



Instituto Politécnico Nacional
Centro Interdisciplinario de Investigación para el
Desarrollo Integral Regional Unidad Durango

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

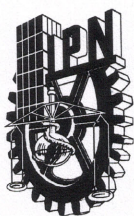
**EFFECTO DE ESTRÉS SALINO SOBRE LOS
NIVELES DE METILACIÓN Y COMPOSICIÓN
FENÓLICA DE *Physalis ixocarpa***

Claudia Esmeralda Hernández Pacheco

Directora de tesis: DC Norma Almaraz Abarca
Co-Director de tesis: DC Marlon Rojas López

Victoria de Durango, Durango
Enero 2023





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

Ciudad de México, a 23 de 11 del 2021

El Colegio de Profesores de Posgrado de IPN-CIIDIR Unidad Durango en su Sesión
(Unidad Académica)

Ordinaria No. 6 celebrada el día 02 del mes julio de 2018, conoció la solicitud
presentada por el (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	Hernández	Apellido Materno:	Pacheco	Nombre (s):	Claudia Esmeralda
-------------------	-----------	-------------------	---------	-------------	-------------------

Número de registro: A 1 8 0 5 7 8

del Programa Académico de Posgrado: Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Referente al registro de su tema de tesis; acordando lo siguiente:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

Efecto de estrés salino sobre los niveles de metilación y composición fenólica de *Physalis ixocarpa*

Objetivo general del trabajo de tesis:

Determinar el efecto del estrés salino sobre las características morfométricas, la composición fenólica, la actividad de enzimas del estrés oxidativo, y los niveles de metilación genómica en hojas de *Physalis ixocarpa* var. Rendidora en tres tiempos de exposición, en condiciones de invernadero.

2.- Se designa como Directores de Tesis a los profesores:

Director: Dra. Norma Almaraz Abarca

2° Director: Dr. Marlon Rojas López

No aplica: ☐

3.- El Trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:

IPN- CIIDIR Unidad Durango

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente, hasta la aprobación de la versión completa de la tesis por parte de la Comisión Revisora correspondiente.

Director(a) de Tesis

Dra. Norma Almaraz Abarca

Aspirante

M. en C. Claudia Esmeralda Hernández Pacheco

2° Director de Tesis (en su caso)

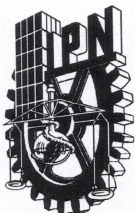
Dr. Marlon Rojas López

Presidente del Colegio

Dr. Eduardo Sánchez Ortiz



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
IPN CIIDIR DURANGO



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Victoria de Durango siendo las 11:41 horas del día 6 del mes de Octubre
del 2022 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de
Profesores de Posgrado de: Doctorado en Ciencias en Biotecnología para examinar la tesis titulada:

Efecto de estrés salino sobre los niveles de metilación y composición fenólica de *Physalis ixocarpa*

del (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	Hernández	Apellido Materno:	Pacheco	Nombre (s):	Claudia Esmeralda
-------------------	-----------	-------------------	---------	-------------	-------------------

Número de registro:

A 1 8 0 5 7 8

Aspirante del Programa Académico de Posgrado:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene **10 %** de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo SI ☐ NO ☒ **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN: *(Por ejemplo, el % de similitud se localiza en metodologías adecuadamente referidas a fuente original)*

El porcentaje de similitud fue observado en la mayoría en la metodología debido a que se hizo referencia a la fuente original

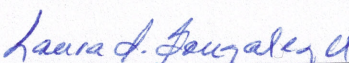
****Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

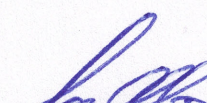
Finalmente y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** ☒ **SUSPENDER** ☐ **NO APROBAR** ☐ la tesis por **UNANIMIDAD** ☒ o **MAYORÍA** ☐ en virtud de los motivos siguientes:

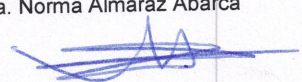
la alumna ha cumplido satisfactoriamente con los objetivos planteados en su proyecto de tesis y ha atendido con las observaciones realizadas por los miembros del comité,

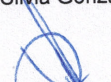
COMISIÓN REVISORA DE TESIS

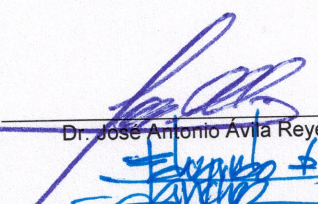

Dra. Norma Almaraz Abarca

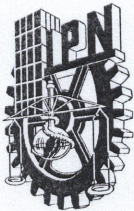

Dra. Laura Silvia González Valdéz


Dr. José Antonio Avila Reyes


Dr. Marlon Rojas López


Dr. René Torres Ricario


Dr. Eduardo Sánchez Ortiz
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

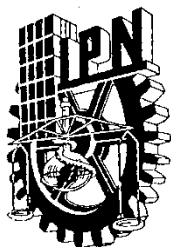
CARTA DE AUTORIZACIÓN DE USO DE OBRA PARA DIFUSIÓN

En la Ciudad de México el día **6** del mes de **Octubre** del año **2022**, la que suscribe **Claudia Esmeralda Hernández Pacheco** alumna del programa de **Doctorado en Ciencias en Biotecnología** con número de registro **A180578**, adscrita al **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Durango** manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección de la **Dra Norma Almaraz Abarca** y el **Dr Marlon Rojas López** y cede los derechos del trabajo titulado **“Efecto de estrés salino sobre los niveles de metilación y composición fenólica de *Physalis ixocarpa*”**, al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expresado del autor y/o directores. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguiente(s) dirección(es) de correo **clauesmehp@hotmail.com**, **nalmaraz@ipn.mx**, **mrojasl@ipn.mx**. Si el permiso se otorga, al usuario deberá dar agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.



Claudia Esmeralda Hernández
Pacheco



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Durango, Dgo., el día **6** del mes de **octubre** del año **2022** la que suscribe **Claudia Esmeralda Hernández Pacheco** alumna del Programa de **Doctorado en Ciencias en Biotecnología**, con número de registro **A180578**, adscrita al **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango. CIIDIR-IPN Unidad Durango**, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de **Norma Almaraz Abarca** y de **Marlon Rojas López** y cede los derechos del trabajo titulado **“Efecto de estrés salino sobre los niveles de metilación y composición fenólica de *Physalis ixocarpa*”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones **clauesmehp@hotmail.com**, **nalmaraz@ipn.mx**, **mrojasl@ipn.mx**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

CLAUDIA ESMERALDA HERNÁNDEZ PACHECO

Este proyecto de investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango (CIIDIR-IPN) bajo la dirección de la Dra. Norma Almaraz Abarca y el Dr. Marlon Rojas López

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Héctor y Lupita por darme siempre su apoyo y amor incondicional, a mis hermanas, cuñados y sobrinos por ser el mejor modelo de amistad, a mi abuelita+ por querernos, cuidarnos y apoyarnos

A mi hija Regina y mi esposo Oswaldo por brindarme su apoyo, amor y comprensión

A mis amigos y compañeros del laboratorio que me acompañaron en esta etapa de mi vida

A mis asesores Dra Norma y Dr Marlon por permitirme realizar este proyecto en su laboratorio, compartirme sus conocimientos, el apoyo y la paciencia que me brindaron

A CONACyT por brindarme el apoyo económico para realizar este proyecto

DEDICATORIA

A mi “familia chiquita”, mi esposo Oswaldo e hijos, Regina y mis angelitos+

ÍNDICE

RESUMEN	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Estrés	3
2.1.1 Estrés salino en plantas.....	3
2.1.2 Efecto de la salinidad en las plantas	4
2.1.3 Mecanismos morfológicos de las plantas de adaptación a estrés salino	5
2.1.4 Mecanismos bioquímicos de las plantas de adaptación a estrés salino	6
2.1.5 Mecanismos químicos de las plantas de adaptación a estrés salino	8
2.2 Epigenética	12
2.2.1 Procesos epigenéticos.....	12
2.2.2 Metilación del ADN	13
2.2.3 Técnica MSAP (Amplificación de Polimorfismos Sensibles a la Metilación)	14
2.2.4 Contribución de la epigenética a la adaptación de las plantas ante el estrés	14
2.3 <i>Physalis ixocarpa</i>	15
2.3.1 Importancia comercial de <i>Physalis ixocarpa</i> en México	16
2.3.2 Características botánicas y etapas de crecimiento de <i>Physalis ixocarpa</i> ..	17
2.3.3 Metabolitos encontrados en el género <i>Physalis</i>	19
2.3.4 Salinidad y <i>Physalis ixocarpa</i>	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. OBJETIVOS.....	22
4.1 Objetivo general	22
4.2 Objetivos específicos	22
5. METODOLOGÍA	23
5.1 Material vegetal y tratamientos salinos	23
5.2 Medición de las variables morfométricas	24
5.3 Preparación de los extractos fenólicos	24
5.4 Determinación del contenido de fenoles totales (TP)	25

5.5 Determinación de taninos condensados (TCT)	25
5.6 Determinación de los perfiles fenólicos por medio de HPLC-DAD y contenidos de flavonoides (TF) y ácidos fenólicos (PA).....	26
5.7 Determinación de carotenoides (CR).....	27
5.8 Actividad bloqueadora del radical DPPH	27
5.9 Determinación del poder reductor de hierro (PR)	28
5.10 Actividades de enzimas antioxidantes	28
5.10.1 Catalasa (CAT)	28
5.10.2 Superóxido dismutasa (SOD)	29
5.10.3 Determinación de prolina.....	30
5.11 Análisis epigenéticos	31
5.11.1 Polimorfismos de amplificación sensibles a la metilación (MSAP).....	31
5.11.2 Extracción de ADN	31
5.11.3 Digestión.....	31
5.11.4 Ligación	32
5.11.5 Preamplificación	32
5.11.6 Amplificación selectiva.....	33
5.12 Análisis de datos	33
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
6.1 Efecto de la salinidad en las características morfométricas de <i>Physalis ixocarpa</i> var Rendidora.....	35
6.1.2. ACP y análisis de correlación basado en las características morfométricas de <i>Physalis ixocarpa</i> var Rendidora crecidas en condiciones diferentes de salinidad.....	37
6.2. Efecto del estrés salino en la respuesta química de <i>Physalis ixocarpa</i> var Rendidora.....	40
6.2.1. ACP basado en las características químicas de <i>Physalis ixocarpa</i> var Rendidora crecidas en condiciones diferentes de salinidad.....	51
6.3. Efecto del estrés salino en la respuesta bioquímica de <i>Physalis ixocarpa</i> var Rendidora.....	53
6.3.1. ACP basado en las características bioquímicas de <i>Physalis ixocarpa</i> var Rendidora crecidas en condiciones diferentes de salinidad.....	56
6.4. Efecto del estrés salino en la metilación de <i>Physalis ixocarpa</i> var Rendidora sometida a diferentes tratamientos de estrés salino.....	61

6.4.1. ACP y análisis de agrupamiento basados en los patrones de metilación de <i>Physalis ixocarpa</i> var Rendidora crecidas en condiciones diferentes de salinidad	67
7. CONCLUSIONES	70
8. RECOMENDACIONES	73
9. LITERATURA CITADA.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica de los flavonoides.....	10
Figura 2. Estructura de ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico (A) y de los ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico (B).....	11
Figura 3. Estructura del β -caroteno.....	12
Figura 4. Metilación de la citosina.....	13
Figura 5. Plantas de tomate de cáscara (<i>Physalis ixocarpa</i>).....	18
Figura 6. Análisis de componentes principales basado en las características morfométricas de <i>P. ixocarpa</i>	38
Figura 7. Análisis de agrupamiento basado en las características morfométricas de <i>P. ixocarpa</i>	39
Figura 8. Efecto de los tratamientos en el contenido de fenoles totales, taninos condensados, flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides, radical DPPH y poder reductor de hierro de <i>P. ixocarpa</i>	44
Figura 9. Cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD correspondientes a plantas de <i>P. ixocarpa</i>	45
Figura 10. Espectros UV de los compuestos resueltos en los cromatogramas correspondientes a plantas de <i>P. ixocarpa</i>	49
Figura 11. Análisis de componentes principales basado en las características químicas de <i>P. ixocarpa</i>	51
Figura 12. Análisis de agrupamiento basado en las características químicas de <i>P. ixocarpa</i>	52
Figura 13. Actividad enzimática del osmolito prolina, catalasa y superóxido dismutasa en <i>P. ixocarpa</i>	56
Figura 14. Análisis de componentes principales basado en las características bioquímicas de <i>P. ixocarpa</i>	57
Figura 15. Análisis de agrupamiento basado en las características bioquímicas de <i>P. ixocarpa</i>	58
Figura 16. Resultados del análisis de correspondencia canónica que muestra el efecto de la concentración de NaCl y de la duración de los tratamientos sobre las respuestas químicas de <i>P. ixocarpa</i>	59
Figura 17. Resultados del análisis de correspondencia canónica que muestra el efecto de la concentración de NaCl y de la duración de los tratamientos sobre las respuestas bioquímicas de <i>P. ixocarpa</i>	60

Figura 18. Loci amplificados con la combinación 4 de iniciadores selectivos de <i>EcoRI</i> – <i>MspI/HpaII</i> para plantas de <i>P. ixocarpa</i>	65
Figura 19. Análisis de componentes principales basado en los patrones de metilación de <i>P. ixocarpa</i>	68
Figura 20. Análisis de agrupamiento sobre los patrones de metilación de <i>P. ixocarpa</i> crecidas en condiciones de salinidad.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos salinos a los que se sometió a <i>P. ixocarpa</i>	24
Tabla 2. Adaptadores MSAP utilizados para la ligación del ADN	32
Tabla 3. Primers utilizados para la preamplificación	33
Tabla 4. Primers utilizados para la amplificación selectiva	33
Tabla. 5. Interpretación de la sensibilidad de <i>MspI</i> y <i>HpaII</i> al estado de metilación..	34
Tabla 6. Características morfométricas de <i>P. ixocarpa</i>	37
Figura 6. Análisis de componentes principales basado en las características morfométricas de <i>P. ixocarpa</i>	38
Tabla 7. Análisis de correlación de Pearson realizado sobre las características morfométricas de <i>P. ixocarpa</i>	39
Tabla 8. Concentraciones (µg/g ES) de los compuestos individuales encontrados en los perfiles fenólicos foliares de <i>P. ixocarpa</i>	50
Tabla 9. Análisis de correlación entre las variables químicas de <i>P. ixocarpa</i>	53
Tabla 10. Análisis de correlación entre variables bioquímicas de <i>P. ixocarpa</i>	58
Tabla 11. Patrones de metilación de <i>P. ixocarpa</i> crecida sin estrés salino y en una condición salina de 120 mM a diferentes tiempos de exposición, obtenidos con seis combinaciones de iniciadores selectivos (<i>EcoRI</i> y <i>MspI/HpaII</i>).	64
Tabla 12. Índices de diversidad (Nei y Shannon) y porcentaje de loci polimórficos de plantas de <i>P. ixocarpa</i>	66
Tabla 13. Diferenciación epigenética de <i>P. ixocarpa</i> crecida a dos condiciones salinas durante diferentes tiempos de exposición.....	67

RESUMEN

Physalis ixocarpa (tomatillo) es una especie de la familia Solanaceae, la cual tiene una importancia económica en México por sus frutos comestibles. Sin embargo, sus hojas también son aprovechadas, en México y otros países, por su alto contenido de compuestos bioactivos. El interés por ampliar su área de cultivo en este país, en el cual las zonas áridas y semiáridas, con suelos salinos, representan más de la mitad del territorio, hace relevante explorar su potencial de tolerancia al estrés salino. En el presente trabajo, se determinaron las respuestas morfométricas (altura de plantas, dimensiones de hojas, y longitud de raíz), químicas (contenido de fenoles totales, taninos, flavonoides, ácidos fenólicos, y terpenos, así como perfiles fenólicos y actividad antioxidante de extractos fenólicos), bioquímicas (contenido de prolina y actividades de catalasa y superóxido dismutasa), y epigenéticas (niveles de metilación del ADN) de las hojas de la variedad Rendidora de *P. ixocarpa*, al cultivo bajo tres concentraciones de NaCl (0, 90 mM, y 120 mM) durante tres tiempos de exposición (corto: 24 días, medio 42 días, y crónico: 57 días). Todas las determinaciones se hicieron para plantas crecidas en condiciones de invernadero, de acuerdo a los tiempos de los tratamientos. El registro de las respuestas químicas se llevó a cabo con diferentes métodos espectrométricos y cromatográficos (cromatografía líquida de alta resolución con detección de arreglo de diodos, HPLC-DAD), evaluando la actividad antioxidante de los extractos fenólicos como la capacidad bloqueadora del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y como el poder reductor de fierro. Las respuestas bioquímicas se determinaron con métodos espectrométricos, y las respuestas epigenéticas, con el método de polimorfismos de amplificación sensible a la metilación (MSAP). Los resultados mostraron que las respuestas morfométricas de *P. ixocarpa* a los diferentes tratamientos salinos fue variable, y en tratamientos cortos y medios la salinidad ejerció un efecto favorable en el crecimiento. Las respuestas químicas y bioquímicas también fueron variables en los diferentes tratamientos, encontrándose que el aumento en la concentración de prolina fue la única respuesta que mostró una clara dependencia del aumento de la concentración de NaCl en cualquier tiempo de exposición, por lo que se consideró el principal mecanismo de protección contra el estrés salino para la especie. El perfil fenólico fue específico de *P. ixocarpa*, estuvo

formado por un derivado 3-O-glicósido del flavonol quercetina, un derivado 3-O-glicósido del flavonol canferol, y seis ácidos fenólicos, entre ellos dos derivados del ácido *p*-cumárico. La concentración de un ácido fenólico incrementó en más de 26 veces bajo las condiciones más severas de salinidad (120 mM de NaCl durante 57 días), lo que sugiere que su participación fue importante como protector bajo esas condiciones particulares de salinidad. Las propiedades antioxidantes de los extractos no fueron claramente relacionadas con los compuestos fenólicos. Los resultados de análisis de correspondencia canónica (ACC), indicaron que el tiempo de exposición tuvo impacto principalmente sobre la concentración de flavonoides totales, carotenoides, y la actividad de CAT, mientras que la concentración de NaCl principalmente impactó sobre la concentración de fenoles totales, taninos condensados, ácidos fenólicos, prolina, y la actividad de SOD. Los niveles de metilación también fueron variablemente afectados por los diferentes tratamientos salinos, disminuyendo bajo la concentración de 120 mM de NaCl durante los tiempos corto y medio de exposición, con respecto a los controles respectivos, y aumentando después de la exposición crónica. Una serie de análisis de componentes principales (ACP) y de agrupamiento revelaron que todos los tipos de respuestas (morfológicas, químicas, bioquímicas, y epigenéticas) analizadas pueden sustentar el desarrollo de marcadores para discriminar entre plantas crecidas bajo cada tratamiento. El conjunto de los diferentes resultados sugiere que *P. ixocarpa* ha desarrollado un mecanismo complejo, dinámico, y complementario de defensa contra el estrés salino, diferencialmente modulado por la intensidad de la salinidad y por el tiempo de exposición a ella, por lo cual los estudios sobre potencial de tolerancia a la salinidad de una especie deberían hacerse a través de una gama de diferentes concentraciones de sal y durante exposiciones crónicas. El registro de las respuestas puede tener implicaciones agronómicas y económicas para esta especie importante y asociada histórica y culturalmente a México.

ABSTRACT

Physalis ixocarpa (tomatillo) belongs to the family Solanaceae, which is an economically important species in Mexico due to its edible fruits. However, its leaves are also used, in Mexico and other countries, for its high content of bioactive compounds. The interest in expanding its cultivation area in this country, in which arid and semi-arid zones, with saline soils, represent more than a half of the territory, makes it relevant to explore its potential for tolerance to saline stress. In the current study, the morphometric responses (plant height, leaf dimensions, and root length), chemical responses (content of total phenols, tannins, flavonoids, phenolic acids, and terpenes, as well as phenolic profiles and antioxidant activity of phenolic extracts), biochemical responses (proline content and activities of catalase and superoxide dismutase), and epigenetic responses (levels of DNA methylation) of the leaves of the Rendidora variety of *P. ixocarpa* were determined, when cultured under three concentrations of NaCl (0, 90 mM, and 120 mM) for three exposure times (short: 24 days, medium: 42 days, and chronic: 57 days). All determinations were made for plants grown under greenhouse conditions, according to the times of the treatments. The register of the chemical responses was carried out with different spectrometric and chromatographic methods (high performance liquid chromatography with diode array detection, HPLC-DAD), evaluating the antioxidant activity of the phenolic extracts as the free radical scavenging capacity of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and as the reducing power of iron. Biochemical responses were determined with spectrometric methods, and epigenetic responses with the methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) method. The results showed that the morphometric responses of *P. ixocarpa* to the different saline treatments were variable, and in short and medium treatments, salinity exerted a favorable effect on growth. The chemical and biochemical responses were also variable in the different treatments, finding that the increase in the concentration of proline was the only response that showed a clear dependence on the increase in the concentration of NaCl at any time of exposure, that was the reason why proline was considered the main mechanism of protection against salt stress for the species. The phenolic profile was specific to *P. ixocarpa*, it was formed by one 3-O-glycoside derivative of the flavonol quercetin, one 3-O-glycoside derivative of the flavonol

kaempferol, and six phenolic acids, including two derivatives of *p*-coumaric acid. The concentration of a phenolic acid increased more than 26 times under the most severe salinity conditions (120 mM NaCl for 57 days), which suggests that its participation as important as a protector under these particular salinity conditions. The antioxidant properties of the extracts were not clearly related to the phenolic compounds. The results of canonical correspondence analysis (CCA), indicated that the exposure time had an impact mainly on the concentration of total flavonoids, carotenoids, and CAT activity, while the concentration of NaCl mainly impacted on the concentration of total phenols, condensed tannins, phenolic acids, proline, and SOD activity. Methylation levels were also variably affected by the different salt treatments, decreasing under the 120 mM NaCl concentration during the short and medium exposure times, with respect to the respective controls, and increasing after chronic exposure. A series of principal component analyzes (PCA) and clustering analysis revealed that all types of responses (morphometric, chemical, biochemical, and epigenetic) analyzed can support the development of markers to discriminate between plants grown under each treatment. The set of different results suggests that *P. ixocarpa* has developed a complex, dynamic, and complementary mechanism of defense against saline stress, differentially modulated by the intensity of salinity and by the time of exposure to it, for which studies on the potential of tolerance to salinity of a species should be made across a range of different salt concentrations and during chronic exposures. The register of the responses may have agronomic and economic implications for this important species, historically and culturally associated with Mexico.

1. INTRODUCCIÓN

La importancia del tomatillo (*Physalis ixocarpa*) en México es de naturaleza cultural, alimenticia, y económica. Ésta, es una especie nativa de México, que en la actualidad está siendo introducida y cultivada en países de Europa y Asia, ya sea para el consumo de sus frutos comestibles y ricos en nutrientes, como para el aprovechamiento de sus bioproductos, principalmente acumulados en sus tejidos foliares. En México, esta especie también fue domesticada, siendo la única del género con ese carácter, de domesticada, en Mesoamérica.

Aunque para *P. ixocarpa* se han llevado a cabo varios estudios agronómicos sobre su cultivo y producción, estudios sobre su potencial de tolerancia a estrés biótico y abiótico han sido soslayados, a diferencia de lo que ha pasado con otras especies del género, como *P. peruviana*, que es la especie cultivada en la región andina, y *P. alkekengi*, que es la única especie no americana del género. Hasta donde fue posible investigar para la realización del presente estudio, éste es el primero que se realiza con el fin de determinar las respuestas morfométricas, químicas, bioquímicas, y epigenéticas para explorar el potencial de tolerancia a estrés salino del tomatillo.

La mayoría de los estudios sobre la tolerancia de especies de plantas a condiciones salinas se han hecho bajo una sola concentración de NaCl, que es la sal más abundante en los suelos, un solo tiempo de exposición, y un único estado de desarrollo. Sin embargo, los resultados del presente estudio, realizado durante tres tiempos de exposición de tomatillo a dos condiciones de salinidad, indican que las evaluaciones deben tener un carácter crónico y abarcar un intervalo de concentraciones de sal para lograr una idea detallada de la complejidad de respuestas que una sola especie es capaz de desplegar ante el estrés salino, lo que reflejará, a su vez, su potencial de tolerancia. Dada la importancia de *P. ixocarpa* en México y el mundo, los resultados de estudios como el presente pueden tener impacto en la

producción, expansión de áreas de cultivo, y desarrollo de nuevas variedades, de las cuales actualmente existen pocas (11) para *P. ixocarpa*.

El marco teórico, los métodos, los resultados, y las conclusiones del estudio se describen y desarrollan en las diferentes secciones del presente documento.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Estrés

Las plantas son organismos sésiles que están constantemente expuestas a condiciones o factores estresantes. Los factores que provocan estrés en plantas se dividen en: factores bióticos que incluyen virus, insectos, bacterias, nematodos, y hongos entre otros, y factores abióticos, tales como la sequía, radiación, temperatura, y salinidad, entre otros.

2.1.1. Estrés salino en plantas

El estrés salino es considerado como el que produce mayores pérdidas económicas (Mahajan y Tuteja, 2005) y más agresivo que otros tipos de estrés abiótico (Martínez *et al.*, 2016), siendo el cloruro de sodio la sal liberada más soluble y abundante (Flowers, 2004).

El estrés salino ha afectado a más de los 800 millones de hectáreas de suelo alrededor del mundo (FAO, 2008), y el actual cambio climático está contribuyendo a incrementar la salinidad de los suelos (Dasgupta *et al.*, 2015). El estrés salino se origina por dos tipos de factores:

- Naturales, como son la cercanía y la altura sobre el nivel del mar, largos periodos secos, los cuales condicionan la ocurrencia de procesos de salinización (Manchanda y Garg, 2008), y las características físico-químicas del suelo (Smith y Smith, 2007).
- Antropogénicos, como son las prácticas agrícolas incorrectas, riego con agua de mala calidad, y sales presentes en desechos animales.

2.1.2. Efecto de la salinidad en las plantas

Altas deposiciones salinas en el suelo incrementan la dificultad de las plantas para adquirir agua y nutrientes, causando una disminución en su desarrollo y crecimiento. Primeramente, las plantas sufren estrés hídrico, debido a que el potencial osmótico del suelo es mayor y esto conlleva una disminución en la absorción del agua, posteriormente, las plantas se ven afectadas por la toxicidad ión-específica, la cual se presenta por una alta concentración de los iones de Na y Cl en su interior, finalmente las plantas presentan un desbalance nutricional debido a la alta concentración de los iones de Na y Cl reducen la absorción de nutrientes esenciales para las plantas (Akram *et al.*, 2010). Todo lo anterior conlleva a una producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales, cuando se acumulan en la planta, llegan a alterar el ADN, ARN, lípidos y proteínas, y así, los patrones de expresión génica (Jaleel *et al.*, 2007), pudiendo causar la muerte de las plantas.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO), generadas en las plantas sometidas a estrés, son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, proporcionándole inestabilidad y alta reactividad. Algunos ejemplos de especies reactivas de oxígeno son el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2) y el radical hidroxilo (OH^-).

Tester y Davenport (2003) reportaron que las hojas son más vulnerables al Na^+ que las raíces. Sin embargo, las raíces acumulan concentraciones más bajas de Na^+ y Cl^- que los brotes. Un mecanismo a través del cual las plantas enfrentan el estrés salino, es minimizando la sal absorbida por las raíces y dividiéndola a nivel tisular y celular para que no se acumule hasta concentraciones tóxicas en el citosol de las hojas (Munns y Tester 2008).

El Cl^- es un elemento esencial para el crecimiento de las plantas, pero puede causar toxicidad cuando se encuentra en altas concentraciones en los tejidos

vegetales (Jacoby 1994; Al-Karaki, 2000; Zhu, 2001). Altas concentraciones de Cl^- producen quemaduras en las hojas, disminuyen la fotosíntesis e inhiben la absorción de nitratos (Alam, 1999; Martínez y Cerdá, 1989; Zekri y Parsons, 1992). La concentración de Na^+ en las plantas cultivadas en estrés salino suele ser más alta que los niveles de K^+ o Ca^{2+} , debido a la acumulación de Na^+ en las raíces y brotes (Bohra y Doerffling, 1993). Los niveles elevados de Na^+ suelen desplazar el Ca^+ de las células de la raíz, cambiando su integridad y la selectividad para la captación de K^+ del exterior (Cramer *et al.*, 1985), causando perturbaciones en la membrana celular y competencia por los sitios de enlace de potasio (K^+), el cuál es esencial para el metabolismo (Bhandal y Malik, 1988; Cerdá *et al.*, 1995). Altas concentraciones de Na^+ también desplazan los iones de calcio (Ca^{2+}) de los sitios de enlace de la membrana celular en la raíz, contribuyendo a la alteración de la permeabilidad, lo que causa una salida de K^+ de las células y favorece la entrada de Na^+ (Cramer *et al.*, 1994; Alam, 1999). Estos efectos se manifiestan en la alteración del funcionamiento de algunas enzimas (Niu *et al.*, 1995), inhibición de la división celular y de la fotosíntesis, reducción del crecimiento (Hanin *et al.*, 2016), y dependiendo de la intensidad y duración del estrés salino, las plantas pueden eventualmente morir.

Las plantas han desarrollado distintos mecanismos morfológicos, bioquímicos, y químicos para adaptarse a condiciones de estrés (García *et al.*, 2009).

2.1.3. Mecanismos morfológicos de las plantas de adaptación a estrés salino

Entre los mecanismos morfológicos está el incrementar el grosor de la cutícula de las hojas y la deposición de ceras en las mismas para disminuir la pérdida de agua, reduciendo el impacto del estrés hídrico provocado por la salinidad (Gorham *et al.*, 1985), y reducir la expansión foliar (Leidi y Pardo, 2002).

2.1.4. Mecanismos bioquímicos de las plantas de adaptación a estrés salino

Como la generación de un estado de oxidación en las células de plantas sometidas a estrés salino es detonante de desarreglos fisiológicos y morfológicos, las plantas pueden desplegar, dependiendo de la especie, una gama amplia de actividades enzimáticas, tales como catalasa, superóxido dismutasa, peroxidasa, y glutatión reductasa, entre otras (Sarker y Oba, 2018), e incrementar los niveles de osmolitos, los cuales permiten a las células retener agua y contribuyen a combatir el estado de desbalance oxidativo; entre ellos están la prolina y el manitol (Li *et al.*, 2019).

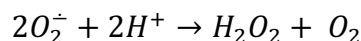
2.1.4.1. Prolina

Uno de los osmolitos más frecuentemente encontrados en plantas sometidas a estrés salino es la prolina. Este aminoácido puede desempeñar muchas y variadas funciones dentro de las células vegetales, tales como proteger contra la desnaturalización de las proteínas, estabilizar las membranas celulares al interactuar con los fosfolípidos, eliminar radicales hidroxilo, ser fuente de energía y nitrógeno, mediar el ajuste osmótico, estabilizar reacciones fotosintéticas y la estructura de proteínas del complejo fotosintético II, y estimular la síntesis de ATP (Claussen, 2005; Verbruggen y Hermans, 2008). Debido a esa amplia y diversa gama de funciones, la prolina es uno de los principales osmolitos en respuesta a diferentes tipos de estrés, tanto biótico como abiótico (Verbruggen y Hermans, 2008; Silveira *et al.*, 2003; Heuer, 2003).

2.1.4.2. Superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa es una metaloenzima que presenta diferentes formas de acuerdo al metal que actúe como cofactor: hierro (FeSOD), manganeso (MnSOD), cobre (CuZnSOD), y níquel (NiSOD). Esta enzima representa una de las primeras líneas de defensa de las células frente al estrés oxidativo ya que contribuyen a la

dismutación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), a especies menos reactivas (O_2 y H_2O_2), catalizando la siguiente ecuación:

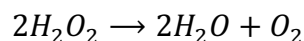


Superóxido dismutasa elimina el $O_2^{\cdot-}$ generado en las plantas sometidas a diferentes tipos de estrés, tales como salinidad, calor, sequía, y metales (Gill *et al.*, 2015)

Sin embargo, el peróxido de hidrógeno también es una especie reactiva de oxígeno que se genera en plantas sometidas a diferentes tipos de estrés, incluido el salino, el cual necesita ser eliminado por las plantas. La eliminación de esta especie reactiva se lleva a cabo por medio de otras enzimas, como la ascorbato peroxidasa y la catalasa.

