (2013) Wild Relatives of the Eggplant (*Solanum melongena* L.: Solanaceae): New Understanding of Species Names in a Complex Group. *PLoS ONE* 8(2): e57039. doi:10.1371/journal.pone.0057039
30. KUMAR, S., SACHDEVA, S., BHAT, K.V., VATS, S. (2018) Plant Response to Drought Stress: Physiological, Biochemical and Molecular Basis. Vats, S., *Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants*. Rajasthan, India. Ed: Springer.
31. LARCHER, W. *Physiological Plant Ecology*, 4<sup>th</sup> ed.; Springer-Verlag: Heidelberg / Berlín, Alemania; Nueva York, NY, EE. UU., 2003
32. MENNELLA, G.; LO SCALZO, R.; FIBIANI, M.; D’ALESSANDRO, A.; FRANCESE, G.; TOPPINO, L.; ROTINO, G. L. (2012). Chemical and Bioactive Quality Traits During Fruit Ripening in Eggplant (*S. melongena* L.) and Allied Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(47), 11821–11831. doi:10.1021/jf3037424
33. MEYER, R.S., KAROL, K.G., LITTLE, D.P., NEE, M.H., LITT, A., (2012)Phylogeographic relationships among Asian eggplants and new perspectives on eggplant domestication, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Volume 63, Issue 3, Pages 685-701, ISSN 1055-7903, doi:10.1016/j.ympev.2012.02.006.
34. MUCHATE, N. S., NIKALJE, G. C., RAJURKAR, N. S., SUPRASANNA, P., & NIKAM, T. D. (2016). Plant Salt Stress: Adaptive Responses, Tolerance Mechanism and Bioengineering for Salt Tolerance. *The Botanical Review*, 82(4), 371-406. doi:10.1007/s12229-016-9173-y
35. MUSTAFA, Z., AYYUB, C.M., AMJAD,M., AHMAD, R. (2017) Assesment of biochemical and ionic attributes against salt stress in eggplant (*Solanum melongena* L.) genotypes. *The Journal of Animal & Plant Sciences* 27(2), pp 503-509, ISSN: 1018-7081.
36. MUNNS R (1992) A Leaf Elongation Assay Detects an Unknown Growth Inhibitor in Xylem Sap From Wheat and Barley. *Functional Plant Biology* 19, 127-135. doi:10.1071/PP9920127
37. MUNNS, R. & Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 59, 651-681.
38. MUÑOZ-FALCÓN, J.E., PROHENS, J., VILANOVAS, S., NUEZ,F. (2009) Diversity in

- commercial varieties and landraces of black eggplants and implications for broadening the breeders' genepool *Ann. Appl. Biol.* 154:453-465, doi:10.1111/j.1744-7348.2009.00314.x
39. NAGAMIYA, K., MOTOHASHI, T., NAKAO, K., PRODHAN, S.H., HATTORI, E., HIROSE, S., OZAWA, K., OHKAWA, Y., TAKABE, T., KOMAMINE, A., (2007) Enhancement of salt tolerance in transgenic rice expressing an *Escherichia coli* catalase gene, *katE*, *Plant Biotechnology Reports*, Volume 1, Issue 1, pp 49-55, doi:10.1007/s11816-007-0007-6
  40. NISAR, N., LI, L., LU, S., CHI KHIN, N., POGSON, B.J., (2015) Carotenoid Metabolism in Plants, *Molecular Plant*, Volume 8, Issue 1, Pages 68-82, ISSN 1674-2052, doi:10.1016/j.molp.2014.12.007.
  41. PLAZAS, M.; VILANOVA, S.; GRAMAZIO, P.; RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A.; FITA, A.; HERRAIZ, F. J. Y PROHENS, J. (2016). Interspecific Hybridization between Eggplant and Wild Relatives from Different Genepools. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 141(1), 34–44. doi:10.21273/JASHS.141.1.34
  42. PLAZAS, M., NGUYEN, H.T., GONZÁLEZ-ORENGA, S., FITA, A., VICENTE, O., PROHENS, J., BOSCAIU, M. (2019) Comparative analysis of the responses to water stress in eggplant (*Solanum melongena*) cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry* 143, pp 72-82, doi: 10.1016/j.plaphy.2019.08.031
  43. PREMABATI, CH., DEVI, A.D. MUNSHI, T.K. BEHERA, H. CHOUDHARY, VINOD, B. GURUNG, P. SAHA, (2015) Cross compatibility in interspecific hybridization of eggplant, *Solanum melongena*, with its wild relatives, *Scientia Horticulturae*, Volume 193, Pages 353-358, ISSN 0304-4238, doi:10.1016/j.scienta.2015.07.024.