2.1.4.3. Catalasa

La catalasa también es una metaloenzima que tiene diferentes formas, está presente en los peroxisomas y mitocondrias de plantas, animales, y bacterias aeróbicas (Chance y Maehly, 1955), y es capaz de degradar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), convirtiéndolo en agua y oxígeno molecular, a través de la siguiente ecuación:



Estructuralmente, las catalasas están conformadas por un grupo hemo que contiene un átomo de hierro ferroso y un anillo de porfirina, tetrapirrol cíclico, en cada subunidad para formar el sitio activo de la enzima (Chelikani *et al.*, 2004), todas las formas de catalasas han sido descritas en diferentes especies de plantas.

2.1.5. Mecanismos químicos de las plantas de adaptación a estrés salino

Los mecanismos químicos de las plantas contra el estrés salino están representados por la síntesis y acumulación de metabolitos especializados (o secundarios), tales como los compuestos fenólicos y los carotenoides (Ahanger *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019).

Se consideraba que los metabolitos secundarios no tenían una relación directa con el crecimiento y desarrollo de las plantas (Lustre, 2022). Sin embargo, al presente se ha reportado una gama muy amplia de funciones fisiológicas y ecológicas que estos metabolitos llevan a cabo en las plantas, por lo que el término “metabolitos especializados” actualmente se considera más adecuado (Corso *et al.*, 2020). Entre las funciones que desempeñan en las plantas se encuentran la protección contra diferentes tipos de estrés abiótico (Linić *et al.*, 2019; Coung *et al.*, 2020; Farooq *et al.*, 2021; Ghanem *et al.*, 2021), como defensa contra el ataque de herbívoros (Singh *et al.*, 2021) y patógenos (Yao *et al.*, 2019; Modesto *et al.*, 2021), y como agentes alelopáticos (Bi *et al.*, 2022).

Con base en su origen biosintético, los metabolitos especializados se clasifican en tres grandes grupos: los compuestos fenólicos, los compuestos nitrogenados, y los compuestos terpénicos (Taiz y Zeiger, 2006).

Los sistemas de defensa química de las plantas se dividen en dos tipos: constitutivos, es decir, ocurren de forma permanente y se encuentran en superficies de tejidos o almacenados y disponibles para ser liberados al ser necesarios, e inducidos, es decir, las plantas inducen su producción como respuesta al ataque o al estrés (Kaplan *et al.*, 2008).

Para muchas especies de plantas, la acumulación de compuestos fenólicos, muchos de ellos antioxidantes (Almaraz-Abarca *et al.*, 2007), son la primer respuesta al estrés salino, como para la col china (Šamec *et al.*, 2021), alforfón (*Fagopyrum esculentum*) (Lim *et al.*, 2012) y póleo (*Mentha pulegium*) (Oueslasti *et al.*, 2010). Ya

que tendencias especie-específicas de la composición fenólica de las plantas se ha encontrado para muy diversos grupos de plantas, como algunas especies de *Pinus* (Almaraz-Abarca *et al.*, 2006), de *Physalis* (Medina-Medrano *et al.*, 2015), y de *Brassica* (Linić *et al.*, 2019), la diversidad de compuestos fenólicos acumulados por plantas bajo estrés salino debe ser muy grande.

La composición fenólica de las plantas, principalmente en términos de concentración, puede ser afectada por el genotipo (Yang *et al.*, 2018), por el origen geográfico (del Valle *et al.*, 2015), y por las condiciones de crecimiento (Hernández-Pacheco *et al.*, 2022). También puede variar, cuantitativa y cualitativamente, entre los diferentes tejidos (Medina-Medrano *et al.*, 2015) y los diferentes estados de desarrollo de una misma planta (Cobaleda-Velasco *et al.*, 2017a), esto los convierte en importantes quimiomarcadores en el control de calidad de alimentos vegetales y sus derivados.

2.1.5.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son moléculas que poseen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático (Ambriz-Pérez *et al.*, 2016) y se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas (Caretto *et al.*, 2015). Los compuestos fenólicos tienen diversas funciones, tales como protección contra factores externos, bióticos o abióticos; también son responsables, junto con los carotenos, del color de las plantas, funcionan como compuestos alelopáticos, y debido a que pueden proporcionar un olor desagradable a las plantas o son tóxicos, actúan como agentes disuasivos para herbívoros (Mierziak *et al.*, 2014; Pagare *et al.*, 2015; Verma y Shukla, 2015; Zhang, *et al.*, 2018). Además, los compuestos fenólicos poseen actividades que son de importancia farmacológica y médica, tales como antimicrobianas, antidiabéticas, antioxidantes, y antiinflamatorias (Hussain *et al.*, 2019; Montané *et al.*, 2020), entre otras.

Dentro de los compuestos fenólicos, los flavonoides y los ácidos fenólicos son los que se encuentran mayormente distribuidos en las plantas (Ghasemzadeh y Ghasemzadeh, 2011).

Los flavonoides son compuestos fenólicos con una estructura básica de 15 carbonos (C6-C3-C6) distribuidos en dos anillos aromáticos (A y B), y un heterociclo (C) (Figura 1). De acuerdo al grado de oxidación que presentan en el anillo C, así como la presencia y posicionamiento de diferentes grupos sustituyentes (hidroxilo, metoxilo, y glicosil) en su estructura, se pueden distinguir diferentes tipos. Los más comúnmente encontrados en las plantas son los flavonoles y las flavonas (Tovar del Río, 2013). Estos tipos de flavonoides se caracterizan por tener un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 y un grupo carbonilo en el anillo C (Figura 2). La diferencia entre ellos es que las flavonas carecen de un grupo hidroxilo en el carbono 3, mientras que los flavonoles poseen este grupo. Otros tipos de flavonoides son las flavanonas, isoflavonas, flavan-3-oles, antocianinas, auronas, xantonas, y taninos condensados, estos últimos son polímeros cuyas unidades estructurales tienen la estructura básica de los flavonoides. Se han aislado e identificado aproximadamente 6000 compuestos flavonoides y muchos son comunes en plantas vasculares (Tolonen *et al.*, 2002; Austin y Noel, 2003), grupo en el que se encuentra la mayor diversidad estructural de estos compuestos (Hrazdina, 1992).

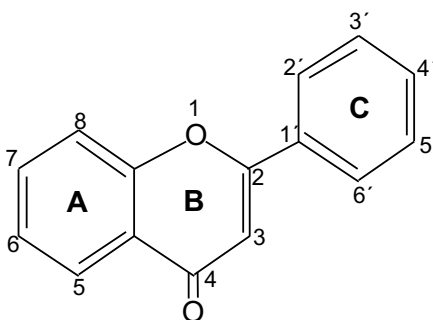


Figura 1. Estructura básica de los flavonoides.

La estructura básica de los ácidos fenólicos es C6-C1 y C6-C3, los primeros son derivados del ácido benzoico, como los ácidos salicílico y gálico, y los segundos son derivados del ácido cinámico, como los ácidos caféico y clorogénico (Figura 2). Los ácidos fenólicos son también muy abundantes en plantas (Ali y Neda, 2011).

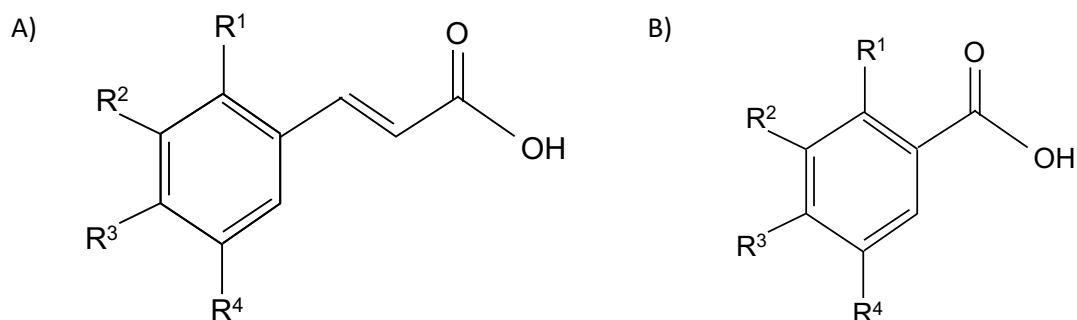


Figura 2. Estructura de ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico (A) y de los ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico (B).

2.1.5.2. Carotenoides

Los carotenoides son tetra terpenos, que se encuentran presentes en las plantas dando los colores anaranjados, rojos y amarillos (Kiokias *et al.*, 2016). Uno de los carotenoides con mayor distribución en el reino vegetal es el β -caroteno (Figura 3), el cual es el precursor de la vitamina A (Rao y Rao, 2007). Una de las principales funciones de los carotenoides es proteger las células vegetales de la oxidación, por lo tanto, son considerados como antioxidantes (Zakynthinos y Varzakas, 2016). También desempeñan funciones esenciales en el proceso de fotosíntesis, como compuestos captadores de luz y como parte de los complejos antena de transferencia de energía, y en el de fotoprotección de las plantas (Mirkovic *et al.*, 2017).

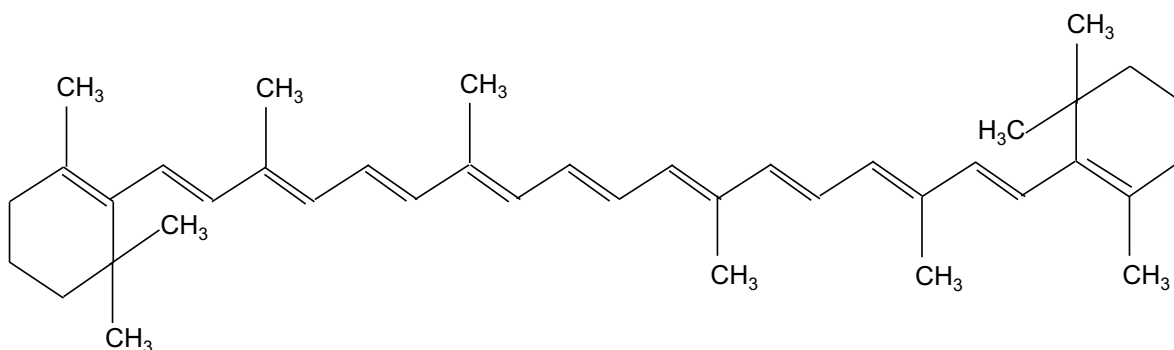


Figura 3. Estructura del β -caroteno

2.2. Epigenética

La regulación de la expresión de genes involucrados en la síntesis de los componentes de los mecanismos químicos y bioquímicos de las plantas contra el estrés salino obedece a la activación de esos genes. Esa activación depende mucho de los niveles de metilación presentes en ellos, principalmente en las regiones promotoras, los cuales son modulados por diferentes condiciones ambientales (Mirouze y Paszkowski, 2011). La regulación, no debida a cambios de secuencia en el ADN, de la expresión génica, por factores ambientales, es el objeto de estudio de la epigenética. Conrad H. Waddington en 1942 acuñó el término epigenética para referirse a la interacción entre el genotipo y fenotipo. La epigenética se define como los cambios heredables en la expresión génica en los cuales no están implicadas las modificaciones en la secuencia del ADN (Bonasio *et al.*, 2010). Los mecanismos epigenéticos participan en la respuesta del genoma a cambios ambientales (Duncan, 2014).

2.2.1. Procesos epigenéticos

Los procesos epigenéticos incluyen la modificación de las histonas, procesos de regulación mediados por moléculas de ARN-no codificante y la metilación del ADN (Meyer, 2015). Varios reportes indican que la metilación del ADN se encuentra implicada en la expresión de genes derivados de respuestas a diferentes tipos de

estrés en una amplia gama de especies vegetales como, por ejemplo, la sequía o el frío en arroz (Garg *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2011), la salinidad en *Arabidopsis*, trigo, arroz, y maíz (Bilichak *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 2009; Karan *et al.*, 2012; Tan, 2010), y metales pesados en arroz (Ou *et al.*, 2012).

2.2.2. Metilación del ADN

El proceso de metilación del ADN es ampliamente aceptado como un mecanismo de protección del genoma contra factores desfavorables que pueden alterar una secuencia de ADN (Bender, 1998). Consiste en la adición covalente de un grupo metilo ($-\text{CH}_3$) al carbono 5' de la citosina de una molécula de ADN (Figura 4), generalmente ocurre cuando se encuentra una citosina adyacente en 5' a una guanina, formando el dinucleótido CpG. Las regiones ricas en CG, entre el 60 y 70% de CG, se denominan islas CpG, suelen encontrarse en las regiones promotoras, por lo que están asociadas a sitios de inicio de la transcripción, reprimiéndola y afectando la expresión de los genes (Zhang *et al.*, 2006; Cokus *et al.*, 2008). Este proceso es mediado por las enzimas ADN-metiltransferasas (DNMTs por sus siglas en inglés).

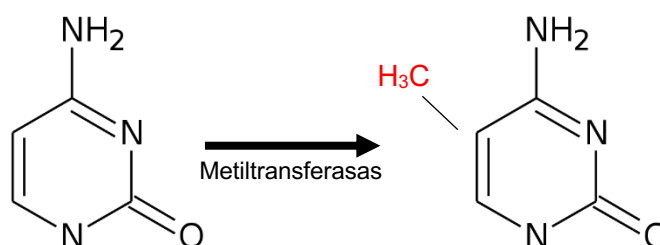


Figura 4. Metilación de la citosina

La metilación del ADN es un mecanismo epigenético frecuentemente presente en eucariotas, como animales, plantas y hongos (Varriale, 2014). En las plantas, el ADN se ha encontrado metilado en los sitios CpG, CpHG, y CpHH (H representa A, C, o T). Las plantas con un nivel reducido de metilación son capaces de crecer, desarrollarse y competir con otras por la disponibilidad de recursos (Yaish, 2013).

2.2.3. Técnica MSAP (Amplificación de Polimorfismos Sensibles a la Metilación)

Esta técnica permite obtener información sobre los niveles de citosinas metiladas. Es una modificación de la técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, por sus siglas en inglés), la cual utiliza dos enzimas de restricción, la *EcoRI* y la *MseI*. En el caso de la técnica MSAP la enzima *MseI* es sustituida por dos enzimas de restricción, las cuales son isoesquizómeros (*MspI* y *HpaII*) que reconocen el mismo sitio de restricción (5'-CCGG-3'), pero tienen diferente sensibilidad a la metilación de la citosina. Algunas ventajas de la técnica MSAP es que ha sido ampliamente utilizada en plantas y animales, es flexible, y relativamente de bajo costo (Fulneček y Kovařík, 2014).

El primer paso de la técnica MSAP consiste en la digestión del ADN en dos reacciones paralelas, cada una con una de las enzimas *HpaII* o *MspI*, combinandas con la enzima *EcoRI*, o bien en una reacción concombando ambos isoesquisómeros con *EcoRI*. Posteriormente, se realiza una ligación de adaptadores de secuencia conocida a los fragmentos que se obtuvieron en la digestión. Para la amplificación preselectiva por PCR, se incorporan nucleótidos selectivos, y los productos se utilizan como sustrato para una segunda amplificación conocida como amplificación (por PCR) selectiva, en la cual se utilizan cebadores con dos o tres nucleótidos selectivos. Los productos de PCR, se analizan mediante electroforesis en geles de acrilamida.

2.2.4. Contribución de la epigenética a la adaptación de las plantas ante el estrés

Actualmente se ha reportado que el epigenoma juega un papel crucial en la respuesta de las plantas al estrés, favoreciendo la adaptabilidad de las mismas, por medio de la activación o represión de genes. Estas modificaciones epigenéticas se quedan en la “memoria” de las plantas, ya que cuando surja otro evento adverso puedan responder eficientemente a estas condiciones, además estas modificaciones pueden transmitirse de generación en generación (Turgut-Kara *et al.*, 2020). La plasticidad fenotípica, floración temprana, cambios en la morfología de las hojas,

tamaño de la planta son resultado de los procesos epigenéticos, y es fundamental para la evolución de las especies (Zhang *et al.*, 2013).

2.3. *Physalis ixocarpa*

El género *Physalis* pertenece a la familia Solanaceae. Con entre 70 y 90 especies, *Physalis* es el quinto género más grande de la familia (Whitson y Manos, 2005). Sin embargo, no existe un consenso sobre el número de especies que forma el género, así, Martínez *et al.* (2011) estiman para *Physalis* 89 especies. El punto de acuerdo entre los diferentes autores es que México alberga el mayor número de especies del género y el mayor número de especies endémicas, por lo que México es considerado centro de origen y diversidad del género (D'Arcy, 1991; Vargas-Ponce *et al.*, 2015), además de centro de domesticación de algunas de las especies (Martínez, 1999; Álaves-Gómez *et al.*, 2009).

El género *Physalis* se distribuye desde Estados Unidos, México y Sudamérica, incluyendo las Antillas (Vargas-Ponce *et al.*, 2011) y solo una especie del género (*P. alkekengi*) se encuentra en Eurasia (Whitson y Manos, 2005). En México, de manera natural, el estado con más especies del género es Jalisco, con 35 (Vargas-Ponce *et al.*, 2003). En Durango, el número se estima en 20 (González-Elizondo *et al.*, 1991; González-Elizondo *et al.*, 2007).

Las especies de *Physalis* producen frutos comestibles, conocidos en México como tomate verde, tomate de cáscara, miltomatl, tomate de milpa, tomate de hoja, tomatillo o miltomate (Montes-Hernández *et al.*, 1994). La palabra tomate es de origen náhuatl (*ayachtomatl*), *ayacach (tli)*, significa sonaja o cascabel y *tomatl* significa tomate. Los frutos de varias especies del género son comestibles y han estado asociados de manera histórica, cultural, y alimenticia con los pueblos de México desde tiempos prehispánicos (Hernández y Yañez, 2009).

Existen 16 taxa de *Physalis* que son ampliamente consumidos en México durante todo el año, o utilizados con fines ornamentales o medicinales (Martínez 1998). Sin embargo, la especie cultivada en México es *Physalis ixocarpa*. El tomate de cáscara ha tenido gran auge por lo que se han desarrollado nuevas variedades con las características que requieren los diferentes mercados. México cuenta con 11 variedades de *Physalis ixocarpa* registradas según el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS): Diamante, Manzano, Tepetlixpa, Milpero Tetela, Potrero, Puebla SM3, Rendidora, Salamanca, Tamazula SM3, Tecozautla 04, Yema de Huevo, y CHF1 Chapingo (SNICS, 2012). Una de las variedades mayormente utilizadas para la producción de tomatillo es Rendidora, por lo cual es considerada una de las variedades más importantes (Cruz-Álvarez *et al.*, 2012).

2.3.1. Importancia comercial de *Physalis ixocarpa* en México

El tomate de cáscara es una de las principales hortalizas que se cultivan en México para la venta interna y la exportación. El tomate verde ocupó el quinto lugar de producción en México, entre las hortalizas producidas en 2011 (SIAP, 2012). De acuerdo al SIAP (2018), en México, en 2018, se obtuvo una producción de 421 769 Ton del tomate de cáscara, siendo los estados con mayor producción Sinaloa, Sonora, Nayarit, Jalisco y Michoacán (155 732, 42 195, 40 361, 24 918, 24 250 Ton, respectivamente). Actualmente el tomate de cáscara se cultiva en 27 de los 32 estados de la República Mexicana, además como especie introducida se cultiva en algunos países asiáticos y europeos (Khan *et al.* 2016; Naumova *et al.* 2019).

En México, debido al incremento en su demanda, se busca expandir las áreas de cultivo (Valdivia-Mares *et al.*, 2016). Regiones áridas y semiáridas cubren más de la mitad del territorio del país (Pérez-Aguilar *et al.*, 2021); sin embargo, diferentes factores han ocasionado que estas regiones estén siendo particularmente afectadas por la salinidad, la cual está entre los principales factores abióticos que limitan la productividad vegetal (Cuong *et al.*, 2020). En este marco, se vuelve relevante realizar estudios sobre las respuestas de *P. ixocarpa* a la salinidad.

El tomate de cáscara es un cultivo con alto valor nutricional, posee ácido ascórbico, vitamina C, vitamina K, niacina, magnesio, calcio, fósforo y fierro además es una fuente de fibra (1.5 - 4.3 %) para el organismo (Bock *et al.*, 1995; Ayala, 1992). Otras cualidades que se le atribuyen a algunas especies de *Physalis* son sus propiedades ornamentales y curativas o medicinales, ya que es utilizada para tratar infecciones respiratorias, desórdenes intestinales, gripa, fiebre, amigdalitis y diabetes (Caceres *et al.*, 1991; Dimayuga *et al.*, 1996; Argueta, 1994). Sin embargo, estas características son escasamente conocidas y aprovechadas. Dos estudios enfocados a conocer estos aspectos son el de Medina-Medrano *et al.* (2015), quienes reportaron importantes contenidos de compuestos fenólicos antioxidantes para los frutos, cálices, y hojas de seis especies de *Physalis*, y el de Cobaleda-Velasco *et al.* (2017a), quienes determinaron la variación de la composición fenólica y propiedades antioxidantes de diferentes partes de *P. angulata*, una especie comestible, en proceso de domesticación, con un importante potencial de cultivo (Vargas-Ponce *et al.*, 2015), en cuatro estados de desarrollo.

2.3.2. Características botánicas y etapas de crecimiento de *Physalis ixocarpa*

El tomate de cáscara o tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.) (Figura 5) es una especie anual, de 0.9 a 1.2 m de altura, el tallo es glabro, herbáceo o ligeramente leñoso en la base. Las hojas son delgadas compuestas, ovalas, lanceoladas, entre 5 y 7.5 cm de largo, dentadas y con peciolo largo de textura suave. Las flores son bisexuales, perfectas y hermafroditas, abiertas de 1.8 cm de diámetro, con bordes amarillos brillantes, monopétalas con corola, presentan cinco manchas de color pardo negruzco, las anteras son púrpuras; por lo general las flores están sobre pedicelos axilares, el cáliz es pentadentado, tiene cinco estambres; el estilo es delgado; el estigma casi bilobulado. El fruto es una baya amarilla o verdosa, mide de 1 a 5 cm de diámetro globoso, liso, cubierto por el cáliz avejigado (Taboada y Oliver, 2004). Ramírez *et al.* (2013) desarrollaron una escala fenológica para *Physalis peruviana* L., la cual podría aplicarse a otras especies del género. Estos autores presentan cuatro etapas de crecimiento: la etapa 1 (GS1 por sus siglas en inglés *Growth Stage*) se

presenta a los 25 días de edad de la planta y presenta el primer par de hojas (GS-102 de acuerdo con la escala BBCH (*Biologische Bundesanstalt Bundessortenamt and Chemical*)); la etapa de desarrollo 2 (GS2) se presenta a los 42 días de edad de la planta y su característica es que las plantas presentan floración temprana (GS entre 602 y 608 de acuerdo a la escala BBCH); la etapa de desarrollo 3 (GS3) se presenta a los 57 días de edad de la planta, las plantas presentan mucho follaje floración tardía y frutos inmaduros (GS 701 de acuerdo a la escala BBCH), y finalmente la etapa de desarrollo 4 (GS4), que se presenta a los 115 días de edad de la planta, ésta presenta frutos maduros y se encuentra en declive (GS entre 806-809 de acuerdo a la BBCH).

La clasificación taxonómica del tomate de cáscara es la siguiente:

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Physalis*

Especie: *P. ixocarpa*

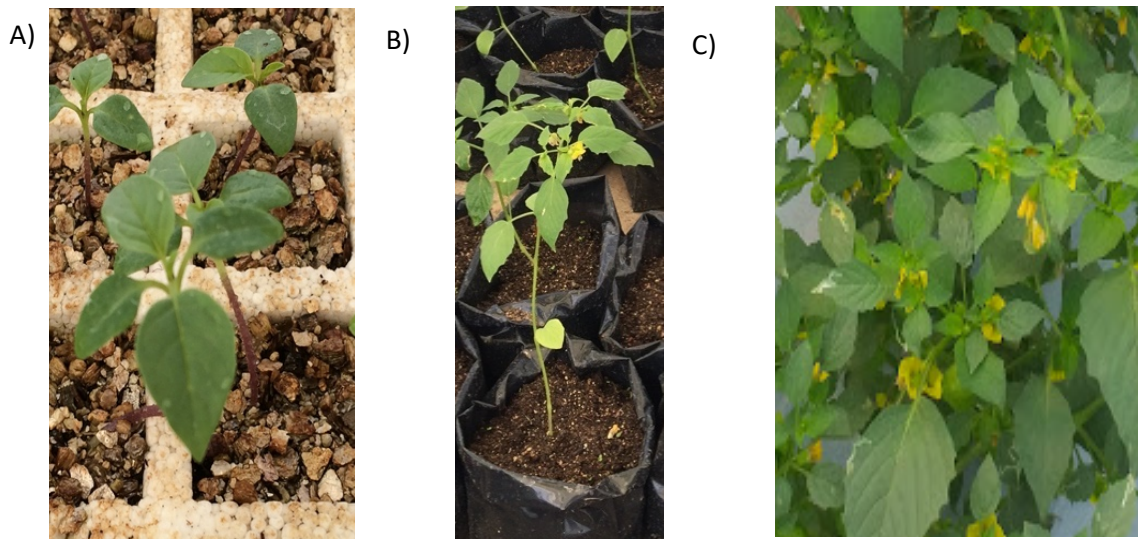


Figura 5. Plantas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*). A): Etapa de crecimiento GS1; B): Etapa de crecimiento GS2; C): Etapa de crecimiento GS3

2.3.3. Metabolitos encontrados en el género *Physalis*

En el género *Physalis* se ha reportado una gran variedad de metabolitos secundarios, los cuales se utilizan principalmente con fines medicinales, ya que presentan actividades antimicrobianas, antibacterianas, antiinflamatorias, entre otras actividades (González-Mendoza *et al.*, 2010; Khan *et al.* 2016). Algunos de los compuestos fenólicos bioactivos encontrados en este género son flavonoides, quinonas, taninos, y ácidos fenólicos, entre los cuales se encuentran el ácido tartárico, ascórbico, cafeico, y cumárico, entre otros (Cobaleda-Velasco *et al.*, 2017a; Medina-Medrano *et al.*, 2015; Nathiya y Dorcus, 2012).

También se han encontrado derivados terpénicos, tales como carotenos (Cantwell *et al.*, 1992), witanólidos, y fisalinas (Vasina *et al.*, 1986; Drost-Karbowska *et al.*, 1993). Witanólidos y fisalinas son esteroides lactónicos (Glotter, 1991), las últimas representando un estado altamente oxidado de los primeros (Makino *et al.*, 1995). En contraste con *P. peruviana*, la especie sudamericana cultivada del género, para la cual ha habido un número importante de estudios sobre su composición fitoquímica (por ejemplo, Gautam *et al.*, 2015; Narváez-Cuenca *et al.*, 2014; Maruenda *et al.*, 2018; Kasali *et al.*, 2021; Kasali *et al.*, 2022; Kathare *et al.*, 2021; Vaillant *et al.*, 2021; Monroy-Velandia y Coy-Barrera, 2021), la exploración de la composición fitoquímica de *P. ixocarpa* ha sido menos abordada, entre los trabajos hechos están los de Cobaleda-Velasco *et al.* (2017b) y Hernández-Pacheco *et al.* (2022), por lo que existe aún un importante vacío de conocimiento sobre este aspecto para la especie.

2.3.4. Salinidad y *Physalis ixocarpa*

La tolerancia a la salinidad depende en mucho del genotipo, de la especie o cultivar (Santa-Cruz *et al.*, 2002; De León *et al.*, 2015). Existen plantas tolerantes, moderadamente tolerantes, moderadamente sensibles, y plantas muy sensibles. *Physalis* se considera glicófita, como la mayoría de los cultivos hortícolas, y generalmente se cree que tiene poca o nula tolerancia a la salinidad (Gratt y Grieve,

1999). Muchas de las especies de *Physalis* crecen como especies asociadas a cultivos principales, dentro de los sistemas agrícolas que en México se llaman milpa, por lo que se considera que han desarrollado características de adaptación y resistencia a condiciones adversas (Hernández y Yáñez, 2009). Sin embargo, a pesar de su importancia como planta comestible y medicinal, existen pocos estudios enfocados a explorar las diferentes respuestas de la especie al estrés salino, entre ellos están el de Esringü *et al.* (2011) y el de Rosas-Medina *et al.* (2020). Esto contrasta con el número de trabajos realizados para la especie del mismo género económicamente importante en la región andina del continente americano, *Physalis peruviana*, la cual ha sido más estudiada (Miranda *et al.* 2010a; Miranda *et al.* 2010b; Miranda *et al.* 2014; de Souza *et al.* 2014; Cebeci y Hanci 2015; Celikli *et al.* 2017); sin embargo, los estudios hechos se han centrado principalmente sobre las respuestas morfológicas y fisiológicas, dejando de lado las respuestas químicas y bioquímicas.

3. JUSTIFICACIÓN

El cambio climático está provocando un aumento de suelos salinos a nivel mundial, principalmente en las regiones áridas y semiáridas. En México, este tipo de regiones comprende más de la mitad de su territorio y la salinidad es considerada como uno de los factores que provoca más pérdidas económicas en la producción de alimentos de origen vegetal. El aumento de la demanda de tomatillo en el país busca expandir el área de cultivo de la especie. Por tal razón, el desarrollo de variedades adaptadas a suelos salinos es de gran relevancia. Para lograr esto, es necesario realizar estudios como el presente para entender los mecanismos de protección que *Physalis ixocarpa* es capaz de desarrollar bajo condiciones salinas, ya que es una especie rica en nutrientes y compuestos bioactivos, muy arraigada de manera cultural y alimenticia a las diferentes culturas de México desde tiempos precolombinos, y muy poco estudiada por su respuesta a este tipo de estrés.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar el efecto del estrés salino sobre las características morfométricas, la composición fenólica, la actividad de enzimas del estrés oxidativo, y los niveles de metilación genómica en hojas de *Physalis ixocarpa* var. Rendidora en tres tiempos de exposición, en condiciones de invernadero.

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar los cambios morfológicos (longitud de la planta, largo y ancho de hoja, longitud de la raíz) causados por estrés salino en *P. ixocarpa* var Rendidora en tres tiempos de exposición (24, 42, y 57 días).
2. Determinar la variación de la composición fenólica foliar de *P. ixocarpa* var. Rendidora en respuesta a estrés salino, por medio de métodos espectrométricos (UV-visible), y de HPLC-DAD.
3. Determinar las variaciones en las actividades de enzimas antioxidantes (CAT y SOD) y contenidos de prolina provocadas por estrés salino en hoja de *P. ixocarpa* var Rendidora en tres estados de desarrollo.
4. Determinar los cambios de los niveles de metilación del ADN, usando el método MSAP, en hojas de *P. ixocarpa* var Rendidora provocados por estrés salino en tres estados de desarrollo.

5. METODOLOGÍA

5.1. Material vegetal y tratamientos salinos

Semillas de *Physalis ixocarpa* var. Rendidora fueron germinadas en un invernadero ubicado en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional unidad Durango del Instituto Politécnico Nacional (CIIDIR-IPN Durango, México (24° 3' 5" N, 104° 36' 34" W), utilizando charolas de poliestireno con turba-agrolita (8:2) como sustrato. Después de 45 días, las plantas fueron trasplantadas a bolsas de 6 L con sustrato de lombricomposta. Después de la aparición de las hojas verdaderas (ocho días después de la germinación, que correspondió a una germinabilidad de 100%), las plántulas fueron sometidas a los diferentes tratamientos salinos, los cuales se muestran en la Tabla 1. Las plantas de los tratamientos control recibieron solución nutritiva (nitrato de potasio, 0.50 g/L; nitrato de calcio, 0.70 g/L; nitrato de magnesio, 0.20 g/L; fosfato de amonio, 1.00 g/L; sulfato de potasio, 0.50 g/L; y micronutrientes 0.20 g/L) tres días/semana. Los lotes experimentales estuvieron formados por 30 plantas. Las colectas se hicieron de acuerdo a los tratamientos, a los 24, 42 y 57 días, que corresponden a las etapas de crecimiento GS1, GS2 y GS3.

Las temperaturas mínimas y máximas en el invernadero variaron entre 14.9 y 17.7 °C, y 33.5 y 46.7 °C, respectivamente, durante todo el estudio. El fotoperiodo diario fue de 13 h.

Tabla 1. Tratamientos salinos a los que se sometió a *Physalis ixocarpa*.

Tratamiento	Concentración de NaCl	Tiempo de Exposición
	(mM)	(Días)
C-24D	0	24
90-24D	90	24
120-24D	120	24
C-42D	0	42
90-42D	90	42
120-42D	120	42
C-57D	0	57
90-57D	90	57
120-57D	120	57

0 mM de NaCl correspondió a una conductividad eléctrica de 0.96 dS/m, 90 mM a 10.35 dS/m, y 120 mM a 14.04 dS/m.

5.2. Medición de las variables morfométricas

Se registraron cuatro características morfométricas: altura de la planta desde la base del tallo hasta el nudo más joven del tallo, largo y ancho de hoja y largo de raíz. Estas medidas fueron tomadas utilizando un vernier (Surtek, 0-150mm; 122200). Los registros se hicieron para 15 plantas seleccionadas al azar por cada tratamiento.

5.3. Preparación de los extractos fenólicos

Para la preparación de extractos fenólicos se utilizó tejido foliar seco y molido de *Physalis ixocarpa* var. Rendidora (3 g) sometidos a diferentes tratamientos salinos (Tabla 1). El tejido foliar se maceró en etanol al 80% (v/v) por 24 h en agitación (100 rpm). Posteriormente, los extractos fueron centrifugados a 6000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue recuperado y el precipitado fue extractado nuevamente bajo las condiciones antes mencionadas. Los sobrenadantes de una misma muestra fueron mezclados para formar el extracto crudo. Los extractos crudos se concentraron a

sequedad y se resuspendieron en el volumen de etanol requerido para una concentración de 100 mg/mL, para su posterior análisis.

5.4. Determinación del contenido de fenoles totales (TP)

En el presente estudio se exploraron los impactos de diferentes tratamientos salinos sobre las características químicas y bioquímicas de las hojas de *P. ixocarpa* debido a que éstas son las partes en donde se llevan a cabo importantes procesos bioquímicos y fisiológicos para el desarrollo de la planta. Para determinar el contenido de fenoles totales se utilizó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu reportado por Singleton y Rossi (1965). A 200 µL de extracto crudo se adicionó 1 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10 diluido en agua destilada), la mezcla se dejó reposar durante 4 minutos y posteriormente se agregaron 800 µL de una solución saturada de carbonato de sodio (75 g/L). Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se registró la absorbancia a 765 nm. El ácido gálico fue utilizado como estándar para la construcción de una curva de calibración en concentraciones de 25, 50, 100 y 200 mg/L ($Abs_{765} = 11.246 [\text{ácido gálico}] - 0.0189$, $r = 0.9998$). La concentración de fenoles totales fue expresada como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg GAE/g ES).

5.5. Determinación de taninos condensados (TCT)

El contenido de taninos condensados se realizó siguiendo la metodología descrita por Julkunen-Tiitto (1985). Se utilizaron 125 µL de extracto crudo que se mezclaron con 750 µL de una solución de vainillina al 4%, la cual fue disuelta con metanol absoluto, finalmente, a esta mezcla se agregaron 375 µL de ácido clorhídrico concentrado. Se dejó reposar por 20 minutos en oscuridad, la absorbancia se registró a 500 nm. El contenido de taninos condensados se estimó a partir de una curva estándar construida con cinco concentraciones (12.5, 25, 50 y 100 mg/L) de epicatequina ($Abs_{500} = 2.1932 [\text{epicatequina}] + 0.015$, $r = 0.9949$). Los resultados se

expresaron en miligramos equivalentes de epicatequina por gramo de peso seco (mg EE/g ES).

5.6. Determinación de los perfiles fenólicos por medio de HPLC-DAD y contenidos de flavonoides (TF) y ácidos fenólicos (PA)

Los análisis de HPLC-DAD se realizaron para extractos enriquecidos en fenoles, los cuales se prepararon fraccionando con acetato de etilo cada uno de los extractos crudos (1:1 v/v), recuperando y concentrando a sequedad las fases orgánicas, y resuspendiéndolas en el volumen de metanol requerido para una concentración de 100 mg/mL. Los análisis se hicieron en un equipo Perkin Elmer Flexar, utilizando el método de gradiente descrito por Campos y Markham (2007), con una columna Perkin Elmer Brownlee Analytical C18 (4,6 × 250 mm, 5 µm). Los cromatogramas se registraron a 260 y 340 nm, mientras que los espectros UV de los picos resueltos se registraron entre 200 y 400 nm, utilizando un detector de arreglo de diodos (DAD) Perkin Elmer Flexar. El volumen de inyección fue de 100 µL y la velocidad de flujo fue de 0.8 mL/min.

La información estructural de los picos resueltos en los cromatogramas se obtuvo interpretando los espectros UV de acuerdo a Campos y Markham (2007) para flavonas, flavonoles y ácidos fenólicos, así como comparando el tiempo de retención (RT) y λ_{max} de los compuestos resueltos en los cromatogramas con los de los siguientes estándares: ácido cafeico (RT: 22.55 min; λ_{max} : 296sh, 325), ácido ferúlico (RT: 34.89 min; λ_{max} : 239sh, 296sh, 324), y rutina (quercetina-3-O-[rhamnosil(1-6)-glucósido], RT: 32.33 min; λ_{max} : 256, 264sh, 294sh, 356). Las concentraciones de los compuestos principales se estimaron mediante un método de estándar externo, por mediciones de área bajo la curva, y utilizando una curva estándar de rutina (pendiente: 6564.40, intercepción: 127.33, $r = 0.9965$) para los flavonoides, y una curva estándar de ácido cafeico (pendiente: 39870.00, intercepción: 6372.9, $r = 0.9985$) para los ácidos fenólicos y sus derivados. El contenido de cada compuesto se expresó en microgramos por gramo de extracto seco (µg/g ES). El contenido total de flavonoides se estimó sumando las concentraciones individuales de flavonoides en una muestra,

mientras que el contenido total de ácidos fenólicos se estimó sumando las concentraciones individuales de ácidos fenólicos en una muestra. Las concentraciones se expresaron en miligramos por gramo de extracto seco (mg/g ES).

5.7. Determinación de carotenoides (CR)

El contenido de carotenoides en las diferentes muestras se determinó de acuerdo a Scott (2001). Se utilizaron 20 mg de hojas secas y molidas, a las cuáles se añadieron 100 μ L de agua destilada y 1.5 mL de una solución de hexano-acetona-metanol (2:1:1). La mezcla se maceró durante 20 minutos y posteriormente se centrifugó durante 5 min a 6000 rpm y a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y el precipitado se re-extractó con hexano en las condiciones antes mencionadas. Ambos sobrenadantes fueron mezclados y se registró la absorbancia a 460 nm. Se construyó una curva estándar con seis concentraciones (0.1, 0.2, 0.4, 0.6 0.8 y 1 mg/mL) de β -caroteno (β -C) ($Abs_{460} = 0.6472 [\beta\text{-caroteno}] - 0.0036$, $r = 0.9999$) para estimar la concentración de carotenoides en las muestras. Los resultados se expresaron como microgramos de equivalentes de β -caroteno por gramo de tejido seco (μ g E β -C/gTS).

5.8. Actividad bloqueadora del radical DPPH

El ensayo de DPPH• (1,1-difenil-2- picrilhidrazil) se realizó según el método de Brand-Williams *et al.* (1995). Se preparó una solución de DPPH• a 6×10^{-5} M en etanol absoluto. Se añadieron 1950 μ L de esta solución a 50 μ L de extracto fenólico crudo, se agitó vigorosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 30 min. Finalmente, se registró la absorbancia a 515 nm. La actividad antirradical se expresó como EC₅₀ (mg/mL), que representa la concentración de extracto necesaria para disminuir el 50 % de la concentración inicial de DPPH•.

5.9. Determinación del poder reductor de fierro (PR)

La determinación del poder reductor del fierro se llevó a cabo según Berker et al. (2007) Se tomó una alícuota de 250 μ L de extracto fenólico crudo (0.5 mg/mL) y se le añadieron 250 μ L de regulador de fosfatos (pH 6.6) y 250 μ L de ferrocianuro potásico 1% (p/v). La mezcla se dejó incubar durante 20 minutos a 50 °C y luego se añadieron 250 μ L de ácido tricloroacético al 10% (p/v). La mezcla se centrifugó a 2800 rpm durante 10 minutos a 25 °C. Se tomaron 500 μ L del sobrenadante y se añadieron 500 μ L de agua desionizada y 100 μ L de cloruro férrico. Se registró la absorbancia de la muestra a 700 nm. A mayor valor de absorbancia, mayor poder reductor.

5.10. Actividades de enzimas antioxidantes

Para los ensayos de las enzimas antioxidantes se prepararon extractos enzimáticos de las hojas de tomatillo (0.5 g) se molieron en un mortero con 4 mL de regulador de fosfatos KPi (50 mM) (pH 7.0), que contenía 0.0268 M de K_2HPO_4 , 0.0232 M de KH_2PO_4 , 2 mM de EDTA, y 2% (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP). El homogeneizado se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos, a 4°C. La cantidad de proteína en los extractos se cuantificó con el método de Bradford (1976), utilizando albúmina de suero bovino para construir la curva estándar. Los extractos proteicos se utilizaron para determinar las actividades de catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD).

5.10.1. Catalasa (CAT)

Para determinar la actividad de CAT se utilizó un método que registra la descomposición del H_2O_2 en presencia de oxígeno y agua (Lück, 1965; Sarker y Oba 2018). Se añadieron 30 μ L de extracto enzimático a 3 mL de regulador de fosfatos (50 mM de KH_2PO_4 y $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$), y se añadieron 4.8 μ L de peróxido de hidrógeno al 30%. Con la adición de peróxido de hidrógeno se inició la reacción, inmediatamente

se registró la absorbancia de la muestra a 240 nm (absorbancia inicial), esta lectura se tomó como tiempo cero, después de un minuto se volvió a registrar la absorbancia a 240 nm (absorbancia final). La actividad se expresó como unidades de catalasa por gramos de proteína (U CAT/g de proteína), de acuerdo a la ecuación:

$$1U = \frac{100k}{0.693}$$

Donde:

$$k = \frac{2.3}{t \text{ (seg)}} \log \frac{Abs_{inicial}}{Abs_{final}}$$

t: tiempo

Abs: absorbancia

U: unidad

5.10.2. Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de SOD se ensayó mediante el método NBT (Azul de Nitro-tetrazolio) (Beauchamp y Fridovich, 1971), el cual es un compuesto amarillo que es reducido a azul de monoformazan por el radical superóxido. Por separado y para cada muestra, se combinaron 200 µL de extracto enzimático con 800 µL de regulador de fosfatos de sodio 50 mM pH 7.8 (0.0578 M de Na₂HPO₄•7H₂O, 0.0422 mM de NaH₂PO₄H₂O pH 7.8, 2 mM EDTA, 9.9 mM L-metionina, 55 µM NBT, 0,025 % tritón), se añadieron 10 µL de riboflavina (0.1 mM). Una combinación se incubó durante 3 min bajo luz blanca y la otra, también 3 min, en oscuridad. Después de ese tiempo se registró la absorbancia de ambas combinaciones a 560 nm. La actividad se expresó como unidades de SOD por gramo de proteína (U SOD/g proteína), de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\text{Unidades SOD} = \frac{Abs_{\text{blanco}} - Abs_{\text{luz}}}{Abs_{\text{blanco}}} \times 100$$

Donde:

$$Abs_{\text{blanco}} = Abs_{\text{Blanco luz}} - Abs_{\text{Blanco oscuridad}}$$

$$Abs_{\text{muestra}} = Abs_{\text{Muestra luz}} - Abs_{\text{Muestra oscuridad}}$$

Abs: absorbancia

1 Unidad SOD = 50% de inhibición

5.10.3. Determinación de prolina

El contenido de prolina en las hojas se determinó según Bates *et al.* (1973 y Sarker y Oba, 2018). Muestras de hojas (0.5 g) se homogeneizaron en un mortero con 10 mL de ácido sulfosalicílico al 3% en solución acuosa. El homogeneizado se hizo reaccionar con 2 mL de ninhidrina y 2 mL de ácido acético glacial durante 1 hora a 100 °C. La reacción se terminó con un baño de hielo. Posteriormente se añadieron 4 mL de tolueno y se agitó vigorosamente. La mezcla se dejó reposar durante 5 min para la separación de las fases orgánica y acuosa. Se registró la absorbancia a 520 nm de la fase orgánica, la cual contenía el cromóforo. Tolueno se usó como blanco. Los contenidos se estimaron a partir de una curva estándar de prolina ($Abs_{520nm} = 1.4946 [L\text{-Prolina}] + 0.023$, $r = 0.9939$) y se expresaron como microgramos de prolina por gramo de tejido fresco (μg de Prolina/g TF)

5.11. Análisis epigenéticos

5.11.1. Polimorfismos de amplificación sensibles a la metilación (MSAP)

Para la determinación de los polimorfismos se siguió el protocolo de Gutiérrez-Velázquez *et al.* (2018), el cual está basado en el de Lira-Madeiras *et al.* (2010), utilizando las combinaciones de enzimas de restricción *EcoRI/MspI* y *EcoRI/HpaII* separadamente. Este análisis se realizó únicamente para los tratamientos control y 120 mM de NaCl de los tres tiempos de exposición (Tabla 1).

5.11.2. Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó para tres individuos por tratamiento, y se llevó a cabo de acuerdo a Henriquez (2000) con algunas modificaciones. Tejido foliar (100 mg) de *Physalis ixocarpa* var Rendidora se homogeneizó en 600 µL de buffer de extracción (0.5 M NaCl, 0.2 M Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 2% de CTAB y 1% de 2-mercaptoetanol) y se incubó durante 1 h en baño maría a 65 °C. Posteriormente, cuando la mezcla enfrió hasta temperatura ambiente, se adicionó un volumen igual de cloroformo, se agitó y se centrifugó a 12 000 rpm por 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se adicionaron 600 µL de isopropanol frío, se incubó a -20 °C durante 30 min, y se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 min. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol frío al 70%, se centrifugó por 5 min a 12 000 rpm, se repitió este lavado y se permitió la evaporación completa del etanol.

5.11.3. Digestión

Cada muestra de ADN se sometió a dos digestiones independientes, una para cada combinación de enzimas de restricción *EcoRI/MspI* y *EcoRI/HpaII*.

Para ambas digestiones se utilizaron 3.5 µL de ADN, combinado con 0.5 µL de la enzima *EcoRI* (6 U) (Promega®), 0.1 µL de BSA (0.05 mg/mL), 5 µL de buffer Multicore (1X), y 0.5 µL de la enzima *HpaII* (5 U) (Promega®) o 0.5 µL *MspI* (5 U) (Promega®),

en un volumen final de 20 μL . Para llevar a cabo la digestión se incubaron las muestras a 37°C durante 3h.

5.11.4. Ligación

La ligación del ADN se realizó utilizando adaptadores de secuencia conocida (Tabla 2).

Tabla 2. Adaptadores MSAP utilizados para la ligación del ADN

Secuencias <i>EcoRI</i>	Secuencias <i>HpaII/MspI</i>
5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'	5'-GATCATGAGTCCTGCT-3'
3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'	3'-AGTACTCAGGACGAGC-5'

El ADN digerido se mezcló con 0.3 μL de T4 ADN Ligasa (0.9 U) (Promega®), 3 μL de T4 ADN buffer ligasa (1X) (Promega®), 1 μL de adaptador *EcoRI* (5 pmol), 1 μL del adaptador *MspI/HpaII* (50 pmol), en un volumen final de 30 μL . La mezcla se incubó 24 h a temperatura ambiente.

5.11.5. Preamplificación

Se utilizaron 2 μL de ADN ligado combinado con 1 μL de MgCl_2 (Promega®) (25 mM), 0.63 μL de primer *EcoRI* (10 μM), 0.52 μL de primer *MspI/HpaII* 10 μM), 0.4 μL de Taq polimerasa (Promega®) (2 U), 4 μL de buffer PCR (Promega®) (1X), y 0.8 μL dNTPs (Promega®) (0.4 mM), en un volumen final de 20 μL . Las condiciones de preamplificación fueron 25 ciclos de 94 °C durante 1 min, 56 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min y, finalmente, un paso de extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos de preamplificación se combinaron con 200 μL de agua inyectable y se almacenaron a -20 °C. La secuencia de los primers *EcoRI* y *MspI/HpaII* se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Primers utilizados para la preamplificación

Secuencias <i>EcoRI</i>	Secuencias <i>HpaII/MspI</i>
5'- GACTGCGTACCAATTC-3'	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGG-3'

5.11.6. Amplificación selectiva

Cada uno de los tres primers selectivos de *EcoRI* (Tabla 4) se combinaron con cada uno con los dos primers selectivos de *MspI/HpaII* (Tabla 4), generando seis combinaciones de primers selectivos. Cada combinación se analizó de manera independiente. Se combinaron 5 µL de ADN preamplificado, 1 µL de MgCl₂ (25 mM) (Promega®), 0.4 µL de dNTPs (0.2 mM), 4 µL de buffer PCR (1X) (Promega®), 0.4 µL de Taq polimerasa (2 U) (Promega®), en un volumen final de 20 µL. Las condiciones de amplificación fueron 12 ciclos de 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s, disminuyendo la temperatura de alineamiento en 0.7 °C por ciclo durante cada uno de los 12 ciclos, y 72 °C durante 1 min. Posteriormente, se realizaron 24 ciclos de 94 °C durante 30s, 56 °C por 1 min, 72 °C por 2 min, y un paso de extensión final de 72 °C por 5 min. Los productos de amplificación selectiva se separaron en geles de acrilamida (6%), los cuales se tiñeron con Sybr Gold (Promega®).

Tabla 4. Primers utilizados para la amplificación selectiva

Secuencias <i>EcoRI</i>	Secuencias <i>HpaII/MspI</i>
5'- GACTGCGTACCAATTC AG -3'	5'- ATCATGAGTCCTGCTCGGT CAA -3'
5'- GACTGCGTACCAATTC AAC -3'	5'- ATCATGAGTCCTGCTCGG AAT -3'
5'- GACTGCGTACCAATTC AT -3'	

5.12. Análisis de datos

Los datos morfométricos, químicos, y bioquímicos se registraron para tres submuestras (réplicas) de cada muestra y se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) ($p \leq 0.05$). La discriminación de medias se realizó con la prueba de Duncan,

usando el programa de cómputo R-Studio. La correlación entre los diferentes atributos evaluados se determinó con la prueba de Pearson ($p \leq 0.05$), con el programa R-Studio. Para determinar la contribución de cada atributo morfométrico, químico, y bioquímico a la discriminación de las plantas de cada tratamiento, los diferentes datos se sometieron de manera independiente a análisis de componentes principales (ACP), mientras que para determinar la similitud morfométrica, química, y bioquímica, cada tipo de datos se sometió a análisis de agrupamiento, usando el programa Past 4.07b. Para determinar el efecto de la concentración de sal y del tiempo de exposición sobre cada tipo de atributo químico y bioquímico evaluado, se realizaron análisis de correspondencia canónica (ACC), usando Past 4.07b.

Con los datos epigenéticos, visualizados en los geles de acrilamida como bandas claramente resueltas, se construyeron matrices binarias de presencia (1)/ausencia(0) de sitios amplificados, las cuales sirvieron para estimar los loci metilados en el contexto 5'-C5mCGG-3', los loci no metilados, así como los loci hemimetilados (Tabla 5). Los datos se sometieron a análisis de varianza ($p < 0.05$), discriminando las medias con la prueba de Duncan. Con las mismas matrices, sometidas al programa Popgen 1.32, se calculó la variabilidad epigenética de las plantas dentro y entre tratamientos. Para determinar los principales loci que contribuyeron a la discriminación entre tratamientos, las matrices se sometieron a ACP y para determinar la similitud epigenética, las mismas matrices se sometieron a análisis de agrupamiento, usando el programa Past 4.07b. La correlación entre los diferentes tipos de caracteres se estimó con la prueba de Pearson ($p < 0.01$).

Tabla. 5. Interpretación de la sensibilidad de *MspI* y *HpaII* al estado de metilación

	Combinación <i>EcoRI/MspI</i>	Combinación <i>EcoRI/HpaII</i>
Loci metilados (5'-C5mCGG-3')	+	-
Loci no metilados (5'-CCGG3')	+	+
Loci hemimetilados	-	+

+ :Presencia; - :Ausencia (Salmón *et al.*, 2008).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Efecto de la salinidad en las características morfométricas de *Physalis ixocarpa* var Rendidora

La variación en las características morfométricas de plantas de *Physalis ixocarpa* sometidas a estrés salino se pueden apreciar en la Tabla 6. En los 24 días de exposición a la sal, las plantas de los tratamientos salinos desarrollaron mayor altura, longitud y anchura de hoja, pero no longitud de raíz, que las plantas de su respectivo control. Después de 42 días de exposición, las plantas de los tratamientos salinos alcanzaron también mayor talla y desarrollaron hojas más grandes que las plantas de su respectivo control; sin embargo, después de este tiempo de exposición, el desarrollo de la raíz fue estimulado por la concentración de sal de 120 mM, comparado al de las plantas control y de las del tratamiento moderado de sal. Contrariamente, la exposición a concentraciones moderada (90 mM) y severa (120 mM) de sal después de un tiempo más prolongado (57 días) no estimuló el crecimiento aéreo de las plantas de tomatillo; sin embargo, la concentración severa estimuló el desarrollo de la raíz en un 18% con respecto a la raíz de las plantas control, y en 31% con respecto a la raíz de las plantas del tratamiento bajo concentración moderada de sal. Los resultados del presente trabajo estuvieron de acuerdo con los publicados por Qados (2011), quien informó que plantas de *Vicia faba* a 10 días de tratamiento salino (NaCl) presentaron un incremento en la altura a concentraciones de 60 y 120 mM y un decremento de la altura a una concentración más alta (240 mM). Sin embargo, para otras especies, incluida una del mismo género que el tomatillo, han respondido de manera diferente, tales como tomate (*Solanum lycopersicum*) (Mohammad *et al.*, 1998), *Phaseolus vulgaris* (Taïbi *et al.*, 2016), y *Physalis angulata* (de Souza *et al.*, 2016).

Los resultados encontrados en el presente estudio sugieren que las plantas de tomatillo en las primeras etapas de crecimiento, que corresponden a 24 y 42 días de exposición, reaccionan favorablemente al estrés salino presentando algún mecanismo

de protección que les ayuda al ajuste osmótico, como ha sido propuesto para *Vicia faba* (Qados, 2011) y, por lo tanto, a desarrollarse. La reducción de crecimiento de la parte aérea de las plantas de tomatillo, observado en el día 57, puede deberse al agotamiento de los mecanismos de protección, como consecuencia de la saturación con NaCl que inhibe las cascadas de señalización de hormonas del crecimiento y absorción de nutrientes, entre otros mecanismos necesarios para el crecimiento. El desarrollo de la raíz bajo las condiciones más severas de análisis (120 mM de NaCl y 57 días de exposición) podría ayudar a las plantas a aumentar su capacidad de acumulación de iones tóxicos en una mayor cantidad de tejido.

La reducción del crecimiento vegetativo bajo condiciones salinas es una característica de plantas no halófitas (Mazher *et al.*, 2007). Para la mayoría de las especies de plantas analizadas, los estudios sobre los efectos de la salinidad en el crecimiento y desarrollo han sido hechos bajo variables condiciones de concentración de NaCl, tiempo de exposición, y estado de desarrollo, de tal manera que resulta difícil establecer un criterio general para la concentración y el tiempo de exposición arriba de los cuales se deba considerar la reducción del crecimiento vegetativo para establecer si una especie de planta es o no tolerante a la sal. Además, la magnitud de la reducción crecimiento puede ser diferente para diferentes estados de desarrollo de una misma especie. Sin embargo, ya que el tomatillo no presentó reducción del crecimiento vegetativo, sino al contrario se observó un incremento del mismo durante 42 días de exposición a 90 mM y 120 mM de NaCl, la especie se podría considerar como moderadamente tolerante a la sal.

Tabla 6. Características morfométricas de *Physalis ixocarpa* var Rendidora crecidas en diferentes condiciones de salinidad

	Altura de la planta (cm)	Longitud de hoja (cm)	Ancho de hoja (cm)	Longitud de raíz (cm)
C-24D	15.49 ± 1.97 f	3.16 ± 0.49 g	2.13 ± 0.27 f	9.23 ± 1.20 ef
90-24D	19.38 ± 3.05 e	3.87 ± 0.48 f	2.57 ± 0.29 e	8.71 ± 1.39 f
120-24D	19.36 ± 1.55 e	3.80 ± 0.35 f	2.56 ± 0.29 e	8.36 ± 1.41 f
C-42D	22.75 ± 4.07 d	4.02 ± 0.54 f	2.53 ± 0.40 e	10.06 ± 1.62 e
90-42D	33.43 ± 3.25 c	4.91 ± 0.41 d	3.18 ± 0.37 d	10.04 ± 0.91 e
120-42D	34.24 ± 2.27 c	4.48 ± 0.28 e	3.13 ± 0.33 d	12.06 ± 1.54 d
C-57D	45.03 ± 5.77 a	7.52 ± 0.54 a	4.11 ± 0.51 b	18.40 ± 2.30 b
90-57D	41.28 ± 6.43 b	6.54 ± 0.80 c	3.65 ± 0.46 c	16.55 ± 2.95 c
120-57D	40.05 ± 4.97 b	7.04 ± 1.26 b	4.56 ± 1.04 a	21.77 ± 3.27 a

Los valores representados son la media y la desviación estándar de n=15 para cada tratamiento. Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas por tratamiento (Prueba de Duncan $p < 0.05$)

6.1.2. ACP y análisis de correlación basado en las características morfométricas de *Physalis ixocarpa* var Rendidora crecidas en condiciones diferentes de salinidad

Los resultados del ACP basado en las variables morfométricas se presentan en la Figura 6. El componente 1 y el componente 2 (PC1 y PC2, respectivamente) explicaron el 99.5% de la varianza (93.29% y 6.21%, respectivamente). El PC1 se correlacionó con la altura de la planta (AP), mientras que el PC2 se correlacionó con la longitud de la raíz (LR), indicando que estos dos caracteres fueron los principales para diferenciar las plantas de los diferentes tratamientos. Las plantas de los tratamientos de mayor tiempo de exposición (57 días) mostraron la mayor altura de planta y mayor longitud de raíz. Esto era esperado, ya que fueron las plantas más viejas, lo que no era esperado es que no se discriminaran claramente entre sí las plantas de los tratamientos control, las expuestas a la concentración moderada de NaCl, y las expuestas a la concentración severa de NaCl, lo que apoya la propuesta hecha anteriormente de que *P. ixocarpa* es una especie moderadamente tolerante a la sal.

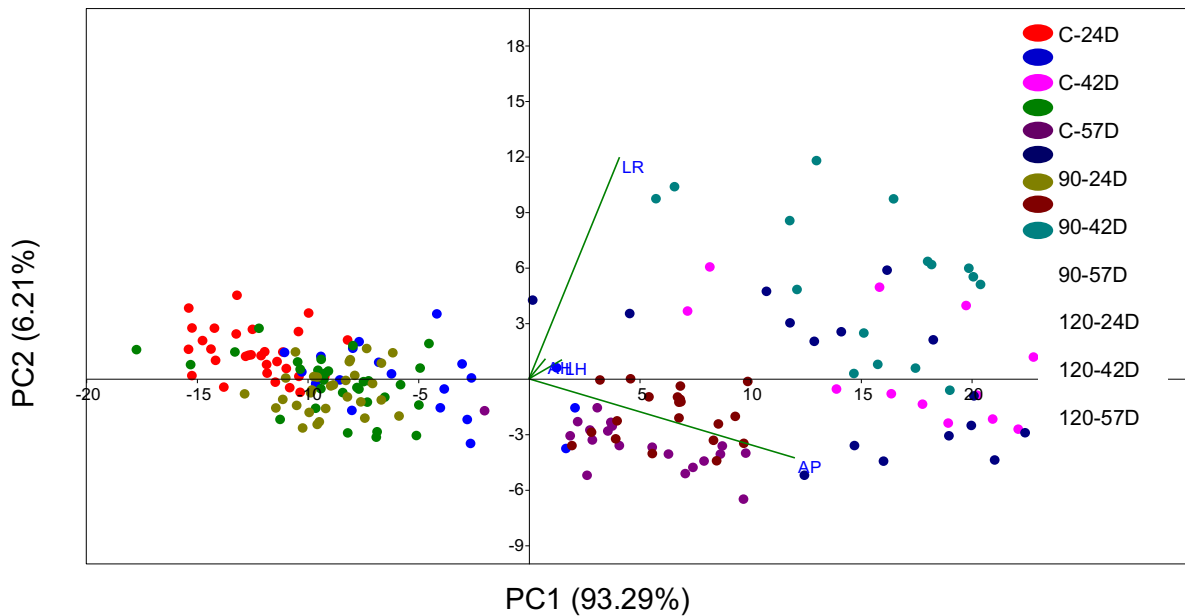


Figura 6. Análisis de componentes principales basado en las características morfológicas de *Physalis ixocarpa* sometidas a diferentes tratamientos salinos. AP: Altura de la planta; LH: Longitud de hoja; AH: Ancho de hoja; LR: Longitud de raíz

Los resultados del análisis de agrupamiento basado en las características morfológicas analizadas se presenta en la Figura 7. Los resultados muestran la formación de cuatro grupos principales, el I, formado por las plantas de los tratamientos control de 24 y 42 días; el II, formado por las plantas del tratamiento control de 57 días; el III, formado por las plantas del tratamiento de exposición salina moderada durante 24 días; el IV, formado por las plantas de los tratamientos de exposición salina moderada durante 42 y 57 días; el V, formado por las plantas del tratamiento de exposición salina severa durante 24 días; y el VI, formado por las plantas de los tratamientos de exposición salina severa durante 120 días. Los agrupamientos indican que las plantas de tratamientos distintos formando un solo grupo fueron morfológicamente más semejantes entre sí que con las plantas de cualquiera de los tratamientos que formaron los otros grupos principales de la Figura 7. Las plantas de cada tratamiento formaron se agruparon en clados individuales.

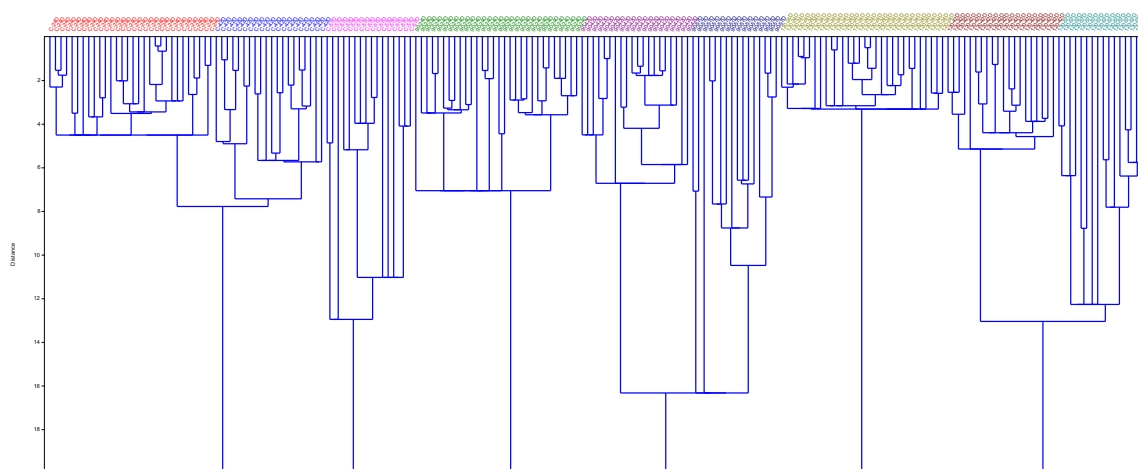


Figura 7. Análisis de agrupamiento basado en las características morfométricas de *Physalis ixocarpa* sometidas a diferentes tratamientos salinos.