  44. PROHENS, J., PLAZAS, M., RAIGÓN, M.D., SEGUÍ-SIMARRO, J.M., STOMMEL, J.R., VILANOVA, S., (2012) Characterization of interspecific hybrids and first backcross generations from crosses between two cultivated eggplants (*Solanum melongena* and *S. aethiopicum* Kumba group) and implications for eggplant breeding. *Euphytica* Volume 186, Issue 2, pp 517-538, doi:10.1007/s10681-012-0652-x
  45. QUAN, L.J., ZHANG, B., SHI, W-W., LI, H-Y (2008) Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network, *Journal of Integrative Plant Biology*, Volume 50, Issue 1, pp 2-18, doi:10.1111/j.1744-7909.2007.00599.x
  46. QUIDEAU, S., DEFFIEUX, D., DOUAT-CASASSUS, C., POUYSÉGU, L (2011) Plant Polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, Volume 50, Issue 3, doi:10.1002/anie.201000044
  47. RANIL, R. H. G.; NIRAN, H. M. L.; PLAZAS, M.; FONSEKA, R. M.; FONSEKA, H. H.; VILANOVA, S. Y PROHENS, J. (2015). Improving seed germination of the eggplant rootstock *Solanum torvum* by testing multiple factors using an

- orthogonal array design. *Scientia Horticulturae*, 193, 174–181. doi:10.1016/j.scienta.2015.07.030
48. RANIL, R.H.G., PROHENS, J., AUBRIOT, X., NIRAN, H.M.L., PLAZAS, M., FONSEKA, R.M., VILANOVA, S., FONSEKA, H.H., GRAMAZIO, P., KNAPP, S. (2017) *Solanum insanum* L. (subgenus *Leptostemonum* Bitter, Solanaceae), the neglected wild progenitor of eggplant (*S. melongena* L.): a review of taxonomy, characteristics and uses aimed at its enhancement for improved eggplant breeding, *Genetic resources -and Crop Evolution* Volume , Issue 7, pp, doi:10.1007/s10722-016-0467-z
  49. RAO A.S.V.C., REDDY A.R. (2008) Glutathione Reductase: A Putative Redox Regulatory System in Plant Cells. In: Khan N.A., Singh S., Umar S. (eds) *Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants*. (pp 111-147), Springer, Berlin, Heidelberg, doi:10.1007/978-3-540-76326-0\_6
  50. RENGASAMY, P., & OLSSON, K. (1991). Sodidity and soil structure. *Australian Journal of Soil Research*, 29(6), 935. doi:10.1071/sr9910935
  51. RENGASAMY, P. (2006). World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany*, 57(5), 1017-1023. doi:10.1093/jxb/erj108
  52. RIBERA, E (2019). Respuestas fisiológicas y bioquímicas a la sequía en genotipos de berenjena (*Solanum* spp), *Trabajo de Fin de Grado en Biotecnología*, Universidad Politécnica de Valencia.
  53. ROMAERO-PUERTAS, M.C., CORPAS, F.J., SANDALIO, L.M., LETERRIER, M., RODRIGUEZ-SERRANO, M., DEL RIO, L.A., PALMA, J.M., (2006) Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New Phytologist*, Volume 170, Issue 1, doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01643.x
  54. SARKER, B.C., HARA, M., UEMURA, M., (2005) Proline synthesis, physiological responses and biomass yield of eggplants during and after repetitive soil moisture stress, *Scientia Horticulturae*, Volume 103, Issue 4, Pages 387-402, ISSN 0304-4238, doi:10.1016/j.scienta.2004.07.010.
  55. SCHOFIELD, R. V., & KIRKBY, M. J. (2003). Application of salinization indicators and initial development of potential global soil salinization scenario under climatic change. *Global Biogeochemical Cycles*, 17(3). doi:10.1029/2002gb001935
  56. SHAHBAZ, M., ASHRAF, M., AL-QURAINY, F. Y HARRIS, PJC (2012). *Tolerancia a la sal en cultivos vegetales seleccionados*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31 (4), 303–320. doi: 10.1080 / 07352689.2012.65649
  57. SHARMA, I., AHMAD, P., (2014) Chapter 4 - Catalase: A Versatile Antioxidant in Plants, Editor(s): Parvaiz Ahmad, *Oxidative Damage to Plants*, Academic Press, Pages 131-148, ISBN 9780127999630, doi:10.1016/B978-0-12-799963-0.00004-6.
  58. SKALICKÁ, Z.F., ZÖLZER, F BERÁNEK, L., RACEK, J., (2012) Indicators of oxidative

- stress after ionizing and/or non-ionizing radiation: Superoxid dismutase and malondialdehyde, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 117, Pages 111-114, ISSN 1011-1344, doi:10.1016/j.jphotobiol.2012.08.009.