La correlación de Pearson entre las variables morfométricas se presenta en la Tabla 7. Se encontraron correlaciones positivas significativas entre todas las variables, es decir, cuando la altura de la planta es mayor, también será mayor la longitud de la hoja, el ancho de la hoja y la longitud de la raíz. La correlación más alta se encontró entre la longitud de la hoja y la altura de la planta.

Tabla 7. Análisis de correlación de Pearson realizado sobre las características morfométricas de *Physalis ixocarpa* en tres concentraciones salinas y tres tiempos de exposición

	Altura de planta	Longitud de hoja	Ancho de hoja	Longitud de raíz
Altura de planta	1			
Longitud de hoja	0.86*	1		
Ancho de hoja	0.75*	0.8*	1	
Longitud de raíz	0.74*	0.79*	0.8*	1

* Nivel de significancia $P < 0.01$

6.2. Efecto del estrés salino en la respuesta química de *Physalis ixocarpa* var Rendidora

Las hojas de *Physalis ixocarpa* presentaron diferentes respuestas de acumulación de compuestos fenólicos ante las diferentes condiciones de salinidad analizadas (Figura 8). Los resultados revelaron que los tejidos foliares de plantas no estresadas de tomatillo en cualquiera de las tres edades analizadas fueron fuentes importantes de fenoles totales y flavonoides, comparados con los de otras especies de la misma familia (Solanaceae), como el tomate, para el cual Ahanger *et al.* (2018) reportaron contenidos de 7.34 y 18.51 mg/g de extracto de fenoles totales y flavonoides, respectivamente. Los niveles acumulados de fenoles totales fueron incluso más altos que los reportados para una especie reconocida por su elevado contenido de estos compuestos, como es la acerola *Malpighia umbellata*, para la cual Vasavilbazo-Saucedo *et al.* (2018) reportaron 46.91 mg/g de extracto. Los contenidos de flavonoides de las plantas de tomatillo no estresadas también fueron superiores al reportado para *M. umbellata* (10.55 mg/g de extracto) (Vasavilbazo-Saucedo *et al.*, 2018).

A los 24 días de exposición, y no a los 42 ni a los 57, el contenido de fenoles totales y taninos condensados se incrementó progresivamente con los incrementos en la concentración de NaCl, sugiriendo que estos compuestos representan una estrategia inicial del tomatillo para enfrentar el estrés salino. Incrementos en los niveles de fenoles totales y taninos condensados dependiente de la concentración de sal, también se observaron en plantas jóvenes de *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* (col china) (Šamec *et al.*, 2021).

Los contenidos foliares de flavonoides de *P. ixocarpa* disminuyeron clara y progresivamente con los incrementos en la concentración de NaCl en los tres tiempos de exposición analizados (Figura 8), lo que sugiere que los flavonoides no llevan a cabo funciones importantes de protección contra la salinidad en esta especie. Una reducción en el contenido de flavonoides fue encontrada también para *Solanum*

lycopersicum (Ahanger *et al.*, 2018), aunque en el estudio no se evaluaron incrementos progresivos de sal, sino que se realizó a una sola concentración de NaCl. La revisión de los resultados sobre la acumulación de flavonoides en plantas de diferentes especies sometidas a incrementos de salinidad revela que las respuestas pueden ser muy variables. Por ejemplo, la concentración de estos compuestos incrementó progresivamente en *Fagopyrum esculentum* (Lim *et al.*, 2012) y *Mentha pulegium* (Oueslati *et al.*, 2010), incrementos no progresivos se reportaron para *Lonicera japónica* (Yan *et al.*, 2017) y *Carthamus tinctorius* (Gengmao *et al.*, 2015), mientras que no se observaron incrementos en los niveles de flavonoides con incrementos en los niveles de salinidad en *Brassica oleracea* var. *italica* (López-Berenger *et al.*, 2009). Algunos autores han reportado que los flavonoides tienen una importancia menor en la protección de las plantas contra el daño oxidativo inducido por el estrés salino (Hernández *et al.*, 2009). Toda la variedad de respuestas reportadas podría ser el resultado de que los diferentes estudios se llevaron a cabo bajo diferentes condiciones experimentales, tales como el intervalo de concentraciones de NaCl utilizadas, duración de los tiempos de exposición, etapas de desarrollo de las plantas, y genotipos, cultivares o variedades analizadas. Sin embargo, las diferencias también se pueden deber a que, entre las diferentes especies de plantas, han surgido diferentes respuestas contra el estrés salino, las cuales se encuentran genéticamente controladas, de tal manera que aún en especies relacionadas, pueden ser especie-específicas, como se han reportado para especies del género *Brassica* (Linić *et al.*, 2019).

Las plantas no estresadas de tomatillo en el día 42 acumularon el nivel más alto de ácidos fenólicos (Figura 8). Una respuesta similar se reportó para *Brassica oleracea* var. *acephala* (Linić *et al.*, 2019). El nivel de los ácidos fenólicos se incrementó de manera gradual con el incremento de sal solamente en los tejidos foliares de las plantas de 57 días, sugiriendo su participación como protectores contra el estrés salino después de un periodo de exposición largo en *P. ixocarpa*. Como para el caso de los flavonoides, diferentes respuestas a la observada para tomatillo, se han reportado para otras especies de plantas, por ejemplo, para *Origanum majorana* (Baâtour *et al.*, 2012),

Brassica oleracea var. capitata (Linić *et al.*, 2019), algunas variedades de *Oryza sativa* (Minh *et al.*, 2016), y *Lonicera japonica* (Yan *et al.*, 2017). Las diferencias entre especies podrían ser explicadas por las mismas razones descritas previamente para los flavonoides.

En el presente estudio, también se evaluó la participación de los carotenoides, metabolitos especializados de diferente origen biosintético que los compuestos fenólicos (Taiz y Zeiger, 2006), porque también han sido reportados como sustancias protectoras contra el estrés oxidativo generado por la salinidad (Li *et al.*, 2019). En las plantas, estos compuestos tienen una importante participación en los procesos fotosintéticos y de fotoprotección (Mirkovic *et al.*, 2017); sin embargo, su participación como protectores contra el estrés salino no fue relevante en tomatillo, ya que como se puede observar en la Figura 8, su concentración en los tejidos foliares no incrementó bajo ninguna concentración salina, a ningún tiempo de exposición, con respecto a los controles respectivos. Para otras dos especies de Solanaceae, *Solanum lycopersicum* y *Lycium ruthenicum*, también se reportaron participaciones irrelevantes de los carotenoides en plantas estresadas por sal (Ahanger *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019), lo que sugiere una probable respuesta común de los carotenoides bajo estrés salino en especies de esta familia. Sin embargo, la respuesta en otras especies de plantas ha sido diferente, como en *Moringa oleifera* (Farooq *et al.*, 2022) y *Fagopyrum sculentum* (Lim *et al.*, 2012). Es importante resaltar que las plantas de tomatillo no estresadas, de 57 días, acumularon una cantidad importante de carotenoides, 2.37 veces más que lo reportado para las hojas de *Malpighia umbellata* (424.63 µg/g de extracto) (Vasavilbazo-Saucedo *et al.*, 2018), lo que las revela como fuente importante de estos compuestos bioactivos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio revelan que la acumulación de fenoles totales, taninos condensados, flavonoides, ácidos fenólicos, y carotenoides puede variar en una misma especie si esta es sometida a una concentración moderada o severa de NaCl, a un tiempo corto, medio, o largo. Por esta razón, es necesario el registro exacto de los cambios que ocurren en los metabolitos especializados de

plantas sometidas a exposiciones crónicas de sal, para poder comprender los procesos de su acumulación y sus funciones. Los registros exactos de estos cambios serían útiles para desarrollar marcadores químicos que se pudieran usar en programas de conservación, de mejoramiento, y de expansión del área de cultivo a zonas con suelos salinos, sobre todo para especies de interés económico, tal como es *P. ixocarpa*.

Las propiedades antioxidantes, como la capacidad bloqueadora del radical libre DPPH y el poder reductor de fierro de los extractos fenólicos foliares de *P. ixocarpa* no fueron claramente dependientes del contenido fenólico ni de la concentración de sal (Figura 8), como ha sido reportado para otras especies, como por ejemplo *Amaranthus tricolor* (Sarker y Oba, 2018) y *Mentha pulegium* (Oueslati *et al.*, 2010). Varios autores también mencionan una dependencia directa de la actividad antioxidante de extractos de plantas con su concentración de compuestos fenólicos (Falleh *et al.* 2012; Negro *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2002; Bourgou *et al.*, 2008). Sin embargo, también hay autores que han reportado que no solamente la concentración de estos compuestos define las actividades antioxidantes de extractos, sino que la composición fenólica juega un papel muy importante en ello (Barriada-Bernal *et al.*, 2014).

Los perfiles fenólicos foliares de *P. ixocarpa* sometido a diferentes tratamientos salinos se obtuvieron con un equipo HPLC acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD). Los correspondientes cromatogramas se presentan en la Figura 9. Los espectros UV, tiempo de retención (TR), y $\lambda_{\max}$ de cada uno de los principales compuestos resueltos en los cromatogramas se presentan en la Figura 10. El análisis de HPLC-DAD reveló ocho compuestos fenólicos principales.

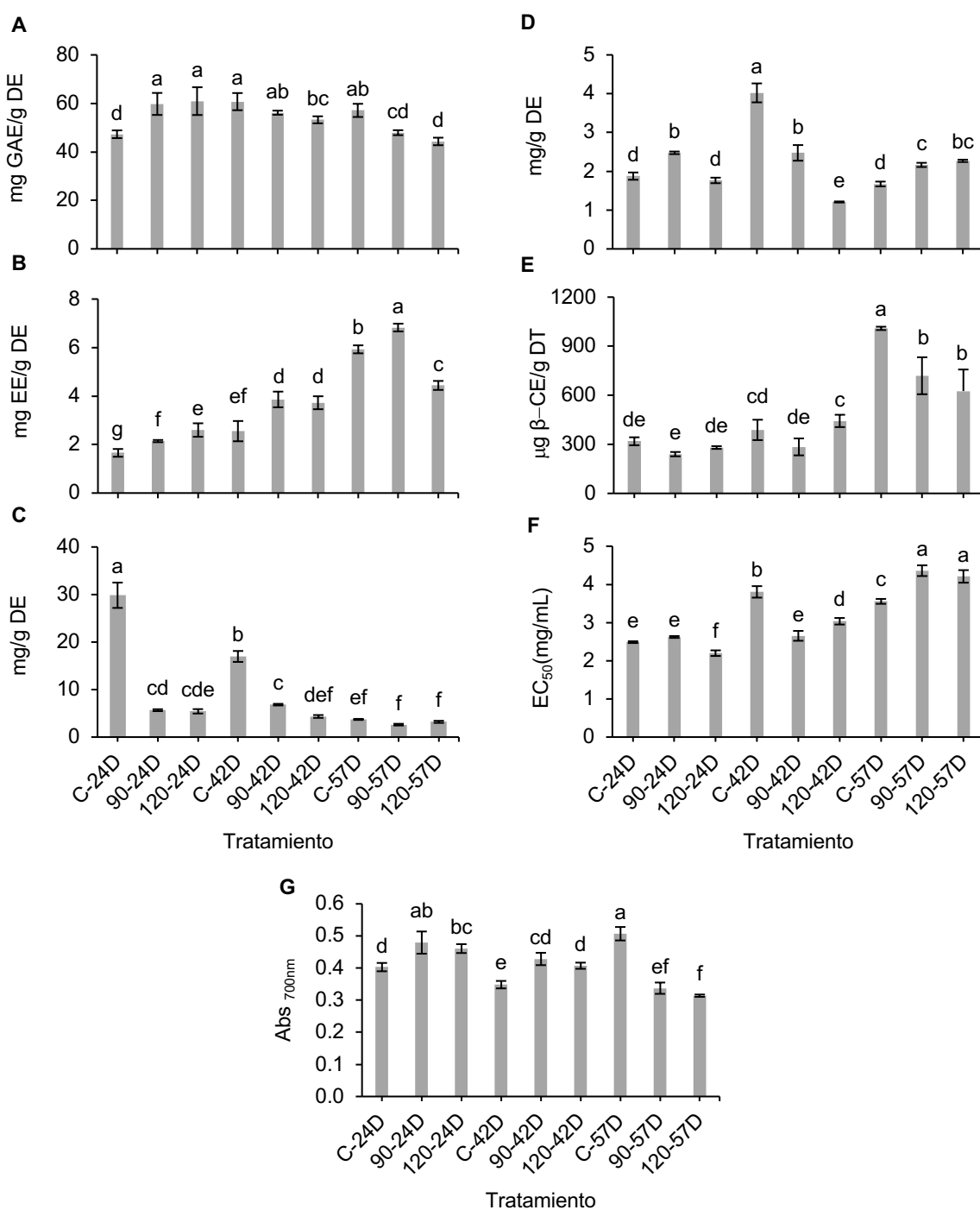


Figura 8. Efecto de los tratamientos en el contenido de fenoles totales (A), taninos condensados (B), flavonoides (C), ácidos fenólicos (D), carotenoides (E), radical DPPH (F), y poder reductor de hierro (G) de *Physalis ixocarpa* var Rendidora. Las barras representan la media $\pm$ desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas por tratamientos (Prueba de Duncan $p < 0.05$).

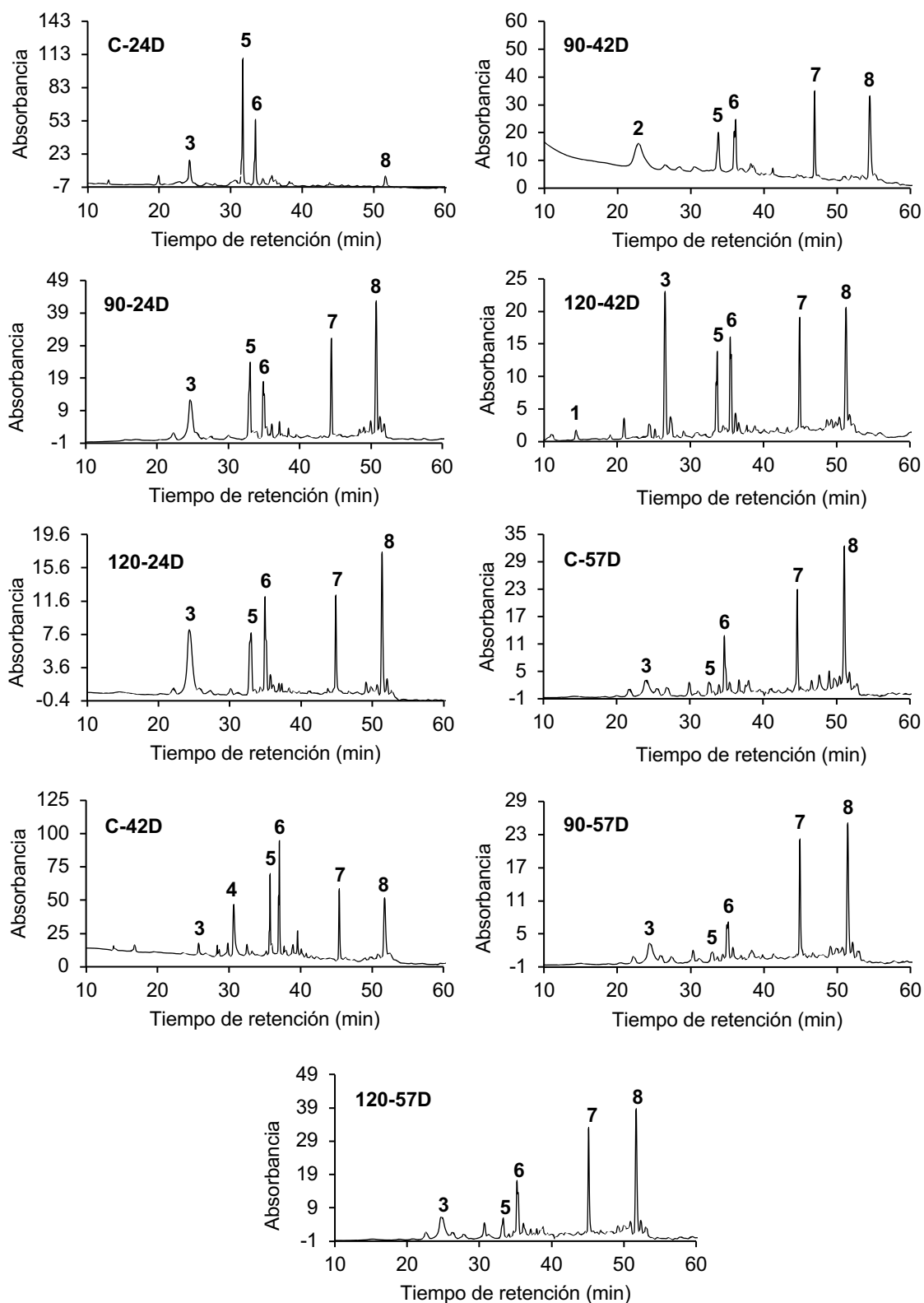


Figura 9. Cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD correspondientes a plantas de *Physalis ixocarpa* var *Rendidora* sometidas a diferentes tratamientos de estrés salino. Los tratamientos aparecen en negritas, y se describen en la Tabla 1.

Los espectros UV de los compuestos **1-4** mostraron la doble banda comúnmente encontrada en los espectros UV de los ácidos hidroxicinámicos, razón por la cual estos compuestos se propusieron como ácidos fenólicos pertenecientes al tipo hidroxicinámico.

La presencia y la posición de la banda I y la banda II en los espectros UV de los compuestos **5** y **6** indicaron que se trataba de flavonoides, en particular de flavonoles. El TR y la $\lambda_{\max}$ del compuesto **5** coincidieron con los de la rutina analizada como estándar en el presente estudio (RT: 32.33 min; $\lambda_{\max}$: 256, 264sh, 294sh, 356), un flavonol que tiene el anillo B ortodihidroxiado, analizado como referencia en el presente estudio, por lo cual **5** se propuso como rutina. Las características espectrales del flavonol **6** indicaron que se trataba de un canferol-3-O-glicósido, que es un flavonol con un anillo B monohidroxilado.

Los espectros de los compuestos **7** y **8**, formados por una sola banda de absorción y una inflexión ($\lambda_{\max}$: 293, 308sh nm y $\lambda_{\max}$: 296, 309sh nm, respectivamente), sugirieron que **7** y **8** fueron derivados del ácido *p*-cumárico.

Al comparar el perfil fenólico foliar de las plantas maduras (de 57 días) no sometidas a estrés salino (C-57D) de tomatillo (Figura 9) con los perfiles de otras especies del mismo género *Physalis*, también en el estado de madurez, se puede apreciar que cada una tiene un perfil fenólico foliar único. Por ejemplo, Medina-Medrano *et al.* (2015) reportó un perfil formado por 12 compuestos para *P. angulata*, por 3 compuestos para *P. solanaceae*, por 11 compuestos para *P. hederifolia* var. *hederifolia*, y 8 tanto para *P. patula* como para *P. subulata*; sin embargo, aunque en número hay coincidencia entre los perfiles de estas dos últimas especies y el de *P. ixocarpa*, los compuestos, formando los perfiles fueron diferentes entre sí. Los resultados del presente trabajo apoyan la propuesta hecha por otros autores acerca de que los perfiles fenólicos tienen una tendencia especie-específica (Almaraz-Abarca *et al.*, 2006; Médina-Medrano *et al.*, 2015; Ávila-Reyes *et al.*, 2018; Fusari *et al.*, 2020).

En la Tabla 8 se presentan las concentraciones de los compuestos individuales resueltos en el cromatograma de cada muestra. Se encontraron diferencias en las concentraciones de los compuestos, las cuales fueron dependientes de la edad, entre las plantas de cada uno de los tres tratamientos control. Este tipo de diferencias eran esperadas, ya que se ha reportado que los perfiles fenólicos pueden de un mismo tipo de tejido, pueden variar durante el desarrollo (Del Baño *et al.*, 2003; Cobaleda-Velasco *et al.*, 2017a). Los cambios en la concentración de los compuestos fenólicos individuales encontrados en las plantas de *P. ixocarpa* no sometidas a estrés salino pueden haber resultado en respuesta a las demandas naturales que conlleva el proceso de desarrollo natural de las mismas. Es de destacarse las altas concentraciones de los flavonoles **5** (rutina) y **6** (un canferol-3-O-glicósido) en las plantas del tratamiento C-24D.

Además de los cambios en la concentración de los compuestos individuales debidos al desarrollo natural de las plantas de tomatillo, también se observaron cambios debidos al efecto de las condiciones salinas de cada tratamiento (Tabla 8). La exposición crónica (de 57 días) a las concentraciones moderada y alta de NaCl (tratamientos 90-57D y 120-57D), estimuló la acumulación, dependiente de la sal, del compuesto **3**, los incrementos fueron significativos, de 17.19 veces más, bajo la concentración moderada de sal y de 26.26 veces más, bajo la concentración alta, lo que sugiere que este ácido fenólico juega un importante papel protector contra la salinidad en el tomatillo después de la exposición crónica. En otras especies, tales como trigo y especies de la familia Brassicaceae, también se observó la acumulación variable de ácidos fenólicos, dependiendo de las condiciones salinas (Cuong *et al.*, 2020; Linić *et al.*, 2019).

En los compuestos **5**, **6** (ambos flavonoles), y **7** y **8** (ambos derivados del ácido *p*-cumárico) no se observaron tendencias de incrementos de concentración con incrementos de concentración de sal a ningún tiempo de exposición. Estos resultados difieren de los reportados reportados por Xu *et al.* (2020) para *Apocynum venetum*, por Cuong *et al.* (202) para trigo, y por Martínez *et al.* (2016) para otra especie de

Solanaceae, como lo es el tomate. Los resultados del presente trabajo y los de los autores aquí mencionados sugieren que condiciones particulares de concentración de NaCl y de duración de la exposición a ella pueden estimular variaciones en la acumulación de flavonoides y ácidos fenólicos dentro de una misma especie de planta. Este tipo de conocimiento, para plantas de interés medicinal y farmacéutico, como lo es tomatillo, puede ser útil para seleccionar las condiciones bajo las cuales se favorezca la acumulación selectiva de bioproductos.

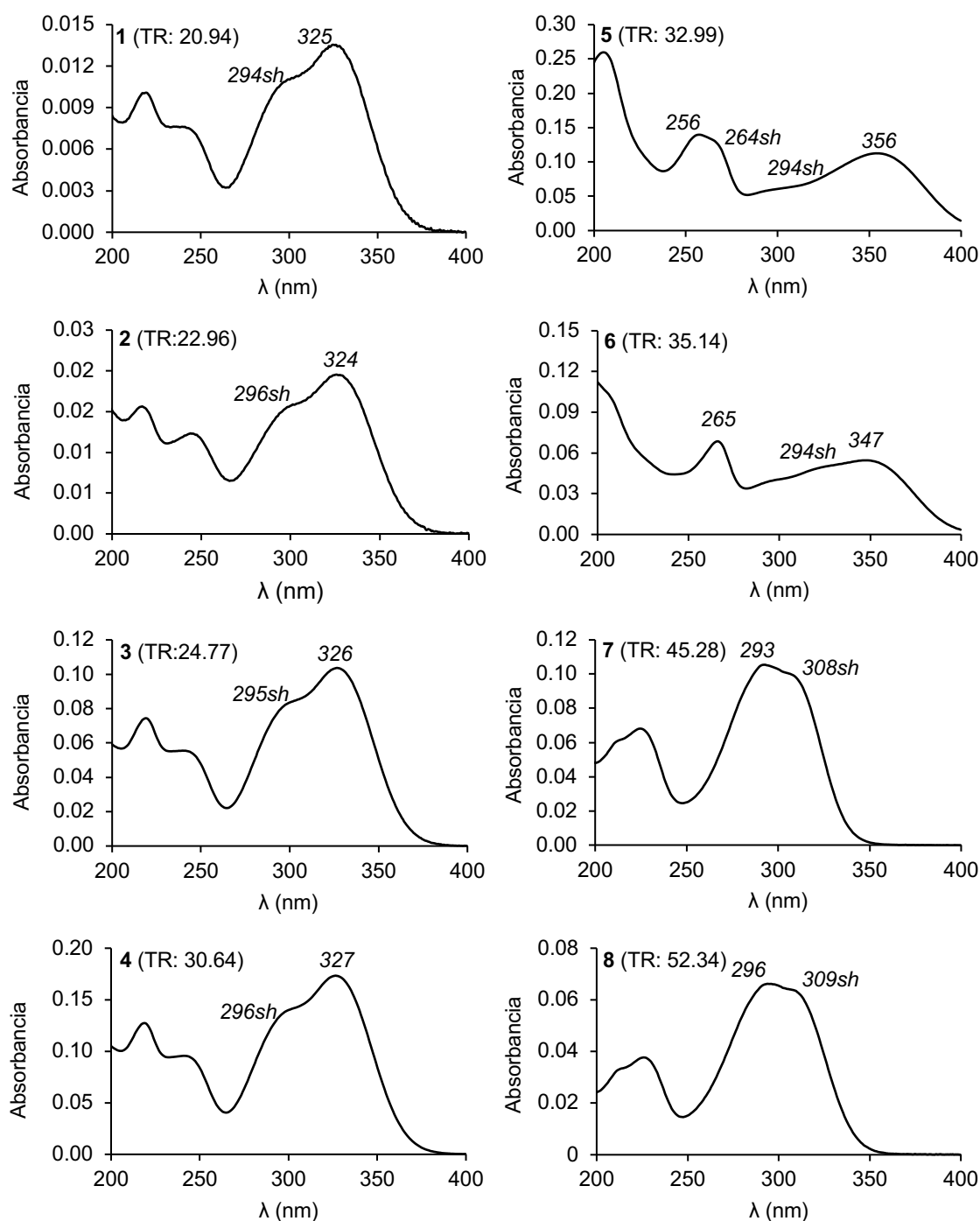


Figura 10. Espectros UV de los compuestos resueltos en los cromatogramas correspondientes a plantas de *Physalis ixocarpa* var *Rendidora* sometidas a diferentes concentraciones de estrés salino. TR: tiempo de retención. 1-4: ácidos fenólicos pertenecientes al tipo hidroxicinámico; 5: rutina; 6: canferol-3-O-glicósido; 7-8: derivados del ácido *p*-cumárico.

Tabla 8. Concentraciones ($\mu\text{g/g}$ ES) de los compuestos individuales encontrados en los perfiles fenólicos foliares de *Physalis ixocarpa* var. Rendidora bajo tres diferentes condiciones salinas y tres tiempos de exposición.

	Compuesto1 Ácido fenólico	Compuesto 2 Ácido fenólico	Compuesto 3 Ácido fenólico	Compuesto 4 Ácido fenólico	Compuesto 5 Quercetina-3-O- [rhamnosyl(1- 6)glucósido] (Rutina)	Compuesto 6 Canferol-3-O- glucósido	Compuesto 7 Derivado de ácido fenólico	Compuesto 8 Derivado de ácido fenólico
C-24D	NE	NE	1275.75 $\pm$ 46.71 a	NE	19498.72 $\pm$ 1538.41 a	10343.16 $\pm$ 1380.20 a	NF	600.15 $\pm$ 48.28 c
90-24D	NE	NE	681.05 $\pm$ 14.93 b	NE	4340.24 $\pm$ 139.47 c	1320.91 $\pm$ 155.36 f	635.83 $\pm$ 31.70 bc	1159.25 $\pm$ 15.81 a
120-24D	NE	NE	728.21 $\pm$ 37.09 b	NE	2925.71 $\pm$ 320.65 d	2496.19 $\pm$ 142.06 de	368.15 $\pm$ 20.01 d	668.20 $\pm$ 54.57 c
C-42D	NE	NE	287.27 $\pm$ 34.26 d	1551.99 $\pm$ 139.21	7853.40 $\pm$ 448.45 b	9114.48 $\pm$ 732.58 b	1182.28 $\pm$ 115.67 a	999.53 $\pm$ 82.72 b
90-42D	NE	743.91 $\pm$ 111.22	NE	NE	2975.95 $\pm$ 208.83 d	7847.75 $\pm$ 231.32 c	654.97 $\pm$ 51.42 bc	1075.85 $\pm$ 143.39 ab
120-42D	70.24 $\pm$ 6.76	NE	124.95 $\pm$ 6.76 e	NE	2220.53 $\pm$ 246.19 de	2121.69 $\pm$ 206.54 def	401.40 $\pm$ 17.41 d	613.49 $\pm$ 17.55 c
C-57D	NE	NE	14.45 $\pm$ 2.45 f	NE	925.88 $\pm$ 20.81 f	2793.59 $\pm$ 134.77 d	584.13 $\pm$ 50.38 c	1074.61 $\pm$ 59.29 ab
90-57D	NE	NE	248.40 $\pm$ 17.20 d	NE	894.29 $\pm$ 97.80 f	1722.49 $\pm$ 87.06 ef	744.45 $\pm$ 65.00 b	1171.79 $\pm$ 22.26 a
120-57D	NE	NE	379.48 $\pm$ 24.47 c	NE	1219.99 $\pm$ 106.17 ef	1985.48 $\pm$ 116.08 ef	728.93 $\pm$ 17.59 b	1161.29 $\pm$ 36.29 a

Los valores representan la media y desviación estándar de tres muestras independientes. Diferentes letras en la misma columna representan diferencias significativas ($p < 0.05$). NE: No encontrado.

6.2.1. ACP basado en las características químicas de *Physalis ixocarpa* var Rendidora crecidas en condiciones diferentes de salinidad

Los componentes 1 y 2 (PC1 y PC2) del análisis de componentes principales basado en las características químicas de *Physalis ixocarpa* representaron el 99.94% de la varianza (Figura 11). El PC1 se correlacionó principalmente con carotenoides y taninos condensados, mientras que el PC2 se correlacionó con el contenido de flavonoides. Los resultados revelaron que plantas adultas (de 57 días de edad) de *P. ixocarpa*, no estresadas y estresadas, se distinguen por la relevante acumulación de carotenos y taninos condensados, mientras que las plantas jóvenes y de mediana edad (24 y 42 días, respectivamente), no estresadas, se distinguen por la acumulación de flavonoides.

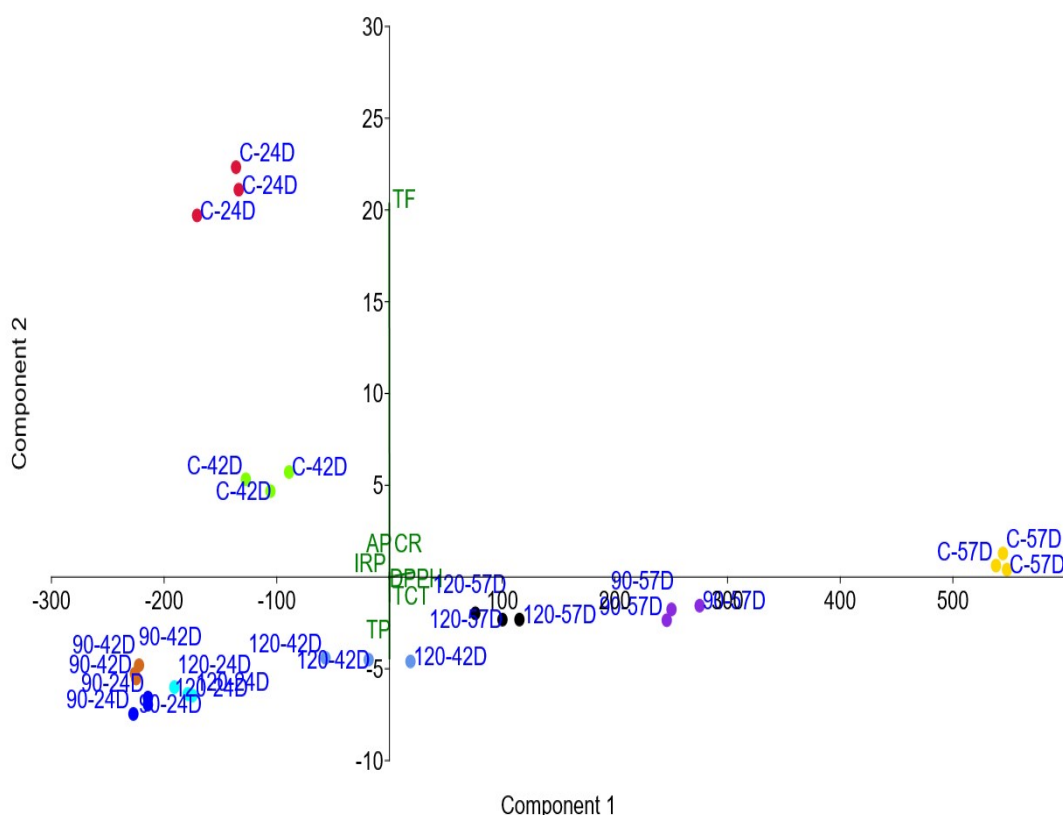


Figura 11. Análisis de componentes principales basado en las características químicas de *P. ixocarpa* crecidas bajo diferentes tratamientos de salinidad. Los tratamientos aparecen en azul y se describen en la Tabla 1.

discriminatoria tiene un importante potencial para el desarrollo de un “fingerprint”, el cual puede tener relevancia agronómica y como parámetro de control de calidad para esta especie económicamente importante en México.

El análisis de correlación de acuerdo con las características químicas (Tabla 9) demostraron diferencias significativas entre algunas variables. La mayor correlación positiva se observó entre los carotenoides y los taninos condensados presentando una correlación alta entre estas variables, es decir entre mayor es la cantidad de carotenoides aumenta sí mismo la cantidad de taninos condensados. Mientras que la mayor correlación negativa fue observada entre las variables antirradicales (DPPH y PR) presentando una correlación moderada, mientras el poder reductor aumenta, el DPPH disminuye.

Tabla 9. Análisis de correlación entre las variables químicas de *Physalis ixocarpa* bajo tres diferentes condiciones salinas y tres tiempos de exposición

	DPPH	CR	TP	TF	PA	TCT	PR
DPPH	1						
CR	0.66*	1					
TP	-0.43*	-0.28	1				
TF	-0.31	-0.38*	-0.1	1			
PA	0.29	-0.22	0.26	0.26	1		
TCT	0.69*	0.81*	-0.3	-0.62*	-0.24	1	
PR	-0.64*	-0.02	0.59*	-0.11	-0.36	-0.16	1

Nivel de significancia $P < 0.05$

CR: carotenoides; TP: Fenoles totales; TF: flavonoides totales; PA: ácidos fenólicos; TCT: taninos condensados; PR: poder reductor de hierro.

6.3. Efecto del estrés salino en la respuesta bioquímica de *Physalis ixocarpa* var Rendidora

El incremento en el contenido de prolina fue dependiente de la sal en los tres tiempos de exposición analizados (Figura 13), el incremento, con respecto al control, fue más intenso en las plantas expuestas a sal durante más tiempo. Estos resultados sugieren que la prolina es una respuesta bioquímica fundamental que

utiliza *P. ixocarpa* como protección contra estrés salino moderado y alto, bajo exposiciones corta, media, y crónica. La versatilidad de funciones documentadas para este aminoácido podría explicar su papel preponderante encontrado para tomatillo. Prolina es un osmolito que protege a las plantas contra el desbalance osmótico que se genera por el estrés salino (Shafi *et al.*, 2019; Meena *et al.*, 2016). Prolina también es un antioxidante, ya que es capaz de bloquear radicales $-OH$ y singlete de oxígeno; además de estabilizar macromoléculas y por lo tanto, la estructura de las membranas celulares (Shafi *et al.*, 2019). Un papel sobresaliente como protector contra el estrés salino para la prolina también se ha reportado en otras especies de Solanaceae, tales como *S. lycopersicum* (Ahanger *et al.*, 2018) y *L. ruthenicum* (Li *et al.*, 2019). Este hecho sugiere que la acumulación de prolina podría ser una respuesta común contra el estrés salino en especies de esa familia.

En la Figura 13 se observan las actividades de SOD, y la concentración de prolina en plantas de *Physalis ixocarpa* var Rendidora expuestas a los diferentes tratamientos salinos. En los tratamientos 90-24D y 90-42D se observó un incremento de la actividad de CAT con respecto a los respectivos controles. El incremento de la actividad de CAT en las plantas de esos tratamientos sugiere que en ellas ocurrió una promoción de la desintoxicación por peróxido de hidrógeno en las células foliares de *P. ixocarpa*, ya que esta enzima lleva a cabo esta función en las células (Sarker y Oba, 2018).

La mayor promoción de la dismutación de los radicales superóxido a H_2O_2 y O_2 por medio de la enzima SOD, actividad reconocida para esta enzima (Sarker y Oba, 2018) fue observada después de 24 y 42 días, tal como el incremento de la actividad de CAT, pero a diferencia de ésta, cuyo incremento en actividad con respecto al control se observó a la concentración moderada de sal (90 mM), el incremento en la actividad de SOD con respecto a su control se manifestó a la concentración salina más alta (120 mM).

Los resultados observados sugieren que CAT y SOD desempeñan funciones complementarias bajo concentraciones incrementadas de sal en *P. ixocarpa* después de tiempos de exposición corto y medio, ya que, en estos dos tiempos, la actividad de CAT es preponderante si la concentración de sal es moderada, pero si la concentración es alta, la actividad de SOD toma la preponderancia. Para *S. lycopersicum* y *L. ruthenicum* (Li *et al.*, 2019), otras especies de Solanaceae, también se reportaron importantes participaciones de CAT y SOD como protectores bioquímicos contra el estrés salino (Ahanger *et al.*, 2018); sin embargo, para estas especies, no se puede asignar un papel complementario de CAT y SOD porque los estudios se realizaron a un solo tiempo de exposición y a una sola concentración de sal y un solo tiempo, respectivamente. Sin embargo, resultados que revelan que ni CAT ni SOD incrementaron su actividad como respuesta a incrementos en la concentración de NaCl también se han encontrado, como en chícharo (Farooq *et al.*, 2021). La variación en las respuestas de la actividad de estas enzimas en diferentes especies de plantas puede deberse, como se comentó para la variación en las respuestas químicas, a la diversidad del control genético de las mismas contra el estrés salino que han surgido en diferentes especies de plantas. Los resultados del presente estudio también indican que una sola especie es capaz de desplegar una amplia, complementaria, y compleja gama de respuestas químicas y bioquímicas durante la exposición a largo plazo a diferentes concentraciones de NaCl.

La disminución de la actividad tanto de CAT como de SOD en las plantas de los tratamientos salinos más largos (Figura 13), sugiere que el incremento de las especies reactivas de oxígeno generadas por el estrés salino pudo ocasionar un agotamiento de las defensas antioxidantes, como se observa en los tratamientos 90-57D y 120-57D.

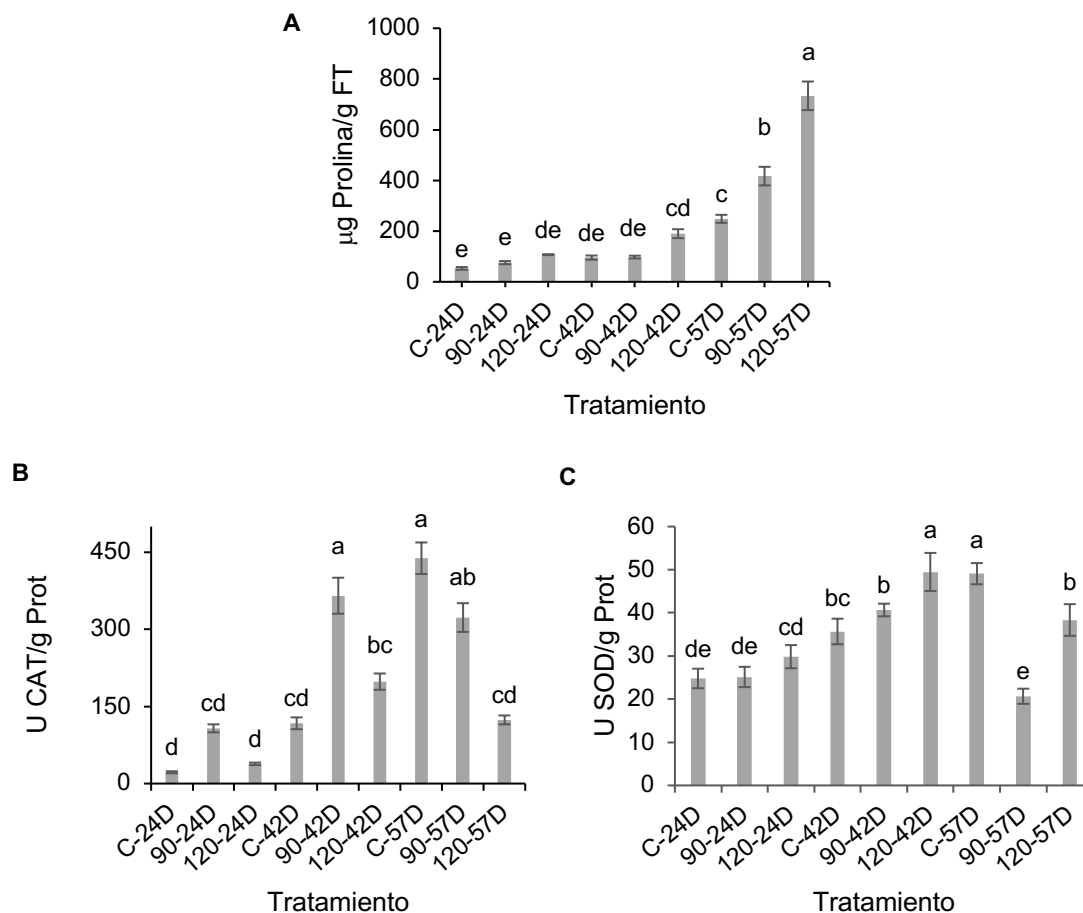


Figura 13. Actividad enzimática del osmolito prolina (A), catalasa (B) y superóxido dismutasa (C) en *Physalis ixocarpa* var Rendidora sometidas a estrés salino. Las barras representan la media $\pm$ desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas por tratamiento (Prueba de Duncan $p < 0.05$).

6.3.1. ACP basado en las características bioquímicas de *Physalis ixocarpa* var Rendidora crecidas en condiciones diferentes de salinidad

Los resultados del análisis de componentes principales basado en las características bioquímicas de *P. ixocarpa* crecidas bajo nueve diferentes tratamientos salinos se presentan en la Figura 14. Los componentes 1 y 2 (PC1 y PC2) representaron el 99.74% de la varianza total encontrada. El PC1 se correlacionó con la actividad de CAT y el PC2 se correlacionó con el contenido de prolina. Las plantas de los tratamientos C-57D, 90-57D, 90-42D, y 120-42D

claramente son diferenciados por su alta actividad de CAT, mientras que las de los tratamientos 120-57D y 90-57D por su alto contenido de prolina.

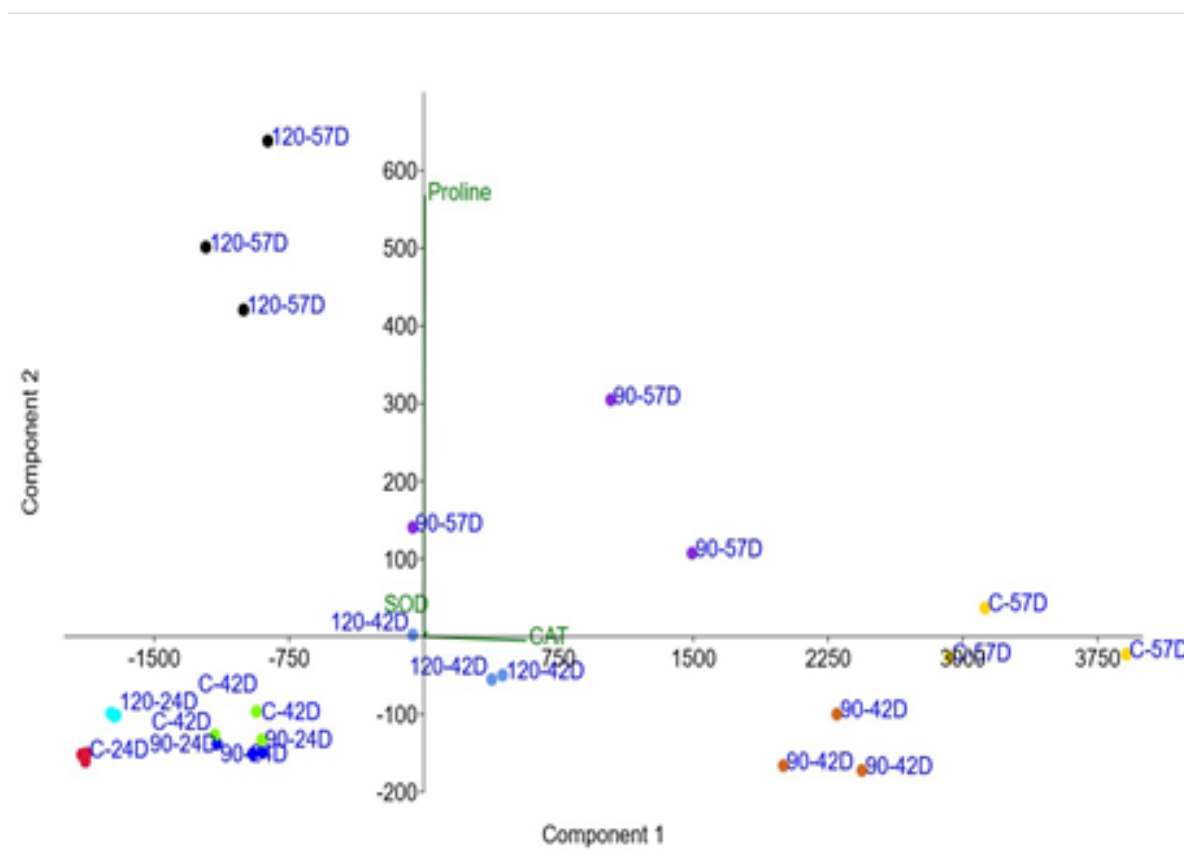


Figura 14. Análisis de componentes principales basado en las características bioquímicas de *P. ixocarpa* crecidas bajo diferentes tratamientos salinos. Los tratamientos aparecen en azul y se describen en la Tabla 1.

Como para las respuestas químicas, para las bioquímicas se hizo también un análisis de agrupamiento para determinar la similitud en las respuestas bioquímicas de plantas de tomatillo sometidos a nueve diferentes tratamientos salinos. Los resultados revelaron la formación de dos grupos principales, uno formado por las plantas de los tres tratamientos salinos al tiempo corto de exposición y las del control del tiempo medio de exposición, las cuales fueron bioquímicamente más similares entre sí. El otro grupo principal fue bioquímicamente más heterogéneo y estuvo formado por las plantas del resto de los tratamientos. Tanto el ACP y el análisis de agrupamiento indican que las respuestas bioquímicas de plantas de *P. ixocarpa* sometidas a diferentes condiciones de estrés salino son de tal manera diferentes

que pueden discriminarse entre sí, ya que cada tratamiento formó un grupo independiente. Por esta razón, se sugiere que los caracteres bioquímicos de plantas de tomatillo sometidos a estrés salino también pueden usarse como marcadores para desarrollar un “fingerprint” con implicaciones en agronomía y en control de calidad de las plantas de esta especie.

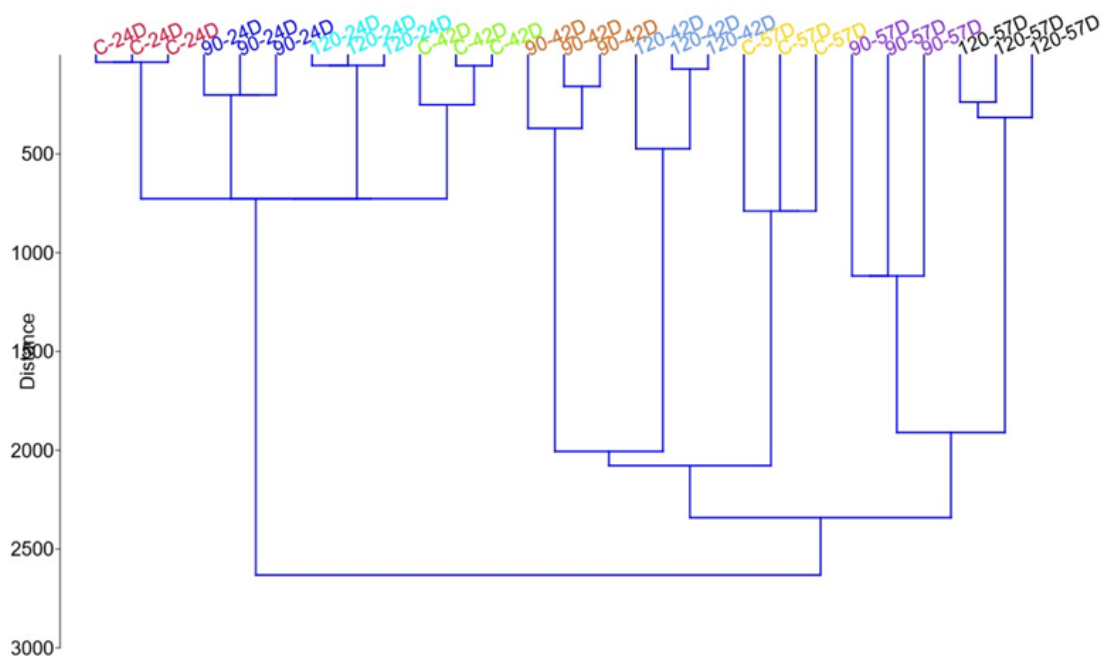


Figura 15. Análisis de agrupamiento basado en las características bioquímicas de *Physalis ixocarpa* crecidas bajo nueve diferentes condiciones de salinidad. Los tratamientos aparecen en colores y se describen en la Tabla 1.

El análisis de correlación para las actividades bioquímicas se observa en la Tabla 10. Solamente para las variables catalasa y superóxido dismutasa se observaron diferencias significativas y una correlación positiva baja entre ambas variables.

Tabla 10. Análisis de correlación entre las variables bioquímicas de *Physalis ixocarpa* bajo tres diferentes condiciones salinas y tres tiempos de exposición

	CAT	SOD	Prolina
CAT	1		
SOD	0.41*	1	
Prolina	0.14	0.09	1

6.3.2. Relación entre las respuestas químicas y bioquímicas, y la concentración de NaCl y la duración de los tratamientos

Para determinar si la concentración de NaCl y la duración de los tratamientos tenían un efecto diferente sobre cada una de las respuestas químicas y bioquímicas de *P. ixocarpa*, se realizaron dos ACC, uno para cada tipo de respuestas.

En la Figura 16 se presentan los resultados del ACC para las respuestas químicas analizadas. El factor 1 (ACC1) explicó el 96.23% del total de la varianza (1000 permutaciones, $P = 0.001$). Los resultados revelaron que el tiempo de exposición principalmente afectó la concentración de FT y CR, mientras que la concentración de sal principalmente afectó la concentración de fenoles totales, taninos condensados y ácidos fenólicos, así como las propiedades antioxidantes de los extractos fenólicos.

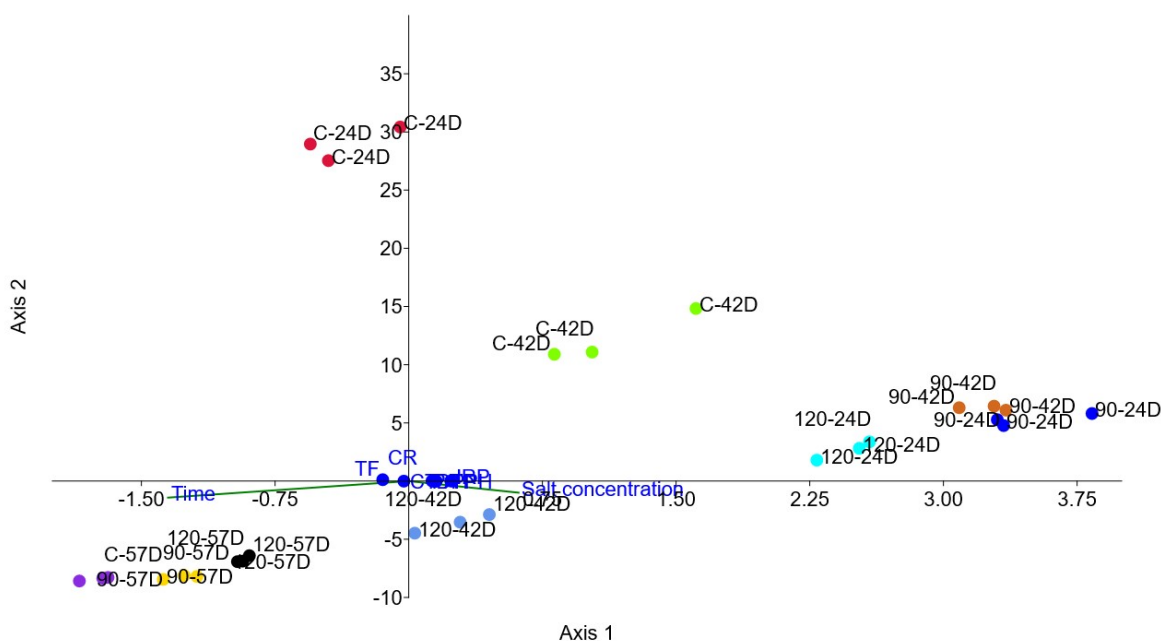


Figura 16. Resultados del análisis de correspondencia canónica que muestra el efecto de la concentración de NaCl y de la duración de los tratamientos sobre las respuestas químicas de *Physalis ixocarpa* crecida bajo diferentes tratamientos salinos. Cada tratamiento aparece señalado con tres círculos (repeticiones) de diferentes colores y se describe en la Tabla 1.

El efecto de la concentración de NaCl y de la duración de los tratamientos sobre cada una de las respuestas bioquímicas de *P. ixocarpa* se muestran en la Figura 17. El ACC1 explicó el 97.73% de la varianza (1000 permutaciones, $P = 0.001$). De acuerdo a los resultados, el tiempo de exposición tuvo efecto principalmente en la actividad de CAT, y la concentración de sal tuvo efecto principalmente en el contenido de prolina y la actividad de SOD.

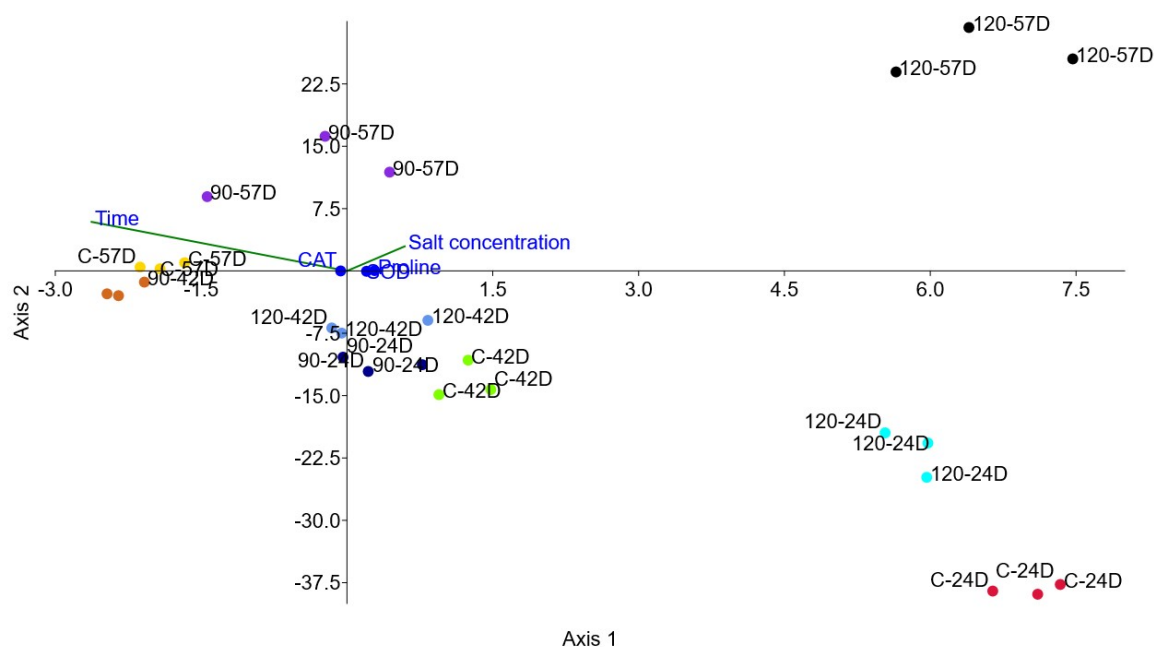


Figura 17. Resultados del análisis de correspondencia canónica que muestra el efecto de la concentración de NaCl y de la duración de los tratamientos sobre las respuestas bioquímicas de *Physalis ixocarpa* crecida bajo diferentes tratamientos salinos. Cada tratamiento aparece señalado con tres círculos (repeticiones) de diferentes colores y se describe en la Tabla 1.

Los resultados de los ACC indican que diferentes respuestas químicas y bioquímicas de *P. ixocarpa* se desencadenan principalmente por el efecto de la concentración de sal y otras, lo hace principalmente por el efecto de la duración del tratamiento. El registro exacto de estos efectos diferenciales es importante porque, por ejemplo, cambios en la composición química (cualitativa y cuantitativa)

contribuyen a la determinación de las propiedades organolépticas y funcionales de plantas, incluidas las comestibles y medicinales (Scarano *et al.*, 2018).

6.4. Efecto del estrés salino en la metilación de *Physalis ixocarpa* var Rendidra sometida a diferentes tratamientos de estrés salino

El efecto del estrés salino en los niveles de metilación de *P. ixocarpa*, como determinación del estatus epigenético, fue evaluada solamente para las plantas control y del tratamiento salino de 120 mM de NaCl a los tres tiempos de exposición analizados (24, 42, y 57 días).

De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada para el presente estudio, para *P. ixocarpa* no se han realizado estudios epigenéticos, ni de la variabilidad epigenética natural ni del efecto que el estrés salino tiene sobre su estatus epigenético. Sin embargo, este tipo de estudios es importante debido a que las variaciones en la composición química y bioquímica de las plantas, que les permita tolerar más o menos particulares condiciones de ambientales de estrés, responde al impacto que esas condiciones ambientales tengan en la regulación de la expresión de los genes involucrados en las rutas biosintéticas de los compuestos (Gallusci *et al.*, 2017). Esto resulta particularmente relevante para especies de interés económico, como lo es el tomatillo.

En la Tabla 11 se observan los cambios en el número de loci metilados, no metilados, y hemimetilados revelados por seis combinaciones de iniciadores *EcoRI*-*MspI*//*HpaII*. En la Figura 16 se presentan, a manera de ejemplo, los geles de acrilamida (al 6%) que muestran los loci amplificados con la combinación 4 de iniciadores selectivos (Tabla 1) para las plantas de los tratamientos C-24D y 120-24D.

De acuerdo a la Tabla 11, el porcentaje de metilación del ADN fue menor en los tratamientos 120-24D y C-57D (29.11 y 27.65%, respectivamente). Porcentajes

de metilación similares a los encontrados en el presente estudio se han publicado para diferentes especies de plantas, tales como *Arabidopsis thaliana* (25%), *Oryza sativa* (20-30%) y *Zea mays* (35%) bajo condiciones de estrés (Du and Wang, 2011; Karan *et al.*, 2012; Shan *et al.*, 2013).

En los tratamientos 120-24D y 120-42D se observó un decremento en el porcentaje de metilación con respecto al control, mientras que en el tratamiento 120-57D se observó un incremento del porcentaje de metilación. Varios autores han reportado hipometilación del ADN o de genes en diferentes especies de plantas, como respuesta a estrés abiótico de diferente naturaleza, como sequía, salinidad, frío, calor, y metales pesados (Wang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2007; Aina *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2011; Sanchez *et al.*, 2016). Se ha reportado la relación entre la disminución de los niveles de metilación y el intento de activar respuestas específicas adaptativas por parte de las plantas, contra la sequía y salinidad (Forestan *et al.*, 2020; Mousavi *et al.*, 2019). Sin embargo, bajo estrés con metales pesados, Ge *et al.* (2002) reportaron incremento en los niveles de metilación para arroz y trigo.

En el presente estudio se observó una reducción, comparado al control, en los niveles de metilación, de 58.22% después del tiempo corto (24 días) y de 84.64% después del tiempo medio (42 días) de exposición a estrés salino. Sin embargo, se registró una reducción del 29.00% después de la exposición crónica. Estos cambios en los niveles de metilación en las plantas de tomatillo estresada con NaCl comparados con las plantas de los respectivos controles, los cuales fueron variables en los tres tiempos de exposición analizados, pueden sugerir la activación e inactivación de los procesos transcripcionales de genes específicos relacionados con la tolerancia a la salinidad, como fue sugerido por Ventouris *et al.* (2020) para la variedad Chaironia de *Medicago sativa*.

Las diferencias en los niveles de metilación registradas en las plantas de *P. ixocarpa* de cada tratamiento salino, con respecto a su respectivo control, ponen de

manifiesto los importantes cambios epigenéticos provocados por el estrés salino, cambios que fueron variables de acuerdo a condiciones específicas de salinidad, que pudieron haber regido los cambios morfométricos, químicos, y bioquímicos registrados en el presente estudio, los cuales permitieron a *P. ixocarpa* crecer y desarrollarse, aún por periodos largos de tiempo, bajo una condición de salinidad relativamente alta. Los resultados del presente estudio apoyan la propuesta de varios autores acerca de que los cambios en los niveles de metilación del ADN pueden ser un mecanismo de adaptación a la salinidad y cualquier otro tipo de estrés (Suter y Windmer 2013; Neves *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015).

El registro de los cambios en los niveles de metilación bajo condiciones de estrés es importante porque se ha reportado que los niveles de metilación son específicos entre especies, variedades, o genotipos (Gutiérrez-Velázquez, 2018), y entre tejidos y etapas de desarrollo de una misma especie de planta (Wang *et al.*, 2011; Mastan *et al.*, 2012).

Las plantas tienden a “recordar” los episodios de estrés y responden eficazmente a este estrés ambiental, lo pueden realizar mediante la transmisión transgeneracional o durante un ciclo biológico ya que existe una “memoria” a corto plazo de este estrés, que es mejor conocido como “*priming*” (Ventouris *et al.*, 2020; Turgut-Kara *et al.*, 2020).

Tabla 11. Patrones de metilación de *Physalis ixocarpa* var. Rendidora crecida sin estrés salino y en una condición salina de 120 mM a diferentes tiempos de exposición (24, 42, y 57 días), obtenidos con seis combinaciones de iniciadores selectivos (*EcoRI* y *MspI/HpaII*).

Iniciador selectivo <i>EcoRI</i>	Iniciador selectivo <i>MspI/HpaII</i>	Loci metilados	Loci no metilados	Loci hemimetilados	Loci amplificados por combinación	Porcentaje de metilación
C-24D						
AC	TCAA	18	8	24	50	36.00
AC	AAT	36	12	25	73	49.31
AAC	TCAA	27	6	15	48	56.25
AAC	AAT	38	6	31	75	50.66
AT	TCAA	21	5	15	41	51.21
AT	AAT	25	3	15	43	58.14
Total		165	40	125	330	50.00
120-24D						
AC	TCAA	12	10	22	44	27.27
AC	AAT	10	14	11	35	28.57
AAC	TCAA	5	3	12	20	25.00
AAC	AAT	10	44	8	62	16.13
AT	TCAA	21	9	29	59	35.59
AT	AAT	11	0	6	17	64.71
Total		69	80	88	237	29.11
C-42D						
AC	TCAA	6	0	15	21	28.57
AC	AAT	36	25	27	88	40.91
AAC	TCAA	21	5	9	35	60.00
AAC	AAT	54	24	33	111	48.65
AT	TCAA	11	6	24	41	26.83
AT	AAT	21	13	10	44	47.73
Total		149	73	118	340	43.82
120-42D						
AC	TCAA	8	3	32	43	18.60
AC	AAT	35	17	31	83	42.17
AAC	TCAA	23	9	19	51	45.10
AAC	AAT	26	31	19	76	34.21
AT	TCAA	9	5	10	24	37.50
AT	AAT	14	5	14	33	42.42
Total		115	70	125	310	37.09
C-57D						
AC	TCAA	5	6	17	28	17.86
AC	AAT	4	12	10	26	15.38
AAC	TCAA	9	14	16	39	23.07
AAC	AAT	4	10	12	26	15.38
AT	TCAA	14	5	21	40	35.00
AT	AAT	16	5	8	29	55.17
Total		52	52	84	188	27.65

120-57D						
AC	TCAA	5	5	13	23	21.74
AC	AAT	10	6	17	33	30.30
AAC	TCAA	13	6	8	27	48.15
AAC	AAT	4	11	10	25	16.00
AT	TCAA	21	6	14	41	51.22
AT	AAT	13	13	10	36	36.11
Total		66	47	72	185	35.67

C-24D a120-57D: Tratamientos salinos descritos en la Tabla 1.