59. STAHL, W., & SIES, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 345-351. doi:10.1016/s0098-2997(03)00030-x
  60. STAVRIDOU, E., HASTINGS, A., WEBSTER, R. J., & ROBSON, P. R. (2016). The impact of soil salinity on the yield, composition and physiology of the bioenergy grass *Miscanthus × giganteus*. *GCB Bioenergy*, 9(1), 92-104. doi:10.1111/gcbb.12351
  61. SUN, T., YUAN, H., CAO, H., YAZDANI, M., TADMOR, T., LI, L., (2018) Carotenoid Metabolism in Plants: The Role of Plastids, *Molecular Plant*, Volume 11, Issue 1, Pages 58-74, ISSN 1674-2052, doi:10.1016/j.molp.2017.09.010.
  62. TAHER, D., SOLBERG, S. Ø, PROHENS, J., CHOU, Y., RAKHA, M., & WU, T. (2017). World Vegetable Center Eggplant Collection: Origin, Composition, Seed Dissemination and Utilization in Breeding. *Frontiers in Plant Science*, 8. doi:10.3389/fpls.2017.01484
  63. TANG, X .; MU, X .; SHAO, H .; WANG, H .; BRESTIC, M. Mecanismos globales de respuesta de las plantas al estrés salino: niveles fisiológicos y moleculares e implicaciones en biotecnología. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2015, 35 , 425–437. doi: 10.3109 / 07388551.2014.889080
  64. TÜRKAN, I., DEMIRAL, T., (2009) Recent developments in understanding salinity tolerance, *Environmental and Experimental Botany*, Volume 67, Issue 1, Pages 2-9, ISSN 0098-8472, doi:10.1016/j.envexpbot.2009.05.008.
  65. VILAGROSA, A., MORALES, F., ABADÍA, A., BELLOT, J., COCHARD, H., GIL-PELEGRIN, E., (2010) Are symplast tolerance to intense drought conditions and xylem vulnerability to cavitation coordinated? An integrated analysis of photosynthetic, hydraulic and leaf level processes in two Mediterranean drought-resistant species, *Environmental and Experimental Botany*, Volume 69, Issue 3, Pages 233-242, ISSN 0098-8472, doi:10.1016/j.envexpbot.2010.04.013.
  66. VILAGROSA, ALBERTO & CHIRINO, ESTEBAN & PEGUERO-PINA, JOSÉ JAVIER & BARIGAH, TÊTÈ & COCHARD, HERVÉ & PELEGRÍN, EUSTAQUIO. (2012). Plant Responses to Drought Stress. 10.1007/978-3-642-32653-0\_3.
  67. WANG, W.; VINO CUR, B. Y ALTMAN, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1–14. doi:10.1007/s00425-003-1105-5
  68. WEESE, T. L. Y BOHS, L. (2007). A Three-Gene Phylogeny of the Genus *Solanum* (Solanaceae). *Systematic Botany*, 32(2), 445–463. doi:10.1600/036364407781179671
  69. WICKE, BIRKA & SMEETS, EDWARD & DORNBURG, VERONIKA & VASHEV, BORIS & GAISER, THOMAS & TURKENBURG, W.C. & P. C. FAAIJ, A. (2011). The global technical and economic potential of bioenergy from salt-affected soils.

- Energy & Environmental Science* - ENERGY ENVIRON SCI. 4. 2669-2681. 10.1039/C1EE01029H.
70. WOOD, A. J., (2005) Eco-physiological adaptations to limited water environments. Jenks, M. A., Hasegawa, P. M., *Plant Abiotic Stress* (pp 1-14) Indiana (USA). Ed: Blackwell Publishing.
71. XIAOLI TANG, XINGMIN MU, HONGBO SHAO, HONGYAN WANG & MARIAN BRESTIC (2015) Global plant-responding mechanisms to salt stress: physiological and molecular levels and implications in biotechnology, *Critical Reviews in Biotechnology*, 35:4, 425-437, doi: 10.3109/07388551.2014.889080
72. XU, KAI, DAWEN YANG, XIANGYU XU, HUIMIN LEI, (2015) Copula based drought frequency analysis considering the spatio-temporal variability in Southwest China, *Journal of Hydrology*, Volume 527, Pages 630-640, ISSN 0022-1694, doi:10.1016/j.jhydrol.2015.05.030.
73. YADAV, F., IRFAN, M., AHMAD, A., & HAYAT, S. (2011). Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: A review. *J. Environ. Biol.*, 32, 667-685.
74. ZHANG, H., IRVING, L. J., MCGILL, C., MATTHEW, C., ZHOU, D., & KEMP, P. (2010). The effects of salinity and osmotic stress on barley germination rate: Sodium as an osmotic regulator. *Annals of Botany*, 106(6), 1027-1035. doi:10.1093/aob/mcq204