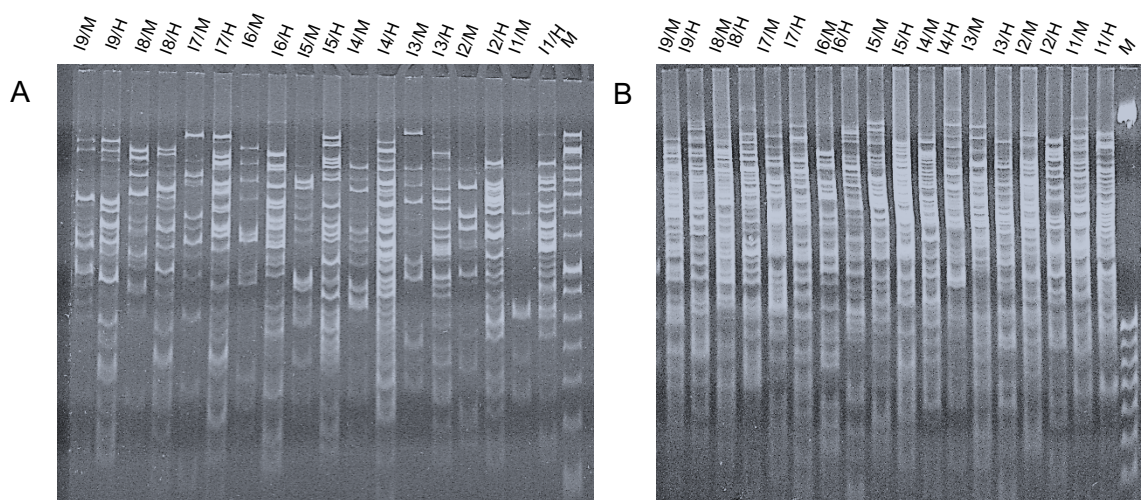


Figura 18. Loci amplificados con la combinación 4 (ver Tabla 1) de iniciadores selectivos de *EcoRI*–*MspI*/*HpaII* para plantas de *Physalis ixocarpa* no estresadas y plantas sometidas a los tratamientos A: C-24D y B: 120-24D. La descripción de los tratamientos aparece en la Tabla 1), separados en geles de acrilamida al 6%. M: marcador de peso molecular; I: individuo; H: enzima *HpaII*; M: enzima *MspI*.

La variabilidad epigenética de *P. ixocarpa* crecida bajo los diferentes tratamientos salinos analizados se estimó con el índice de diversidad de Nei, el índice de diversidad de Shannon, y el polimorfismo (%) (Tabla 12). De acuerdo a esas medidas de variabilidad, el tratamiento C-24D fue el epigenéticamente más variable, mientras que el tratamiento 120-57D fue el más homogéneo. Las diferencias en los niveles de variabilidad epigenética entre las plantas control a diferentes tiempos, puede representar los niveles naturales de la especie (ya que esas plantas no sufrieron estrés salino) que responden a los cambios en el desarrollo de las plantas. El polimorfismo encontrado para las plantas no estresadas de 24 días de edad (tratamiento C-24D) es similar a los encontrados para una

variedad de *Brassica oleracea* (30 %) reportada por Salmón *et al.* (2008) y para berro (*Rorippa nasturtium aquaticum*) (31.25%) reportado por Gutiérrez (2018).

Las diferencias de variabilidad epigenética entre las plantas estresadas y sus respectivos controles se pueden atribuir a los efectos del estrés salino al cual fueron sometidas. De la Tabla 12 se puede observar que la variabilidad epigenética de las plantas dentro de un mismo tratamiento salino disminuye con respecto a su control.

Tabla 12. Índices de diversidad (Nei y Shannon) y porcentaje de loci polimórficos de plantas de *Physalis ixocarpa* crecidas dentro de mismo tratamiento salino.

Tratamiento	Índice de diversidad de Nei	Índice de diversidad de Shannon	Porcentaje de loci polimórfico (%)
C-24D	0.12	0.18	34.74%
120-24D	0.04	0.07	13.62%
C-42D	0.10	0.15	28.17%
120-42D	0.07	0.11	21.60%
C-57D	0.04	0.06	12.21%
120-57D	0.03	0.04	8.45%

La descripción de los tratamientos aparece en la Tabla 1.

Para estimar la diferenciación epigenética entre las plantas de *P. ixocarpa* de los diferentes tratamientos salinos analizados se calcularon los valores de identidad y distancia epigenéticas. Estos índices se desarrollaron para estimar la diferenciación genética entre grupos; sin embargo, se han utilizado para estimar la diferenciación epigenética (Gutiérrez, 2018). Entre estos dos índices existe una relación inversa (Nei, 1987), los resultados se presentan en la Tabla 13. Los tratamientos C-42D y C-24D presentaron la mayor cercanía epigenética, porque entre ellos existe el mayor valor de identidad epigenética y el menor valor de distancia epigenética. La mayor distancia epigenética y menor identidad epigenética se presentó entre los tratamientos 120-42D y 120-24D.

Tabla 13. Diferenciación epigenética de *Physalis ixocarpa* crecida a dos condiciones salinas durante diferentes tiempos de exposición.

Tratamiento	C-24D	120-24D	C-42D	120-42D	C-57D	120-57D
C-24D	****	0.86	0.96	0.88	0.90	0.88
120-24D	0.14	****	0.90	0.84	0.87	0.86
C-42D	0.03	0.09	****	0.92	0.94	0.92
120-42D	0.11	0.16	0.07	****	0.91	0.89
C-57D	0.10	0.13	0.05	0.08	****	0.95
120-57D	0.12	0.14	0.07	0.10	0.04	****

Identidad genética (arriba de la diagonal), distancia epigenética (debajo de la diagonal).

6.4.1. ACP y análisis de agrupamiento basados en los patrones de metilación de *Physalis ixocarpa* var *Rendidora* crecidas en condiciones diferentes de salinidad

Los resultados del ACP basado en los patrones de metilación de *P. ixocarpa* no estresada y estresada con 120 mM de NaCl se presentan en la Figura 17. En la Figura se puede observar que los componentes 1 y 2 (PC1 y PC2) representan el 52% de la varianza. Estos resultados muestran la clara discriminación entre las plantas de *P. ixocarpa* de los diferentes tratamientos salinos analizados, lo cual indica que las diferencias epigenéticas generadas por las diferentes condiciones de crecimiento y también por el desarrollo natural propio de la especie (las plantas control a tres diferentes tiempos) son de tal magnitud que permiten discriminar entre ellas. Estas diferencias epigenéticas pueden sustentar el desarrollo de marcadores epigenéticos que podrían ser útiles en programas de mejoramiento y de expansión de área de cultivo para la especie.

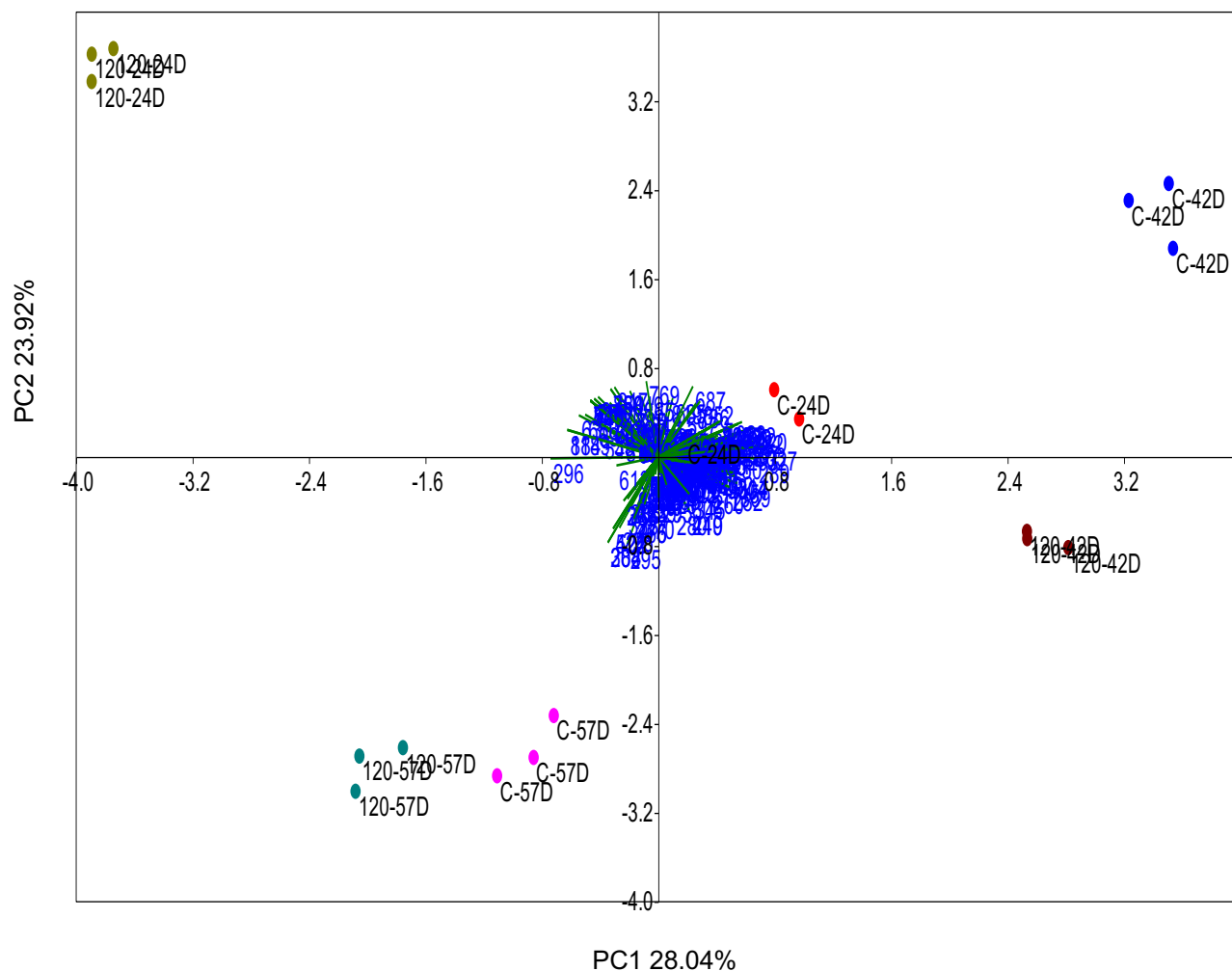


Figura 19. Análisis de componentes principales basado en los patrones de metilación de *Physalis ixocarpa* crecida bajo dos condiciones de salinidad durante diferentes tiempos de exposición. Los tratamientos aparecen en círculos de colores diferentes, representando tres réplicas, y se describen en la Tabla 1.

Los resultados del análisis de agrupamiento basado en los patrones de metilación de *P. ixocarpa* var Rendidora crecida bajo los tratamientos salinos analizados se presentan en la Figura 18. Este análisis confirmó la discriminación de las plantas de tomatillo de los diferentes tratamientos que se evidenció por el ACP. La Figura 18 muestra la formación de dos grupos principales, uno formado por las plantas de los tratamientos C-24D, 120-42D, y C-42D. El segundo grupo estuvo

formado por los tratamientos 120-24D, C-57D, y 120-57D. Esta asociación sugiere que las plantas de los tratamientos que formaron cada grupo principal son epigenéticamente más similares entre sí que cualquiera de ellas con las del otro grupo. A pesar de esa similitud, las plantas de cada tratamiento pudieron discriminarse de las de cualquier otro tratamiento, ya que formaron grupos individuales. Los presentes resultados están de acuerdo con lo reportado por Mirouze y Paskowki (2011), acerca de que los factores ambientales alteran los patrones de metilación del ADN. Este análisis sustenta los resultados presentados previamente en el presente estudio sobre la variabilidad epigenética entre las plantas de un mismo tratamiento (Tabla 12), ya que cada réplica dentro del grupo de un mismo tratamiento forma un subgrupo.

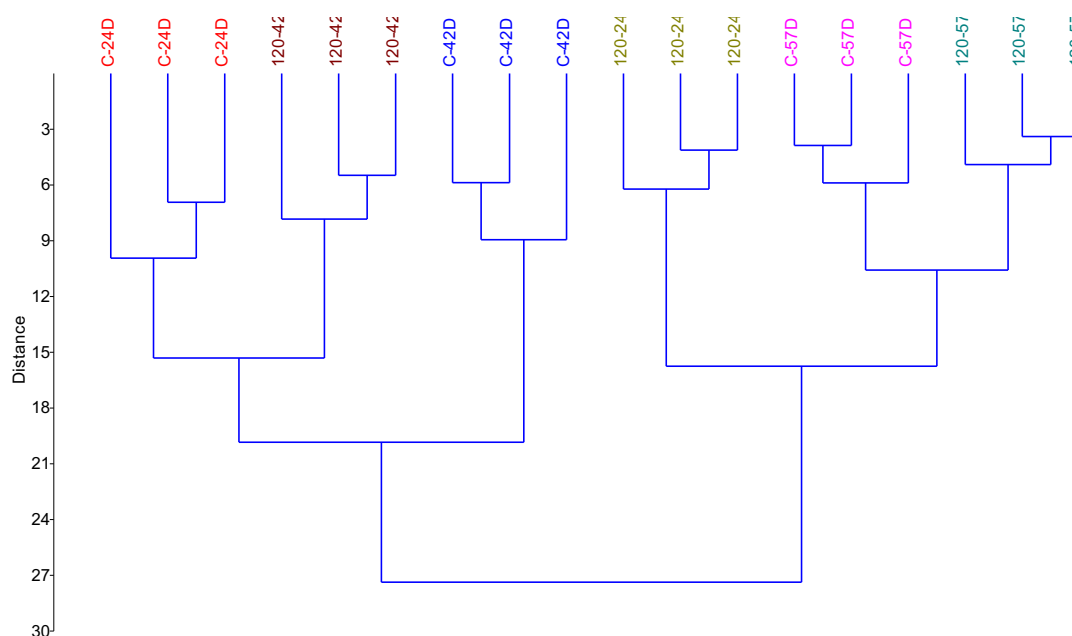


Figura 20. Análisis de agrupamiento sobre los patrones de metilación de *P. ixocarpa* crecidas en condiciones de salinidad.

7. CONCLUSIONES

- *Physalis ixocarpa* puede catalogarse como una especie moderadamente tolerante a la sal, ya que fue capaz de crecer y desarrollarse bajo una concentración de NaCl de 120 mM durante un periodo de 57 días.
- Los diferentes tratamientos salinos (diferente concentración de NaCl durante tiempos cortos, medios, o largos de exposición) afectaron de manera diferencial caracteres morfométricos de *P. ixocarpa*, tales como longitud de parte aérea, dimensiones de hojas, y longitud de raíz, el estrés salino teniendo efecto favorable durante tiempos cortos y medios de exposición. Este efecto diferencial puede tener importancia agronómica para el cultivo de la especie.
- Los diferentes tratamientos también afectaron de manera diferencial la acumulación de diversos compuestos fenólicos y de carotenoides, así como de prolina y la actividad de CAT y SOD, lo que puede ayudar a establecer las condiciones adecuadas para favorecer la acumulación de diferentes metabolitos bioactivos y del aminoácido prolina en los tejidos foliares de *P. ixocarpa*.
- Los contenidos de fenoles totales y taninos incrementaron de una manera dependiente de la concentración de NaCl, sugiriendo un papel protector contra la salinidad para *P. ixocarpa*, únicamente en el tiempo corto de exposición. Los de los ácidos fenólicos mostraron una dependencia similar únicamente en la exposición crónica, mientras que el contenido de prolina mostró esa dependencia bajo cualquiera de los tratamientos analizados. Por esta razón, se asumió que la prolina tiene un papel sobresaliente como protector contra el estrés salino en *P. ixocarpa*. La acumulación de prolina de manera dependiente de la concentración de NaCl se ha encontrado para otras especies de Solanaceae, por lo que se sugiere que puede ser una estrategia común entre elementos de la familia, aunque es necesario analizar la respuesta en número mayor de especies de Solanaceae.

- La composición fenólica foliar, cuantitativa y cualitativa, de *P. ixocarpa* fue variable debido al desarrollo y crecimiento mismo de las plantas y debido también a las diferentes condiciones salinas. El número máximo de compuestos fenólicos encontrado fue de ocho, uno fue un derivado 3-O-glicósido del flavonol quercetina, otro un derivado 3-O-glicósido del flavonol canferol, y seis ácidos fenólicos, entre ellos dos derivados del ácido *p*-cumárico. El compuesto **3**, un ácido fenólico, sobresalió por incrementar su concentración más de 26 veces en el tratamiento crónico de exposición a 120 mM de NaCl. El registro de este tipo de cambios en la concentración de compuestos fenólicos individuales puede ser de utilidad para dirigir la acumulación selectiva de bioproductos de interés.

- Comparada con la composición fenólica reportada para otras especies de *Physalis*, la de *P. ixocarpa* fue única, al igual que la de las otras especies del género, por lo que se apoya la propuesta de que la composición fenólica de plantas tiende a ser especie-específica.

- Las respuestas químicas y bioquímicas de *P. ixocarpa* crecida bajo diferentes tratamientos salinos fue específica para las plantas dentro de cada tratamiento. Por ello fue posible, por medio de ACP y análisis de agrupamiento, discriminar entre ellas. Por esto se propone que la caracterización química y bioquímica puede sustentar el desarrollo de marcadores con relevancia agronómica y como parámetro de control de calidad para la especie.

- La concentración de NaCl y el tiempo de exposición a ella tuvieron efectos diferenciales sobre las diferentes respuestas químicas y bioquímicas analizadas. El tiempo de exposición principalmente afectó la concentración de FT, CR, y la actividad de CAT, mientras que la concentración de sal principalmente afectó la concentración de fenoles totales, taninos condensados, ácidos fenólicos, contenido de prolina, y actividad de SOD.

- Seis combinaciones de iniciadores selectivos revelaron niveles variables de metilación en los tejidos foliares de *P. ixocarpa* crecida en los diferentes tratamientos salinos analizados. Bajo la concentración de 120 mM de NaCl y durante los tiempos corto y medio de exposición, los niveles disminuyeron comparados con los controles respectivos; sin embargo, aumentaron después de la exposición crónica. Los diferentes niveles encontrados, como las respuestas química y bioquímicas, permitieron discriminar entre las plantas de cada tratamiento, por lo que pueden sustentar el desarrollo de marcadores epigenéticos útiles en programas de desarrollo y mejoramiento de variedades.

- *Physalis ixocarpa* ha desarrollado un sistema complejo de protección contra el estrés salino. La participación de las diferentes respuestas es dinámica y complementaria, y es diferencialmente modulada por la intensidad de la salinidad y por el tiempo que dura esa intensidad. Debido a esto, es necesario registrar las respuestas no únicamente durante un tiempo corto, sino después de una exposición crónica para estar en condiciones de determinar el potencial de adaptación al estrés salino de plantas económicamente importantes, tal como *P. ixocarpa*, ya que ese registro puede tener implicaciones agronómicas en el cultivo, en la expansión del área de cultivo, y en el fitomejoramiento, así como en el control de calidad de las plantas y de sus partes comestibles y/o medicinales.

8. RECOMENDACIONES

- Se recomienda hacer una exploración más amplia de las respuestas de *P. ixocarpa* al estrés salino, considerando niveles más altos de salinidad y periodos de exposición más largos, abarcando la etapa de desarrollo GS4.
- Se recomienda analizar los cuatro tipos de respuestas (morfométricas, químicas, bioquímicas, y epigenéticas) para los frutos de *P. ixocarpa*, los cuales son las estructuras comestibles de la especie.

9. LITERATURA CITADA

- Ahanger MA., Alyemeni MN., Wijaya L., Alamri SA., Alam P., Ashraf M., Ahmad P. (2018) Potential of exogenously sourced kinetin in protecting *Solanum lycopersicum* from NaCl induced oxidative stress through up-regulation of the antioxidant system, ascorbateglutathione cycle and glyoxalase system. *Plos One*; 13: e0202175.
- Aina R., Sgorbati S., Santagostino A., Labra M., Citterio S. (2004) Specific hypomethylation of DNA is induced by heavy metals in white clover and industrial hemp. *Physiologia Plantarum*. 121: 472-480.
- Akram M., Ashraf MY., Ahmad R., Waraich EA., Iqbal J., Mohsam M. (2010). Screening for salt tolerance in maize (*Zea mays* L.) hybrids at an early seedling stage. *Pakistan Journal of Botany*, 42: 141-154
- Al-Karaki GN. (2000) Growth, water use efficiency, and sodium and potassium acquisition by tomato cultivars grown under salt stress. *Journal of Plant Nutrition* 23:1-8.
- Alam, SM. (1999). Nutrient uptake by plants under stress conditions. Handbook of plant and crop stress, 2: 285-313.
- Álaves-Gómez V., Jardón-Barbolla LO., Wegier-Briuolo AL., Piñero D., Martínez M. (2009) Recopilación de información acerca de la evolución del género *Physalis* en México y del origen y diversidad de *Physalis philadelphica* Lam. (tomate verde). Primer informe parcial del proyecto Generación y recopilación de información de las especies de las que México es centro de origen y diversidad, México.
- Ali G., Neda G. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of medicinal plants research*, 5: 6697-6703.
- Almaraz-Abarca N., da Graça Campos M., Avila-Reyes JA., Naranjo-Jimenez N., Corral JH., Gonzalez-Valdez LS. (2007). Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 119-124.
- Almaraz-Abarca N., González-Elizondo MS., Tena-Flores JA., Ávila-Reyes JA., Herrera-Corral J., Naranjo-Jiménez N. (2006) Foliar Flavonoids Distinguish *Pinus chihuahuana* (Coniferales: Pinaceae). Proceedings of the Biological Society of Washington 119:426-436.
- Ambriz-Pérez DL., Leyva-López N., Gutierrez-Grijalva EP., Basilio Heredia J. (2016) Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. *Cogent Food & Agriculture*, 2: 2-14.

- Argueta VA. (1994) Atlas de plantas de la medicina tradicional Mexicana (The Plant Maps of Traditional Medicine in Mexico) Instituto Nacional Indigenista.
- Austin MB., Noel JP. (2003). The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural Product Reports*, 20: 79-110.
- Ávila-Reyes JA., Almaraz-Abarca N., Chaidez-Ayala Al., Ramirez-Noya D., Delgado-Alvarado EA., Torres-Ricario R., Naranjo-Jiménez N., Alanís-Bañuelos RE. (2018). Foliar phenolic compounds of ten wild species of Verbenacea as antioxidants and specific chemomarkers. *Brazilian Journal of Biology*, 78: 98-107
- Ayala P., J., P. (1992). Caracterización de germoplasma de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot) en Chapingo, México. Tesis de Licenciatura, Departamento de Fitotecnia, UACH. 62 pp.
- Barriada-Bernal LG., Almaraz-Abarca N., Delgado-Alvarado EA., Gallardo-Velázquez T., Ávila-Reyes JA., Torres-Morán MI., González-Elizondo MS., Herrera-Arrieta Y. (2014) Flavonoid composition and antioxidant capacity of the edible flowers of *Agave durangensis* (Agavaceae). *CyTA-Journal of Food*, 12: 105-114.
- Bates LS., Waldren RP., Teare ID. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.
- Beauchamp C., Fridovich I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44: 276-287.
- Bender J. (1998) Cytosine methylation of repeated sequences in eukaryotes: the role of DNA pairing. *Trends in Biochemical Sciences* 23: 252–256
- Berker KI., Güçlü K., Tor I., Apak R. (2007) Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72: 1157-1165.
- Bhandal IS., Malik CP. (1988) Potassium estimation, uptake and its role in the physiology and metabolism of flowering plants. *International Review of Cytology*, 110: 205-254.
- Bi B., Tong Q., Wan C., Wang K., Han F. (2022) *Pinus sylvestris* var. mongolica mediates interspecific belowground chemical interactions through root exudates. *Forest Ecology and Management* 511: 120158.
- Bilichak A., Ilnystkyy Y., Hollunder J., Kovalchuk I. (2012). The progeny of *Arabidopsis thaliana* plants exposed to salt exhibit changes in DNA methylation, histone modifications and gene expression. *PLoS One*, 7: e30515

-
- Bock MA., Sanchez-Pilcher J., McKee LJ., Ortiz M. (1995). Selected nutritional and quality analyses of tomatillos (*Physalis ixocarpa*). *Plant Foods Human Nutrition*, 48:127–133.
- Bohnert HJ., Ostrem JA., Cushman JC. (1988) *Mesembryanthemum crystallinum*, a higher plant model for the study of environmentally induced changes in gene expression. *Plant Molecular Biology Reporter*, 6:10–28.
- Bohra JS., Doerffling K. (1993) Potassium nutrition of rice (*Oryza sativa* L.) varieties under NaCl salinity. *Plant Soil*, 152: 299-303.
- Bonasio R., Tu S., Reinberg D. (2010) Molecular signals of epigenetic states. *Science*, 330: 612–616.
- Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H., Marzouk B. (2008). Phenolic composition and biological activities of *Tunisian Nigella sativa* L. shoots and roots. *Comptes Rendus Biologies*, 331: 48-55.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brand-Williams W., Cuvelier ME., Berset C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- Caceres A., Alvarez AV., Ovando AE., Samayoa BE. (1991) Plants used in Guatemala for treatment of respiratory diseases. Screening of 68 plants against Gram-positive bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 31: 193-208
- Campos MG., Markham KM. (2007) Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: Flavones, flavonols and phenolic acids. Coimbra: Coimbra University Press.
- Cantwell MJ., Flores-Minutti A., Trejo-González A. (1992) Developmental changes and postharvest physiology of tomatillo fruits (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Scientia Horticulturae*, 50: 59-70.
- Caretto S., Linsalata V., Colella G., Mita G., Lattanzio V. (2015) Carbon Fluxes between Primary Metabolism and Phenolic Pathway in Plant Tissues under Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 26378-26394.
- Cebeci E., Hanci F. (2015) The influences of different salinity levels on germination performance of golden berry, (*Physalis peruviana* L.) seeds. *Direct Research Journal Agriculture and Food Science*, 3(2):26-29.
- Celikli FB., Akkelle P., Onus AN. (2017) In vitro salinity evaluation studies in golden berry (*Physalis peruviana* L.). *Biotechnology Journal International*, 20:1-8.

- Cerdá A., Pardines J., Botella MA., Martínez V. (1995) Effect of potassium on growth, water relations, and the inorganic and organic solute contents for two maize cultivars growth under saline conditions. *Journal Plant Nutrition*, 18: 839-851.
- Chance B., Maehly AC. (1955) Assay of catalases and peroxidases. En: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in enzymology*. New York: Academic 764-5
- Chelikani P., Fita I., Loewen PC. (2004) Diversity of structures and properties among catalases. *Cell and Molecular Life Sciences*, 61: 192–208.
- Choi CS., Sano H. (2007) Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Molecular Genetics and Genomics*, 277: 589–600.
- Claussen W. (2005). Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant science*, 168: 241-248.
- Cobaleda-Velasco M., Alanis-Bañuelos RE., Almaraz-Abarca N., Rojas-López M., González-Valdez LS., Ávila-Reyes JA., Rodrigo S. (2017a) Phenolic profiles and antioxidant properties of *Physalis angulata* L. as quality indicators. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 5: 114-128.
- Cobaleda-Velasco M., Almaraz-Abarca N., Alanis-Bañuelos RE., Uribe-Soto JN., González-Valdez LS., Muñoz-Hernández G., Zaca-Morán O., Rojas-López M. (2017b). Rapid determination of phenolics, flavonoids, and antioxidant properties of *Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem. and *Physalis angulata* L. by infrared spectroscopy and partial least squares. *Analytical Letters*, 51: 523-536.
- Cokus SJ., Feng S., Zhang X., Chen Z., Merriman B., Haudenschild CD., Pradhan S., Nelson SF., Pellegrini M., Jacobsen SE. (2008) Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, 452: 215–219.
- Corso M., Perreau F., Mouille G., Lepiniec L. (2020) Specialized phenolic compounds in seeds: structures, functions, and regulations. *Plant Science*, 296: 110471.
- Cramer GR., Alberico GJ., Schmidt C. (1994) Salt tolerance is not associated with sodium accumulation of two maize hybrids. *Australian Journal of Plant Physiology*, 21: 675-692.
- Cramer GR., Läuchli A., Polito VS. (1985) Displacement of Ca²⁺ from the plasmalemma of root cells. *Plant Physiology*, 79: 297-211.
- Cruz-Álvarez O., Martínez-Damián M., Rodríguez-Pérez JE., Colinas-León M., Moreno-Pérez EDC. (2012) Conservación poscosecha de tomate de

- cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) con y sin cáliz. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 18: 333-344.
- Cuong DM., Kwon S-J., Van Nguyen B., Chun SW., Kim JK., Park SU. (2020) Effect of salinity stress on phenylpropanoid genes expression and related gene expression in wheat sprout. *Agronomy*, 10: 390.
- D'Arcy WG. (1991) The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. *Solanaceae III. Taxonomy, Chemistry and Evolution* 75-137.
- Dasgupta S., Hossain M., Huq M., Wheeler D. (2015). Climate change and soil salinity: The case of coastal Bangladesh. *Ambio*, 44: 815-826.
- De Leon TB., Linscombe S., Gregorio G., Subudhi PK. (2015). Genetic variation in Southern USA rice genotypes for seedling salinity tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 6: 374.
- De Souza CLM., De Souza MO., De Oliveira LM., Pelacani CR. (2014). Effect of priming on germinability and salt tolerance in seeds and seedlings of *Physalis peruviana* L. *African Journal of Biotechnology*, 13:1955-1960.
- De Souza M, Pelacani CR., Willems LAJ., de Castro RD., Hilhorst HWM, Ligterink W. (2016). Effect of osmopriming on germination and initial growth of *Physalis angulate* L. under salt stress and on expression of associated genes. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88: 503-516
- Del Baño MJ, Lorente J, Castillo J, Benavente-García O, Del Río J A, Ortuño A, Quirin K W, Gerard D (2003). Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4247-4253.
- Del Valle JC., Buide ML., Casimiro-Soriguer I., Whittall JB., Narbona E. (2015) On flavonoid accumulation in different plant parts: variation patterns among individuals and populations in the shore campion (*Silene littorea*). *Frontiers in Plant Science*, 6: 939.
- Dimayuga RE., Virgen M., Ochoa N. (1996) Antimicrobial activity of medicinal plants from Baja California Sur (México) *Pharmaceutical Biology*, 36: 33-43.
- Drost-Karbowska K., Ellnain-Wojtaszek M., Gawron-Gzella A., Kowalewski Z., Jankiewicz LS., Matlawaska I., Sikorska M., Szaupafer MH., Walkowiak A (1993) Phytochemical investigation of the tomatillo fruit (*Physalis ixocarpa* Brot., Solanaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 62: 155-159.
- Du, Y., Wang, Z. (2011) Methylation-sensitive amplified polymorphism analysis of DNA methylation in *Arabidopsis* under mannitol treatment. *Chinese Bulletin of Botany*, 46: 285–292.

- Duncan E., Gluckman P., Dearden P. (2014) Epigenetics, plasticity, and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype? *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 322: 208–220.
- Esringü A., Kant C., Yildirim E., Karlidag H., Turan M. (2011) Ameliorative effect of foliar nutrient supply on growth, inorganic ions, membrane permeability, and leaf relative water content of *Physalis* plants under salinity stress. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 42: 408-423.
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331: 372-379.
- FAO (2008) Land and Plant Nutrition Management Service. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>.
- Farooq F., Rashid N., Ibrar D., Hasnain Z., Ullah R., Nawaz M., Irshad S., Basra SMA., Alwahibi MS., Elshikhl MS., Dvorackova H., Dvoracekl J., Khanl S. (2022) Impact of varying levels of soil salinity on emergence, growth and biochemical attributes of four *Moringa oleifera* landraces. *PLoS ONE*, 17: e0263978.
- Farooq M., Ahmad R., Shahzad M., Sajjad Y., Hassan A., Shah MM., Naz S., Khan SA. (2021) Differential variations in total flavonoid content and antioxidant enzymes activities in pea under different salt and drought stresses. *Scientia Horticulturae*, 287: 110258.
- Flowers TJ. (2004) Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 55: 307-319.
- Forestan C., Farinati S., Zambelli F., Pavesi G., Rossi V., Varotto S. (2020) Epigenetic signatures of stress adaptation and flowering regulation in response to extended drought and recovery in *Zea mays*. *Plant Cell & Environment*, 43: 55–75
- Fulneček J., Kovařík A. (2014) How to interpret methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP) profiles?. *BMC Genetics*, 15: 1-9.
- Fusari CM., Nazareno MA., Locatelli DA., Fontana A., Beretta V., Camargo AB. (2020) Phytochemical profile and functionality of Brassicaceae species. *Food Bioscience*, 36: 100606.
- Gallusci P., Dai Z., Génard M., Gauffretau A., Leblanc-Fournier N., Richard-Molard C., Vile D., Brunel-Muguet S. (2017) Epigenetics for plant improvement: Current knowledge and modeling avenues. *Trends in Plant Science*, 22: 610-623.

- García ME., Medina Villafañe R. (2009) Acumulación de iones y solutos orgánicos en hojas de plantas de caña de azúcar en dos tabloncillos comerciales afectados por sales. *Bioagro*, 21: 87-98.
- Garg R., Chevala VVSN., Shankar R., Jain M., (2015) Divergent DNA methylation patterns associated with gene expression in rice cultivars with contrasting drought and salinity stress response. *Scientific Reports*, 5: 1–16.
- Gautam SK., Dwivedi DH., Kumar P. (2015) Preliminary studies on the bioactive phytochemicals in extract of Cape gooseberry (*Physalis Peruviana* L.) fruits and their products. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3: 93-95.
- Ge CL., Yang XY., Liu XN., Sun JH., Luo SS., Wang ZG. (2002) Effect of heavy metal on levels of methylation in DNA of rice and wheat. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 28: 363–368 (in Chinese with English abstract).
- Gengmao Z., Yu H., Xing S., Shihui L., Quanmei S., Changhai W. (2015) Salinity stress increases secondary metabolites and enzyme activity in safflower. *Industrial Crops and Products*, 64: 175-181.
- Ghanem A-MFM., Mohamed E., Kasem AMMA., El-Ghamery AA. (2021) Differential salt tolerance strategies in three halophytes from the same ecological habitat: Augmentation of antioxidant enzymes and compounds. *Plants* 10: 1100.
- Ghasemzadeh A., Ghasemzadeh N. (2011) Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5: 6697-6703.
- Gill SS., Anjum NA., Yadav S., Hasanuzzaman M., Fujita M., Mishra P, Sabat CS., Tujeta N. (2015) Superoxide dismutase- mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 22: 10375-10394
- Glatter E. (1991) Withanolids and related ergostane-type steroids. *Natural Product Reports*, 8: 415-440.
- González-Elizondo M., González-Elizondo S., Herrera-Arrieta Y. (1991) Listados florísticos de México IX. Flora de Durango. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- González-Elizondo MS., González-Elizondo M., Márquez-Linares MA. (2007) Vegetación y ecorregiones de Durango. Plaza y Vadéz-CIIDIR IPN, México.
- González-Mendoza D., Grimaldo-Juárez O., Soto-Ortiz R., Escoboza-García F., Santiaguillo HJF. (2010) Evaluation of total phenolics, anthocyanins and

- antioxidant capacity in purple tomatillo (*Physalis ixocarpa*) genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 9:5173-5176.
- Gorham J., Wyn R., Jones McDonell E. (1985) Some mechanisms of salt tolerance in crop plants. *Plant Soil*, 89: 15-40.
- Gratt S., Grieve C. (1999) Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 78: 127-157.
- Gutiérrez VMV. (2018) Efecto de condiciones ambientales de estrés sobre metabolitos secundarios y perfiles de metilación genómica de berro común (*Rorippa nasturtium aquaticum*). Tesis de Doctorado. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional unidad Durango, Instituto Politécnico Nacional, México.
- Gutiérrez-Velázquez MV., Almaraz-Abarca N., Herrera-Arrieta Y., Ávila-Reyes JA., González-Valdez LS., Torres-Ricario R., Monreal-García HM. (2018). Comparison of the phenolic contents and epigenetic and genetic variability of wild and cultivated watercress (*Rorippa nasturtium* var. *aquaticum* L.). *Electronic Journal of Biotechnology*, 34: 9-16.
- Hanin M., Ebel C., Ngom M., Laplaze L., Masmoudi K. (2016) New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1787.
- Hernández J., Yañez S. (2009) Aprovechamiento tradicional de las especies de *Physalis* en México. *Revista de Geografía Agrícola*, 43: 81-86.
- Hernández JFS., Yáñez SB. (2009) Aprovechamiento tradicional de las especies de *Physalis* en México. *Revista de Geografía*, 43: 81-86.
- Hernández-Pacheco CE., Almaraz-Abarca N., Rojas-López M., Torres-Ricario R., Ávila-Reyes JA., González-Valdez LS., Delgado-Alvarado EA., Moreno-Anguiano O., Uribe-Soto JN. (2022) Salinity generates variable chemical and biochemical responses in *Physalis ixocarpa* (Solanaceae) during different times of exposure. *Electronic Journal of Biotechnology*, 59: 25-35.
- Heuer B. (2003) Influence of exogenous application of proline and glycinebetaine on growth of salt-stressed tomato in the physiology and metabolism of flowering plants. *Internat. Rev. Cytol.* 110:205-254. *Journal of Plant Nutrition*, 18: 839-851.
- Hrazdina G. (1992). Biosynthesis of flavonoids, in R. W. Hemingway, O. E. Laks (eds.) *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance*, New York, Plenum Press, pp. 61-72.
- Hussain G., Huang J., Rasul A., Anwar H., Imran A., Maqbool J., Razzaq A., Aziz N., Makhdoom EH., Konuk M., Sun T. (2019) Putative roles of plant-derived

- tannins in neurodegenerative and neuropsychiatry disorders: An updated review. 2019. *Molecules*, 24: 2213.
- Jacoby B. (1994) Mechanisms involved in salt tolerance by plants. In: Handbook of Plant and Crop Stress. M. Pessarakli (ed). Marcel Dekker, New York. pp:97-145.
- Jaleel CA., Manivannan P., Sankar B., Kishorekumar A., Gopi R., Somasundaram R., Panneerselvam R. (2007) Induction of drought stress tolerance by ketoconazole in *Catharanthus roseus* is mediated by enhanced antioxidant potentials and secondary metabolite accumulation. *Colloids and Surfaces Biointerfaces*, 60: 201–206.
- Julkunen-Tiitto R. (1985) Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 33: 213-217.
- Kaplan I., Halitschke R., Kessler A., Sardanelli S., Denno RF. (2008). Constitutive and induced defenses to herbivory in above-and belowground plant tissues. *Ecology*, 89: 392-406.
- Karan R., DeLeon T., Biradar H., Subudhi P.K. (2012) Salt stress induced variation in DNA methylation pattern and its influence on gene expression in contrasting rice genotypes. *PLoS One*, 7: e40203.
- Karan R., DeLeon T., Biradar H., Subudhi PK. (2012). Salt stress induced variation in DNA methylation pattern and its influence on gene expression in contrasting rice genotypes. *PloS One*, 7: e40203.
- Kasali FM., Ali MS., Tusiimire J., Lateef M., Omole RA., Kadima JN., Agaba AG. (2022) Phytochemical constituents found in *Physalis peruviana* L. leaf extracts and their ability to inhibit alpha-glucosidase and scavenge DPPH free radicals in vitro. *Trends in Phytochemical Research*, 6: 3-10.
- Kasali FM., Tusiimire J., Kadima JN., Tolo CU., Weisheit A., Agaba AG. (2021) Ethnotherapeutic Uses and Phytochemical Composition of *Physalis peruviana* L.: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2021: 5212348.
- Kathare JM., Mbaria JM., Nguta JM., Moriasi GA. (2021) Antimicrobial, cytotoxicity, Acute Oral Toxicity and Qualitative Phytochemical Screening of the Aqueous and Methanolic Extracts of *Physalis peruviana* L (Solanaceae). *Applied Microbiology*, 7: 189.
- Khan W., Bakht J., Shafi M. (2016) Antimicrobial potentials of different solvent extracted samples from *Physalis ixocarpa*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29: 467-475.

-
- Kiokias S., Proestos C., Varzakas T. (2016) A review of the structure, biosynthesis, absorption of carotenoids-analysis and properties of their common natural extracts. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 4:25–37.
- Leidi E., Pardo JM. (2002) Tolerancia de los cultivos al estrés salino: qué hay de nuevo. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 2: 69-90
- Li Y., Zhang T., Zhang Z., He K. (2019) The physiological and biochemical photosynthetic properties of *Lycium ruthenicum* Murr in response to salinity and drought. *Scientia Horticulturae*, 256: 108530.
- Lim J-H., Park K-J., Kim B-K., Jeong J-W., Kim H-J. (2012) Effect of salinity stress on phenolic compounds and carotenoids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) sprout. *Food Chemistry*, 135: 1065-1070.
- Linić I., Šamec D., Grúz J., Bok VV., Strnad M., Salopek-Sondi B. (2019) Involvement of phenolic acids in short-term adaptation to salinity stress is species-specific among Brassicaceae. *Plants*, 8:155.
- Lira-Madeiros CF., Parisod C., Fernandes RA., Mata CS., Cardoso MA., Ferreira PCG. (2010) Epigenetic variation in Mangrove plants occurring in contrasting natural environment. *PloS One*, 5: e10326
- Lück, H. (1965) Catalase. In *Methods of enzymatic analysis* (pp. 885-894). Academic Press.
- Luo XD., Basile MJ., Kennelly EJ. (2002). Polyphenolic antioxidants from the fruits of *Chrysophyllum cainito* L. (star apple). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1379-1382.
- Lustre H. (2022) Los superpoderes de las plantas: los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa. *Revista Digital Universitaria (rdu)*, 23(2): 1-8.
- Mahajan S., Tuteja N. (2005) Cold, salinity and drought stress: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 139-158
- Makino B., Kawai M., Kito K., Yamamura H., Butsugan Y. (1995) New physalins possessing an additional carbon-carbon bond from *Physalis alkekengi* var. Francheti. *Tetrahedron*, 51: 12529-12538.
- Manchanda G., Garg N. (2008) Salinity and its effects on the functional biology of legumes *Acta Physiologiae Plantarum*, 30: 595-618.
- Martínez M. (1998) Revisión de *Physalis* sección *Epeteiorhiza* (Solanaceae). *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica*, 69:71–117

-
- Martínez M. (1999) Infrageneric taxonomy of *Physalis*. In: *Solanaceae IV: Advances in biology and utilization* (Eds: Nee, M., DE Symon, RN Lester, JP Jessop). Kew Royal Botanic Gardens. United Kingdom, pp. 275-283.
- Martínez M., Rodríguez A., Vargas O., Chiang F. (2011) Catálogo nomenclatural de las Solanaceae de México. Universidad Autónoma de Querétaro. Informe Final SNIB-CONABIO. Proyecto HS004, México.
- Martínez V., Cerdá A. (1989) Nitrate reductase activity in tomato and cucumber leaves as influenced by NaCl and N source. *Journal of Plant Nutrition*, 12:1335-1350.
- Martínez V., Mestre TC., Rubio F., Girones-Vilaplana A., Moreno DA., Mittler R., Rivero RM. (2016) Accumulation of flavonols over hydroxycinnamic acids favors oxidative damage protection under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 7: 838.
- Maruenda H., Cabrera R., Cañari-Chumpitaz C., Lopez JM., Toubian D. (2018) NMR-based metabolic study of fruits of *Physalis peruviana* L. grown in eight different Peruvian ecosystems. *Food Chemistry*, 262: 94-101.
- Mastan SG., Rathore MS., Bhatt VD., Yadav P., Chikara J. (2012) Assessment of changes in DNA methylation by methylation sensitive amplification polymorphism in *Jatropha curcas* L. subjected to salinity stress. *Gene*, 508: 125–129.
- Mazher AMA., El-Quesni EMF., Farahat MM. (2007) Responses of ornamental plants and Woody trees to salinity. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3: 386-395.
- Medina-Medrano JR., Almaraz-Abarca N., González-Elizondo MS., Uribe-Soto JN., González-Valdez LS., Herrera-Arrieta Y. (2015) Phenolic constituents and antioxidant properties of five wild species of *Physalis* (Solanaceae). *Botanical Studies*, 56: 24.
- Meena A, Dubey MK, Meena M, Upadhyay RS. (2016) Mannitol and proline accumulation in *Lycopersicum esculentum* during infection of *Alternaria alternata* and its toxins. In: *Proceedings of the Fourth International Conference on Advances in Applied Science and Environmental Technology*, New York, USA, 7-8 May; pp. 36-40.
- Meyer P. (2015) Epigenetic variation and environmental change. *Journal of Experimental Botany*, 66: 3541–3548.
- Mierziak J., Kostyn K., Kulma A. (2014) Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19: 16240-16265.

- Miranda D., Fischer G., Mewis I., Rohn S., Ulrichs C. (2014) Salinity effects on proline accumulation and total antioxidant activity in leaves of the cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87: 67-73.
- Miranda D., Fischer G., Ulrichs C. (2010a) Growth of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) plants affected by salinity. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 83:175-181.
- Miranda D., Ulrichs C., Fischer G. (2010b) Imbibition and percentage of germination of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) seeds under NaCl stress. *Agronomía Colombiana*, 28(1):29-35.
- Mirkovic T., Ostroumov EE., Anna JM., van Grondelle R., Govindjee R., Scholes GD. (2017) Light absorption and energy transfer in the antenna complexes of photosynthetic organisms. *Chemical Reviews*, 117: 249–293.
- Mirouze M., Paskowski J. (2011) Epigenetics contribution to stress adaptation in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 14: 267-274.
- Modesto I., Sterck L., Arbona V., Gómez-Cadenas A., Carrasquinho I., Van de Peer Y., Miguel CM. (2021) Insights into the mechanisms implicated in *Pinus pinaster* resistance to pinewood nematode. *Frontiers in Plant Science*, 12: 690857.
- Mohammad M., Shibli R., Ajlouni, Nimri L. (1998) Tomato root and shoot responses to salt stress under different leaves of phosphorus nutrition. *Journal of Plant Nutrition*, 21: 1667-1680,
- Monroy-Velandia D., Coy-Barrera E. (2021) Effect of Salt Stress on Growth and Metabolite Profiles of Cape Gooseberry (*Physalis peruviana* L.) along Three Growth Stages. *Molecules*, 26: 2756.
- Montané X., Kowalczyk O., Reig-Vano B., Bajek A., Roszkowski K., Tomczyk R., Pawliszak W., Giamberini M., Mocek-Płóćiniak A., Tylkowsk B. (2020) Current perspectives of the applications of polyphenols and flavonoids in cancer therapy. *Molecules*, 25: 3342.
- Montes-Hernández S., Aguirre A. (1994) Etnobotánica del tomate mexicano (*Physalis philadelphica* Lam) *Revista de geografía agrícola*, 20: 163-172.
- Mousavi S., Regni L., Bocchini M., Mariotti R., Cultrera NGM., Mancuso S., Googiani J., Chakerolhosseini MR., Guerrero C., Albertini E. (2019) Physiological, epigenetic and genetic regulation in some olive cultivars under salt stress. *Scientific Reports*, 9: 1093
- Muuns R., Tester M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-81. New York. pp:227-243.

- Narváez-Cuenca CE., Mateus-Gómez A., Restrepo-Sánchez LP. (2014) Antioxidant capacity and total phenolic content of air-dried cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) at different ripeness stages. *Agronomía Colombiana*, 32: 232-237.
- Nathiya M., Dorcus D. (2012) Preliminary phytochemical and anti-bacterial studies on *Physalis minima* Linn. *International Journal of Current Science*, 24-30.
- Naumova N., Nechaeva T., Savenkov O., Fotev Y. (2019) Yield and fruit properties of Husk tomato (*Physalis philadelphica*) cultivars grown in the open field in the south of West Siberia. *Horticulturae*, 5:19.
- Negro C., Tommasi, L., Miceli A. (2003). Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, 87: 41-44.
- Nei M. (1987) Molecular evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.
- Neves DM., Almeida LADH., Santana-Vieira DDS., Freschi L., Ferreira CF., Soares Filho WDS., Costa MGC., Micheli F., Coelho Filho MA., Gesteira ADS (2017) Recurrent water deficit causes epigenetic and hormonal changes in citrus plants. *Scientific Reports*, 7: 13684
- Niu X., Bressan RA., Hasegawa PM., Pardo JM. (1995) Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology*, 109: 735-742.
- Ou X., Zhang Y., Xu C., Lin X., Zang Q., Zhuang T., Liu B. (2012) Transgenerational inheritance of modified DNA methylation patterns and enhanced tolerance induced by heavy metal stress in rice (*Oryza sativa* L.).
- Oueslati S, Karray-Bouraoui N, da Attia H, Rabhi M, Ksouri R, Lachaal M. (2010) Physiological and antioxidant responses of *Mentha pulegium* (Pennyroyal) to salt stress. *Acta Physiologica Plant*, 32: 289–296
- Pagare S., Bhatia M., Tripathi N., Pagare S., Bansal YK. (2015) Secondary metabolites of plants and their role: overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9: 293-304.
- Pan Y., Wang W., Zhao X., Zhu L., Fu B., Li Z. (2011) DNA methylation alterations of rice in response to cold stress. *Plant Omics Journal*, 4: 364–369.
- Perez-Aguilar LY., Plata-Rocha W., Monjardin-Armenta SA., Franco-Ochoa C., Zambrano-Medina YG. (2021) The identification and classification of arid zones through multicriteria evaluation and geographic information systems—Case study: Arid regions of northwest Mexico. *ISPRS International Journal of Geo-Information*, 10: 720.

-
- Qados AMA. (2011). Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 10: 7-15.
- Ramírez F., Fischer G., Davenport T., Pinzón J., Ulrichs C. (2013) Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) phenology according to the BBCH phenological scale. *Scientia Horticulturae*, 162: 39-42.
- Rao AV., Rao LG. (2007) Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55:207–216
- Rosas-Medina I., Colmenero-Robles A., Naranjo-Jiménez N., Ávila-Reyes JA., Almaraz-Abarca N. (2020) La salinidad incrementa el contenido de flavonoides, de antocianinas, y el potencial hipoglucemiante de tomatillo (*Physalis ixocarpa*). *e-Cucba*, 7: 21-29.
- Salmon A., Clotault J., Jenczewski E., Chable V., Manzanares-Dauleux M. J. (2008) *Brassica oleracea* displays a high level of DNA methylation polymorphism. *Plant Science*, 174: 61-70.
- Šamec D, Linić I, Salopek-Sondi B. (2021) Salinity stress as an elicitor for phytochemicals and minerals accumulation in selected leafy vegetables of Brassicaceae. *Agronomy*, 11: 361.
- Sanchez R., Mackenzie S.A. (2016) Genome-Wide discriminatory information patterns of cytosine DNA methylation. *International Journal of Molecular Sciences* 17.
- Santa-Cruz A., Martinez-Rodriguez MM., Perez-Alfocea F., Romero-Aranda R., Bolarin MC. (2002). The rootstock effect on the tomato salinity response depends on the shoot genotype. *Plant Science*, 162: 825-831.
- Sarker U., Oba S. (2018) Catalase, superoxide dismutase and ascorbate-glutathione cycle enzymes confer drought tolerance of *Amaranthus tricolor*. *Scientific Reports*, 8: 16496.
- Scarano A, Chieppa M, Santino A. (2018) Looking at flavonoid biodiversity in horticultural crops: A colored mine with nutritional benefits. *Plants*, 7: 98.
- Scott KJ. (2001) Detection and measurement of carotenoids by UV/VIS spectrophotometry. En: Wrolstad, R.E., Acree, T.E., An, H., Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S. (Eds.), *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2018) Sistema de Información Agropecuario y Pesquero. México. www.siap.gob.mx.

- Shafi A, Zahoor I, Mushtaq U. (2019) Proline accumulation and oxidative stress: diverse roles and mechanism of tolerance and adaptation under salinity stress. In: Akhtar MS editor. Salt stress, microbes, and plant interactions: *Mechanisms and Molecular Approaches*. Singapore: Springer. p. 269-300.
- Shan X., Wang X., Yang G., Wu Y., Su S., Li S., Li H., Yuan Y. (2013) Analysis of the DNA methylation of maize (*Zea mays* L.) in response to cold stress based on methylation-sensitive amplified polymorphisms. *Journal of Plant Biology*, 56: 32–38.
- SIAP Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2012) Sistema de Información Agropecuario y Pesquero. México. www.siap.gob.mx.
- Silveira JAG., Viégas RA., Rocha IMA., Moreira ACOM., Moreira RA. (2003) Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proetolysis in cashew leaves. *Journal of Plant Physiology*, 160: 115–123.
- Singh S., Kaur I., Kariyat R. (2021) The multifunctional roles of polyphenols in plant-herbivore interactions. *International Journal of Molecular Science*, 22: 1442.
- Singleton VL., Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *America Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158
- Smith TM., Smith RL. (2007) Ecología. Ed. Pearson- Addison Wesley. Madrid España. 776 p.
- SNICS (Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas) (2012) Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV): Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México DF. Disponible en http://snics.sagarpa.gob.mx/Documents/CNVV_2012.pdf
- Suter L., Windmer A. (2013) Environmental heat and salt stress induce transgenerational phenotypic changes in *Arabidopsis thaliana*, *PLoS One*, 8: e60364.
- Taboada MS., Oliver RG. (2004) Cultivos alternativos en México. Primera Edición Editorial AGT Editor, S.A. México, D.F. 169 P.
- Taïbi K., Taïbi F., Abderrahim LA., Ennajah A., Belkhodja M., Mulet JM. (2016) Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defense systems in *Phaseolus vulgaris* L. *South African Journal of Botany*, 105: 306-312
- Taiz L., Zeiger E. (2006) Plant physiology. 4th ed. Sinauer Associates Publ., Sunderland, MA.

-
- Tan MP. (2010). Analysis of DNA methylation of maize in response to osmotic and salt stress based on methylation-sensitive amplified polymorphism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 21-26.
- Tester M., Davenport R. (2003) Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91: 503-527.
- Tolonen M., Taipale M., Viander B., Pihlava JM., Korhonen H., Ryhanen EL. (2002). Plant-derived biomolecules in fermented cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6798-6803.
- Tovar del Río J. (2013). Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. Repositorio Universidad Tecnológica de Pereira.
- Turgut-Kara N., Arıkan B., Celik H. (2020) Epigenetic memory and priming in plants. *Genetica*, 148: 47-54.
- Vaillant F., Corrales-Agudelo V., Moreno-Castellanos N., Ángel-Martín A., Henao-Rojas JC., Muñoz-Durango K., Poucheret P. (2021) Plasma Metabolome Profiling by High-Performance Chemical Isotope-Labeling LC-MS after Acute and Medium-Term Intervention with Golden Berry Fruit (*Physalis peruviana* L.), Confirming Its Impact on Insulin-Associated Signaling Pathways. *Nutrients*, 13: 3125.
- Valdivia-Mares LE., Zaragoza FAR., González JJS., Vargas-Ponce O. (2016) Phenology, agronomic and nutritional potential of three wild husk tomato species (*Physalis*, Solanaceae) from Mexico. *Scientia Horticulturae*, 200: 83–94.
- Vargas-Ponce O., Martínez JS., Tavares MPZ., Mares LEV. (2015) Traditional management of a small-scale crop of *Physalis angulata* in Western Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 63: 1383-1395.
- Vargas-Ponce O., Martínez M., Dávila P. (2003) La familia Solanaceae en Jalisco: el género *Physalis*. Colección Flora de Jalisco 16. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, pp 1–127.
- Vargas-Ponce O., Pérez-Álvarez LF., Zamora-Tavares P., Rodríguez A. (2011) Assessing genetic diversity in mexican husk tomato species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29: 733-738.
- Varriale A. (2014) DNA Methylation, Epigenetics, and Evolution in Vertebrates: Facts and Challenges. *International Journal of Evolutionary Biology*, 2014: 1–8.
- Vasina O., Maslennikova V., Abubakirov N. (1986) *Physalis* withasteroids. *Chemistry of Natural Compounds*, 22: 243-255.

- Ventouris YE., Tani E., Avramidou EV., Abraham EM., Chorianopoulou SN., Vlachostergios DN., Kapazoglou A. (2020) Recurrent Water Deficit and Epigenetic Memory in *Medicago sativa* L. Varieties. *Applied Sciences*, 10: 3110.
- Verbruggen N., Hermans C. (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35: 753–759.
- Verma N., Shukla S. (2015) Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2: 105–113.
- Wang W., Huang F., Qin Q., Zhao X., Li Z., Fu B. (2015) Comparative analysis of DNA methylation changes in two rice genotypes under salt stress and subsequent recovery. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 465: 790–796
- Wang W., Pan YJ., Zhao XQ., Dwivedi D., Zhu LH., Ali J., Fu BY., Li ZK. (2011) Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 62: 1951–1960.
- Whitson M., Manos PS. (2005) Untangling *Physalis* (Solanaceae) from the physaloids: A two-gene phylogeny of the Physalinae. *Systematic Botany*, 30: 216-230.
- Xu Z, Zhou J, Ren T, Du H, Liu H, Li Y, Zhang C. (2020) Salt stress decreases seedling growth and development but increases quercetin and kaempferol content in *Apocynum venetum*. *Plant Biology*, 22:813–821.
- Yaish, M. W. (2013). DNA methylation-associated epigenetic changes in stress tolerance of plants. In *Molecular stress physiology of plants* (pp. 427-440). Springer, India.
- Yan K, Zhao S, Bian L, Chen X. (2017) Saline stress enhanced accumulation of leaf phenolics in honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) without induction of oxidative stress. *Plant Physiology Biochemistry*, 112: 326-334.
- Yang Q-Q., Gan R-Y, Ge Y-Y., Zhang D., Corke H. (2018) Polyphenols in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.): Chemistry, analysis, and factors affecting composition. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17: 1518-1539.
- Yao Q., Peng Z., Tong H., Yang F., Xing G., Wang L., Zheng J., Zhang Y., Su Q. (2019) Tomato plant flavonoids increase whitefly resistance and reduce spread of tomato yellow leaf curl virus. *Journal of Economic Entomology*, 112: 2790–2796.

- Zakynthinos G., Varzakas T. (2016) Carotenoids: from plants to food industry. *Current Research in Nutrition and Food Science* 4: 38–51.
- Zekri M., Parsons LR. (1992) Salinity tolerance of citrus rootstocks. Effects of salt on root and leaf mineral concentrations. *Plant Soil*, 147: 171-181.
- Zhang TJ., Zheng J., Yu ZC., Huang XD., Zhang QL., Tian XS., Peng CL. (2018) Functional characteristics of phenolic compounds accumulated in young leaves of two subtropical forest tree species of different successional stages. *Tree Physiology*, 38: 1486-1501
- Zhang X., Yazaki J., Sundaresan A., Cokus S., Chan SW., Chen H., Henderson IR., Shinn P., Pellegrini M, Jacobsen SE., Ecker JR. (2006) Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis. *Cell*, 126: 1189–1201.
- Zhang Y-Y., Fischer M., Colot VV., Bossdorf O. (2013) Epigenetic variation creates potential for evolution of plant phenotypic plasticity. *New Phytologist*, 197: 314-322.
- Zhong L., Xu YH., Wang JB. (2009). DNA-methylation changes induced by salt stress in wheat *Triticum aestivum*. *African Journal of Biotechnology*, 8(22).
- Zhu J K (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6: 66-71.

ANEXOS

Electronic Journal of Biotechnology 59 (2022) 25–35



Contents lists available at ScienceDirect

Electronic Journal of Biotechnology

journal homepage:



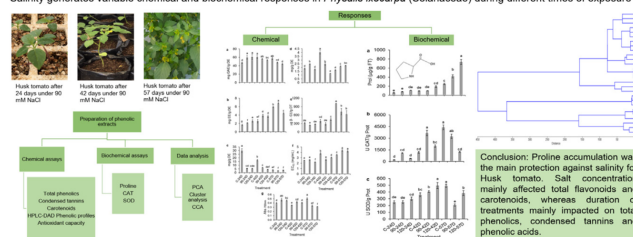
Research Article

Salinity generates varying chemical and biochemical responses in *Physalis ixocarpa* (Solanaceae) during different times of exposure

Claudia Esmeralda Hernández-Pacheco^a, Norma Almaraz-Abarca^{a,*}, Marlon Rojas-López^b,
Rene Torres-Ricario^a, José Antonio Ávila-Reyes^a, Laura Silvia González-Valdez^a,
Eli Amanda Delgado-Alvarado^a, Oswaldo Moreno-Anguiano^c, José Natividad Uribe-Soto^a

^aCentro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional unidad Durango, Instituto Politécnico Nacional, Durango, Mexico^bCentro de Investigación en Biotecnología Aplicada-Tlaxcala, Instituto Politécnico Nacional, Tlaxcala, Mexico^cPrograma Institucional de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad Juárez del Estado de Durango, Durango, Mexico

GRAPHICAL ABSTRACT

Salinity generates variable chemical and biochemical responses in *Physalis ixocarpa* (Solanaceae) during different times of exposure

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 January 2022
Accepted 14 June 2022
Available online 18 June 2022

Keywords:

Antioxidative enzymes
Carotenoids
Catalase (CAT)
Foliar content
Husk tomato
Phenolics
Physalis ixocarpa
Proline
Salinity stress
Solanaceae
Superoxide dismutase (SOD)

ABSTRACT

Background: Diverse plants respond differently to similar saline conditions. The aim of the current study was to determine the variation in the foliar contents of phenolic compounds, carotenoids, and proline, and the variation of the activities of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) of the edible and medicinal *Physalis ixocarpa* throughout three different times of exposure (24, 42, and 57 d) to three salinity levels (0, 90, and 120 mM NaCl). The specific effects of salt concentration and time of exposure were also assessed.

Results: Proline increase was the only clearly salt-related response, evidencing its significant protective role in salinized *P. ixocarpa* under either short, medium, or chronic exposure. One phenolic acid, which increased up to 26.26 times its concentration (compared to control, under high salinity at the longest treatment) out of the eight compounds forming the phenolic profile of the species, and CAT and SOD, under 90 and 120 mM NaCl, respectively, and short and medium exposure, also made important contributions. Salt concentration mainly affected total phenolics, tannins, phenolic acids (PA), proline, and SOD, whereas exposure time mainly affected flavonoids, carotenoids, and CAT.

Conclusions: The participation of the different protection mechanisms of *P. ixocarpa* against salinity is dynamic and complementary, and it is differentially modulated by the salt concentration and the time

Peer review under responsibility of Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

* Corresponding author.

E-mail address: nalmaraz@ipn.mx (N. Almaraz-Abarca).<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.06.002>

0717-3458/© 2022 Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Production and hosting by Elsevier B.V.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

of exposure. Proline is the main mechanism for the species. The accurate chronic registration of the responses is needed to determine its adaptation potential to salt stress. The results have agronomic and food quality implications.

How to cite: Hernández-Pacheco CE, Almaraz-Abarca N, Marlon Rojas-López M, et al. Salinity generates varying chemical and biochemical responses in *Physalis ixocarpa* (Solanaceae) during different times of exposure. Electron J Biotechnol 2022;59. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.06.002>

© 2022 Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Production and hosting by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Salinity cause inhibition of plant growth and development by diminishing the external water potential, generating ionic imbalance, ionic toxicity, and oxidative damage [1], which may lead to plant death.

Plants have developed adaptive chemical and biochemical mechanisms to reduce oxidative damage resulting from abiotic stress. The chemical mechanisms include the biosynthesis of secondary metabolites, such as antioxidant phenolic compounds and carotenoids [2,3]. The biochemical mechanisms include the accumulation of osmolytes such as proline [3], and the participation of antioxidative enzymes such as catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) [4].

Most studies on the responses of plants to salinity have been carried out in a single stage of development [2,3,5,6] and have focused on short-term responses [2,3]. An important insight from these studies is that different plant species of comparable age respond differently to similar saline treatments. In the current study, we hypothesize that salt level and the duration of exposure differentially modulate the chemical and biochemical responses of plants, and we consider that the accurate knowledge of the particular defense strategies deployed by economically important plants throughout long exposures to different salinity levels would contribute to reveal their adaptive potential for cultivating in salinized soils and could support the development of improvement and crop expansion programs.

Physalis ixocarpa Brot. ex Hornem (husk tomato) belongs to Solanaceae. It is an important edible and medicinal plant in Mesoamerica [7]. Husk tomato is native to Mexico and is cultivated mainly in the tropical and subtropical regions of its territory, although, currently, it is cultivated in other countries [8]. In Mexico, due to the increase in its demand, it seeks to expand the areas of cultivation [9]. Arid and semiarid regions cover more than a half of the territory of this country [10]; nevertheless, for different reasons, these regions are being particularly affected by salinity, which is one of the major abiotic stress limiting plant productivity [11]. In this context, the assessment of the responses of *P. ixocarpa* to salinity becomes a relevant issue. Despite this issue and its importance as an edible and medicinal plant, the responses of *P. ixocarpa* to salt stress have been less explored [12,13]. The aim of the current study was to determine the variation in the foliar accumulation of phenolic compounds, terpenoids, and proline, and of the activities of SOD and CAT of salt-stressed *P. ixocarpa* through short, medium, and chronic exposure, and to determine whether the salt concentration and the exposure time differently affect the chemical and biochemical responses of the species.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and saline treatments

Seeds of *P. ixocarpa* var. Rendidora were germinated (May 2018) in a greenhouse in Durango, Mexico, in peat moss–agrolite (8:2) [9]. The study was conducted under repeated measures designs

with one factor and three replicas. The factor levels were 0, 90, and 120 mM NaCl [13], corresponding to 0.96, 10.35, and 14.04 dS/m electrical conductivity, respectively. The repeated measures were 24, 42, and 57 d (these times represent growth stages of the species). Experimental lots were formed by 15 plants. Each saline treatment (Table 1) had three experimental lots (replicas). Salt solutions were applied eight days after germination (when 100% germination was reached). The respective saline solutions were provided in a manner such that the respective electrical conductivity was maintained. Electrical conductivity was checked daily. Minimum and maximum temperatures varied between 14.9°C and 17.7°C, and 33.5°C and 46.7°C, respectively, all over the study. The daily photoperiod was 13 h.

2.2. Phenolic extracts

Leaves from the 15 plants of each experimental lot of each treatment (three lots for each saline treatment, representing three replicas) were collected, combined, dried at 40°C, ground, and independently analyzed. Extracts were prepared from 3 g of sample, according to Vasavilbazo-Saucedo et al. [14].

2.3. Total phenolics (TP)

TP was determined according to Noreen et al. [15], from a gallic acid standard curve ($Abs_{765} = 11.2460$ [gallic acid] – 0.0180, $r = 0.9998$). Contents were expressed as milligrams equivalents of gallic acid per gram of dry extract (mg GAE/g DE).

2.4. Condensed tannins (TCT)

TCT was estimated according to Julkunen-Tiitto [16], from an epicatechin standard curve ($Abs_{500} = 2.1932$ [epicatechin] + 0.015 0, $r = 0.9949$), and expressed as milligrams equivalents of epicatechin per gram of dry extract (mg EE/g DE).

2.5. Carotenoids (CR)

Extraction and quantification of carotenoids were carried out according to Conesa et al. [17] by using a standard β -carotene

Table 1
Saline treatments to which *Physalis ixocarpa* was submitted.

Treatment	Saline condition (mM NaCl)	Exposure time (Days)
C-24D	0	24
90-24D	90	24
120-24D	120	24
C-42D	0	42
90-42D	90	42
120-42D	120	42
C-57D	0	57
90-57D	90	57
120-57D	120	57

Control plants received only nutrient solution (potassium nitrate, 0.50 g/L; calcium nitrate, 0.70 g/L; magnesium nitrate, 0.20 g/L; mono ammonium phosphate, 1.00 g/L; potassium sulfate 0.50 g/L; and micronutrients 0.20 g/L).

curve ($Abs_{450} = 0.6472 [\beta\text{-carotene}] - 0.0036$, $r = 0.9999$). Contents were expressed as micrograms equivalents of β -carotene per gram of dry tissue ($\mu\text{g } \beta\text{-CE/g DT}$).

2.6. Phenolic profiles

The phenolic profiles were determined in a Perkin Elmer Flexar HPLC-DAD system, using the gradient method previously described [18], with a Perkin Elmer Brownlee Analytical C18 column (4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$). Chromatograms were registered at 260 and 340 nm. UV spectra of the resolved peaks were registered between 200 and 400 nm, using a Perkin Elmer Flexar diode array-detector (DAD). The injection volume was $100 \mu\text{L}$ and the flow rate was 0.8 mL/min . Structural information was obtained by interpreting the UV spectra according to Campos and Markham [18], and by comparing the retention time (RT) and λ_{max} of the resolved compounds in the chromatograms with those of the standards. Concentrations were estimated by area measurements, using a standard curve of rutin (slope: 6564.40, intercept: 127.33, $r = 0.9965$) for flavonols and a standard curve of ferulic acid (slope: 39870.00, intercept: 6372.9, $r = 0.9985$) for phenolic acids (PA) and their derivatives. Concentrations were expressed as micrograms per gram of dry extract ($\mu\text{g/g DE}$). The total contents of flavonoids (TF) were estimated by adding the individual flavonoid concentrations of one sample, whereas the total contents of PA by adding the individual PA concentrations of one sample. Concentrations were reported as milligrams per gram of dry tissue (mg/g DE).

2.7. Antioxidant capacity

The DPPH. (1,1-diphenyl-2-picrilhydrazil) scavenging activity, determined according to Medina-Medrano et al. [7], was expressed as the efficient concentration at 50% (EC_{50} , mg/mL). The iron-reducing power (IRP) was evaluated according to Chavan et al. [19], registering the sample absorbance at 700 nm.

2.8. Proline

Proline content was determined according to Sarker and Oba [4], from a proline standard curve ($Abs_{520} = 1.4946 [L\text{-proline}] + 0.0230$, $r = 0.9939$) and expressed as milligrams per gram of fresh tissue (mg/g FT).

2.9. CAT and SOD activities

Enzyme extracts and the activities of CAT and SOD were according to Sarker and Oba [4]. The protein content in the enzyme extracts was estimated according to Mæhre et al. [20], from a standard curve of bovine serum albumin. CAT and SOD activities were expressed as units per gram of protein (U CAT/g Prot) and units per milligram of protein (U SOD/mg Prot), respectively.

2.10. Data analysis

Data were submitted to repeated measures analysis and means separated by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$), using RStudio. Principal component analyses (PCA) was used to determine the contribution of the chemical and biochemical response to differentiation of plants from different treatments. The chemical and biochemical relations between plants from different treatments were separately determined by cluster analyses (paired group UPGMA and Euclidean similarity index). The effects of salt concentration and time of exposure on the chemical and biochemical responses were assessed using canonical correspondence analyses (CCA). Cluster analyses, PCA, and CCA were obtained using Past4.07b.

3. Results and discussion

3.1. Effect of treatments on chemical responses

Plants under any treatment had a good survival, suggesting that *P. ixocarpa* has an excellent adaptation potential to salinity.

Significant differences in the accumulation of the types of phenolic compounds analyzed were found (Fig. 1a–1d). The results revealed that the leaves of unstressed *P. ixocarpa* are a good source of TP and TF when compared with the leaves of other Solanaceae, such as *Solanum lycopersicum*, for which 7.34 mg/g extract of total phenolics and 18.51 mg/g extract of flavonoids were reported [2]. A salt-dependent increase of TP and TCT was observed only after 24 d of exposure, suggesting that these compounds represent an initial strategy of *P. ixocarpa* to cope with saline stress, whereas, only after d 57, a salt-dependent increase of PA was detected, suggesting their participation as protectors after chronic saline exposure. No salt-dependent increase but decreases were observed for TF after any time of exposure, revealing that flavonoids play no important role as protectors against salinity in husk tomato. The reduction in TF was also reported for *S. lycopersicum* [2], although in that study only one NaCl concentration, not progressive increases, was evaluated. Comparing our results with those found for other plant species, a great diversity of responses in the accumulation of TF and PA have been informed [5,6,21,22,23]; even, a minor significance of flavonoids as protectors against salt-induced oxidative damage has been reported [24]. This diversity of responses could be a consequence of the different experimental conditions, in which the studies were carried out. However, it can also indicate that diverse genetically controlled responses against saline stress have emerged among different plant species, even in related species. The species-specific responses found for species of the genus *Brassica* (Brassicaceae) [25] support this proposal.

Carotenoids are other secondary metabolites reported as protectors against salinity stress [26]. In plants, carotenoids play essential roles in photosynthesis and photoprotection [27]; however, according to the data shown in Fig. 1e, their involvement as protectors against salinity stress was little relevant in *P. ixocarpa*. A reduced role for these compounds was also found for other Solanaceae [2,3], suggesting a probable common response of carotenoids under salt stress in the family. Nevertheless, other species responded differently [21,26].

Our results suggest that the accumulation of phenolic compounds and carotenoids of a single species vary under short, medium, and long salt treatments. Thus, the accurate registration of the chemical changes taking place in chronically salinized plants is necessary for a better understanding of the accumulation processes and roles of secondary metabolites, which can represent useful markers to support the development of conservation, improvement, and crop expansion programs.

The DPPH. scavenging activity and the IRP of husk tomato leaves were not clearly dependent on phenolic contents and salt concentration (Fig. 1f–1g). Contrary, the increase of DPPH. scavenging activity as the increase of phenolic contents and abiotic stress has been found for other species [4]. However, not only the concentration of phenolic compounds but also the composition is important in determining the antioxidant activity in plant tissues [28].

The HPLC-DAD analysis revealed eight main phenolic compounds. Fig. 2a–2i shows the chromatograms registered for each sample. Fig. 3 displays the UV spectra of each compound resolved in the chromatograms, its RT, and λ_{max} . Compounds 1–4 were PA, 5 and 6 were flavonols. Compound 5 was proposed as rutin. 6 was a kaempferol-3-O-glycoside. 7 and 8 were *p*-coumaric acid derivatives.

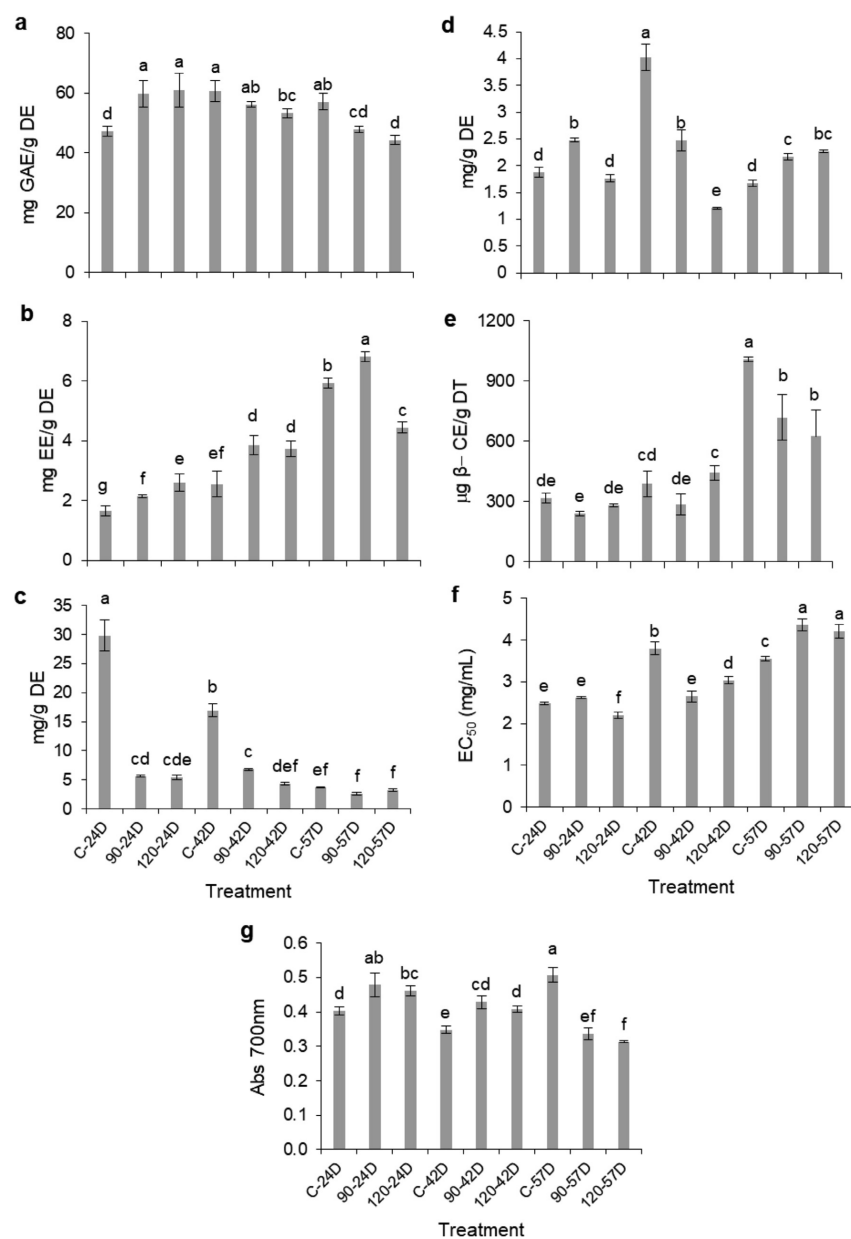


Fig. 1. Effect of saline treatments on the content of total phenolics (a), condensed tannins (b), flavonoids (c), PA (d), carotenoids (e), DPPH scavenging capacity (f), and IRP (g) of *Physalis ixocarpa*. DE: Dry extracts, DT: Dry tissue.

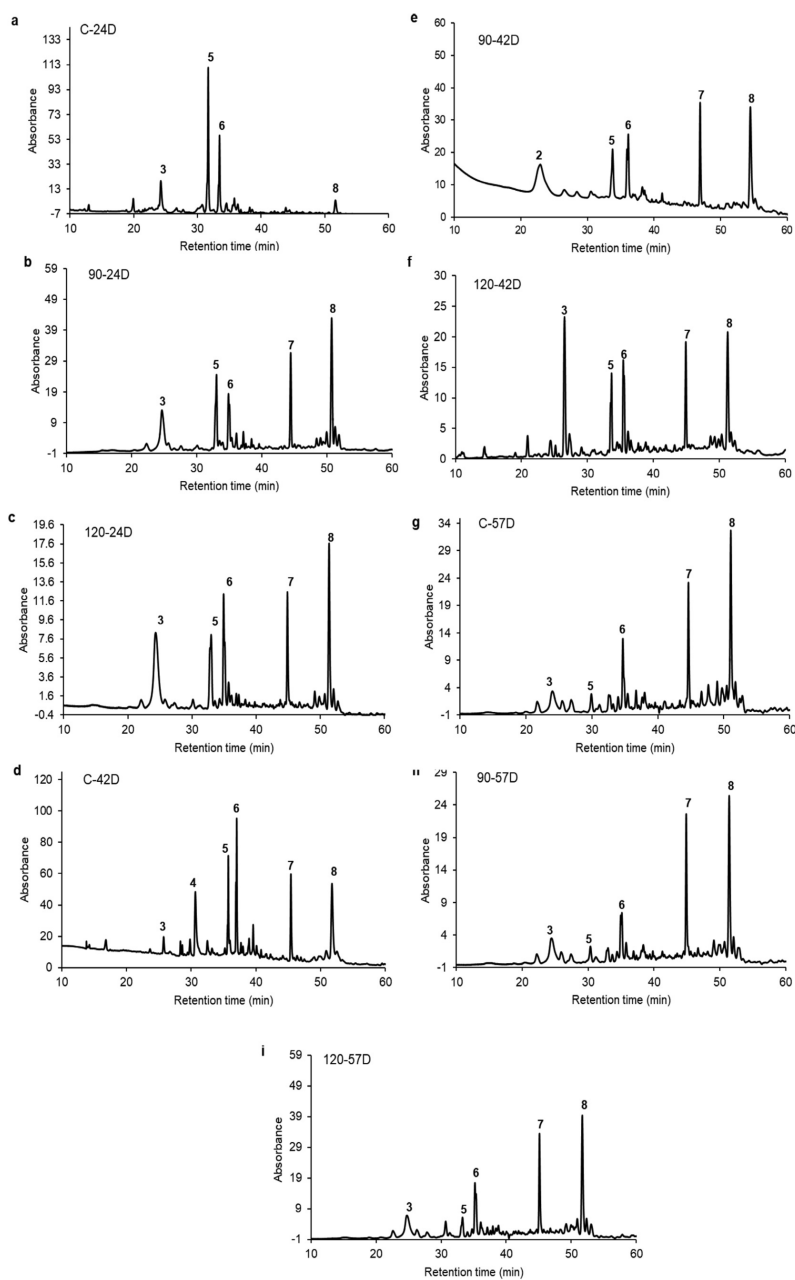


Fig. 2. HPLC-chromatograms of the foliar extracts of *Physalis ixocarpa* exposed to different saline treatments. Saline treatments according to [Table 1](#). Numbers in bold represent compounds according to [Table 2](#).

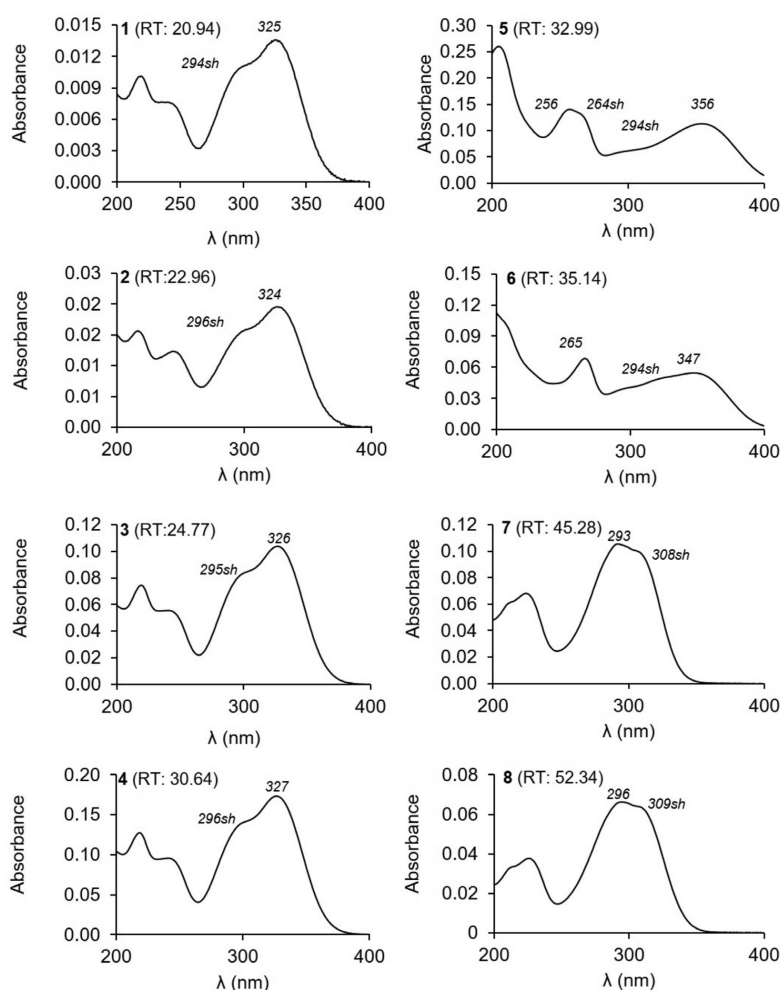


Fig. 3. UV spectra of the major foliar phenolics of *Physalis ixocarpa*. RT: Retention time (min). Numbers in bold represent compounds according to Table 2.

The foliar phenolic profile of untreated mature *P. ixocarpa* (Fig. 2g) was different from those reported for other species (also in the mature stage) of the genus, such as *P. patula*, *P. solanaceae*, *P. subulata*, *P. angulata*, and *P. hederifolia* var. *hederifolia* [7], supporting the proposal made by several authors that phenolic profiles have a species-specific trend [7,29].

Quantitative age-dependent differences were observed in the foliar phenolic profiles of untreated *P. ixocarpa* (Table 2), in accordance with the quantitative age-dependent variation found for *Physalis angulata* [30]. The high concentrations of **5** and **6** in plants from C-24D were notable.

In addition to the changes in the concentration of the individual foliar phenolic compounds of *P. ixocarpa* due to the natural demand during its growing process, changes caused by treatments were

found (Table 2). Only under the longest treatments (57 d), **3** significantly increased in a salt-dependent manner by 17.19 and 26.26 times more under the moderate and high salinity, respectively, than the respective control, suggesting that this phenolic acid plays an important protective role in husk tomato against salinity after chronic exposure. The accumulation of some PA under a determined saline condition but not in others (Table 2) is in agreement with other reports [11,25], suggesting a dynamic participation against salt stress for some single phenolic compounds, according to defined combinations of salt concentration and time of exposure.

No clear protector role was found for the two flavonols **5** and **6** neither the two *p*-coumaric acid derivatives **7** and **8** (Table 2), in disagreement with that reported for other plants [11,31], including

Table 2
Concentrations ($\mu\text{g/g DE}$) of the individual compounds of *Physalis ixocarpa* leaves under different salt treatments.

Compound	Type of compound	Treatment									
		C-24D	90-24D	120-24D	C-42D	90-42D	120-42D	C-57D	90-57D	120-57D	
1	Phenolic acid	NF	NF	NF	NF	NF	70.24 ± 6.76	NF	NF	NF	
2	Phenolic acid	NF	NF	NF	NF	743.91 ± 111.22	NF	NF	NF	NF	
3	Phenolic acid	1275.75 ± 46.71a	681.05 ± 14.93b	728.21 ± 37.09b	287.27 ± 34.26a	NF	124.05 ± 6.76b	14.45 ± 2.45c	248.40 ± 17.20b	379.48 ± 24.47a	
4	Phenolic acid	NF	NF	NF	1551.99 ± 139.21	NF	NF	NF	NF	NF	
5	Quercetin-3-O- [rhamnosyl(1-6) glucoside] (Rutin)	19498.72 ± 1538.41a	4340.24 ± 139.47b	2925.71 ± 320.65b	7853.40 ± 448.45a	2975.95 ± 208.83b	2220.53 ± 246.19c	925.88 ± 20.81b	894.29 ± 97.80b	1219.99 ± 106.17a	
6	Kaempferol-3-O- glycoside	10343.16 ± 1380.20a	1320.91 ± 155.36b	2496.19 ± 142.06b	9114.48 ± 732.58a	3847.75 ± 231.32b	2121.69 ± 206.54c	2793.59 ± 134.77a	1722.49 ± 87.06c	1985.48 ± 116.08b	
7	p-coumaric acid	NF	635.83 ± 31.70a	368.15 ± 20.01b	1182.28 ± 115.67a	654.97 ± 51.42b	401.40 ± 17.41c	584.13 ± 50.38b	744.45 ± 65.00a	728.93 ± 17.59a	
8	p-coumaric acid	600.15 ± 48.28b	1159.25 ± 15.81a	668.20 ± 54.57b	999.53 ± 82.72a	1075.85 ± 143.39a	613.49 ± 17.55b	1074.61 ± 59.29b	1171.79 ± 22.26a	1161.29 ± 36.29ab	

The values represent the mean and standard deviation for three independent samples. Different letters in the same line mean significant differences (*p* < 0.05). DE: Dry extract; NF: Not found.

The values represent the mean and standard deviation for three independent samples. Different letters in the same line mean significant differences ($p < 0.05$); DE: Dry extract; NF: Not found.

tomato [32]. The variation of the individual compounds concentrations suggests that for a single plant species, variations in salt concentrations and exposure time can stimulate the accumulation of different flavonoids and PA, which could be useful to improve the selective accumulation of bio-products in plants.

3.2. Effect of treatments on the biochemical responses

The variations in proline, CAT, and SOD are shown in Fig. 4a-4c. The clear salt-dependent increase of proline content was observed in every exposure time, mainly after 57 d (Fig. 4a), suggesting that this amino acid is a key biochemical mechanism of *P. ixocarpa* against moderate and high saline stress, either under short, medium, or chronic exposure. This prominent role of proline in salt-stressed husk tomato can derive from its multiple roles in cells, such as an osmolyte, which protects plants against the osmotic unbalance generated by saline stress [33,34]; as a protector against oxidative damage, due to its capability to scavenge hydroxyl radical and quench singlet oxygen; and as a stabilizer of macromolecules and membrane structure [33]. The importance of proline in plant defense against salt has also been revealed for other species of Solanaceae [2,3], which could suggest a common strategy of proline accumulation against salinity in the family.

CAT played a major protective role after 24 and 42 d of exposure to 90 mM NaCl, its activity increased by about 5 and 3 times, respectively, compared to the respective controls (Fig. 4b), suggesting a hydrogen peroxide detoxification promotion in *P. ixocarpa* under these saline conditions, as CAT catalyzes that detoxification in cells [4]. SOD played a protective role in *P. ixocarpa* after the same times of exposure (24 and 42 d) but under the strong salt concentration (Fig. 4c), as its activity increased by 1.20 and 1.38 times, respectively, compared to the respective controls, suggesting a promotion of dismutation of superoxide radicals to H_2O_2 and O_2 in the leaves of *P. ixocarpa*, as this enzyme catalyzes this reaction in cells [4]. The results suggest a complementary role for these two enzymes under increased salt concentration for *P. ixocarpa* after short and medium time of exposure. Important protective roles of CAT and SOD were also found for the Solanaceae *S. lycopersicum* [2] and *L. ruthenicum* [3], although for these species it is difficult to assign a complementary role because the studies were carried out at a single time of exposure for the first species and at only one salt level and one time of exposure for the second one. Different results have been reported for other plants, for which neither CAT nor SOD responded to increases of salt concentration [22].

Regarding the chemical responses, the variation of biochemical responses may be the consequence of a diversity of genetically controlled responses against saline stress that have emerged in different plant species, with a single species being able to display a wide, complementary, and complex range of biochemical responses throughout chronic exposure to different salt concentrations.

3.3. PCA and cluster analysis based on the chemical and biochemical responses

PC1 and PC2 of the chemical responses-based PCA accounted for 99.94% of the variance; PC1 was correlated with CR, TCT, and the antiradical activity, whereas PC2 was correlated with TF (Fig. 5a). PC1 and PC2 of the biochemical responses-based PCA accounted for 99.74% of the variance; PC1 was correlated with CAT and PC2 was correlated with proline (Fig. 6a). All these responses sustained the discrimination between *P. ixocarpa* from different saline treatments.

The similarity between the chemical and biochemical responses of *P. ixocarpa* from different saline treatments was

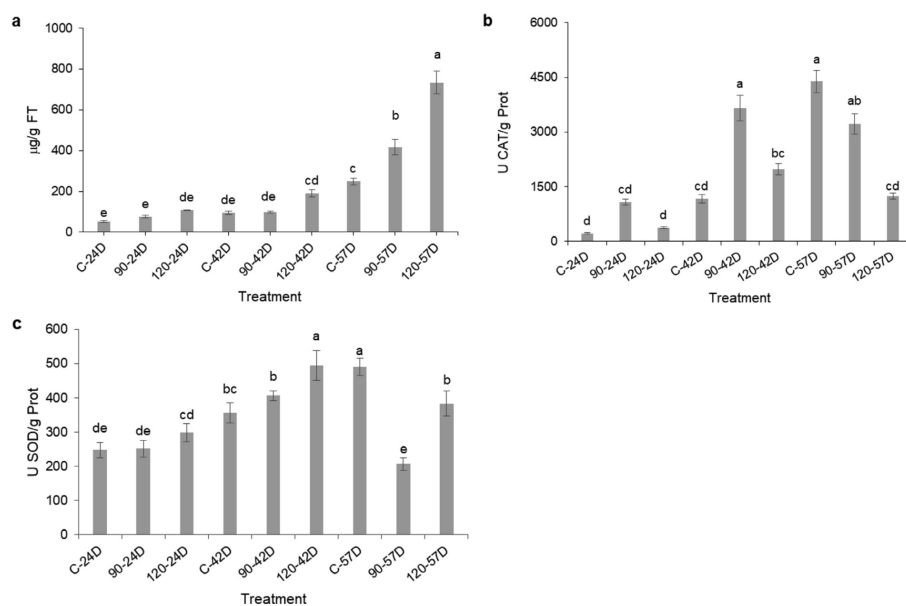


Fig. 4. Effect of saline treatments on proline content (a), CAT activity (b), and SAT (c) of *Physalis ixocarpa*.

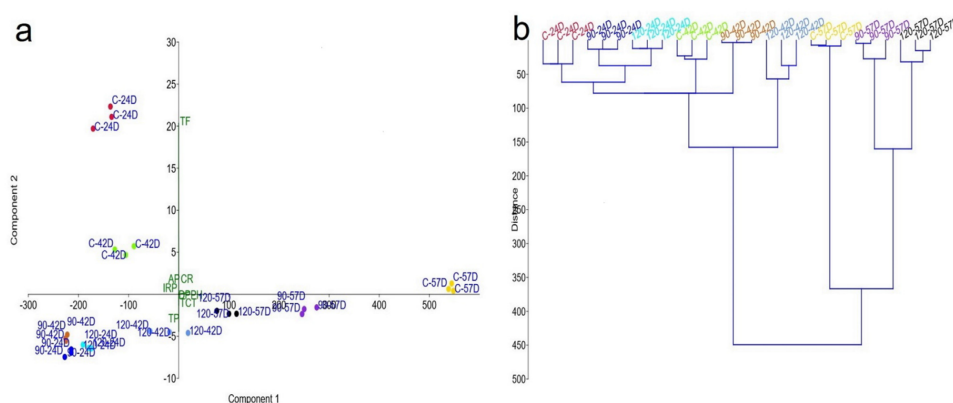


Fig. 5. Results of the PCA (a) and cluster analysis (b) based on the chemical responses of *Physalis ixocarpa* exposed to different saline treatments. Saline treatments according to Table 1. Each treatment is represented by three replicates.

assessed by two cluster analyses (Figs. 5b and 6b). Both cluster analyses revealed that at early growth stages the chemical and biochemical responses of *P. ixocarpa* to different treatments were less variable than at advance stages, as plants from the treatments 90-24D and 120-24D formed a single group with the highest similarity, whereas plants from the longer treatments formed a more heterogeneous group. However, both cluster analyses

corroborated the potential of the chemical and biochemical responses to discriminate between husk tomato cultivated under different salt treatments, as plants from each treatment was grouped in a single clade. These results verify that the chemical and biochemical responses of the husk tomato represent a valuable fingerprinting with agronomic and food quality control implications.

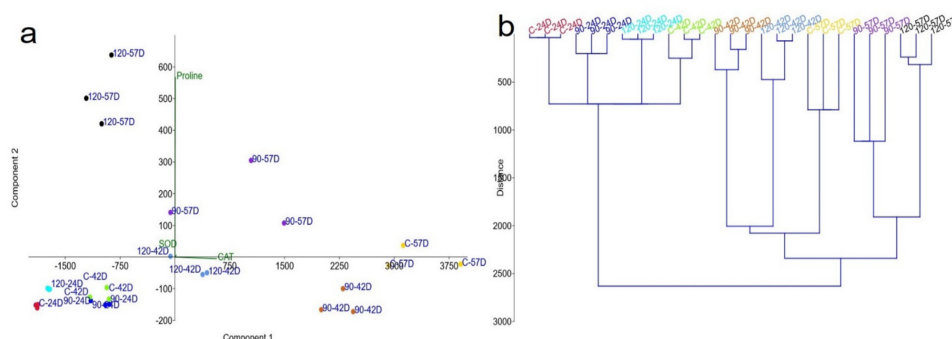


Fig. 6. Results of the PCA (a) and cluster analysis (b) based on the contents of proline and the activities of CAT and SOD of *Physalis ixocarpa* exposed to different saline treatments. Saline treatments according to Table 1. Each treatment is represented by three replicates.

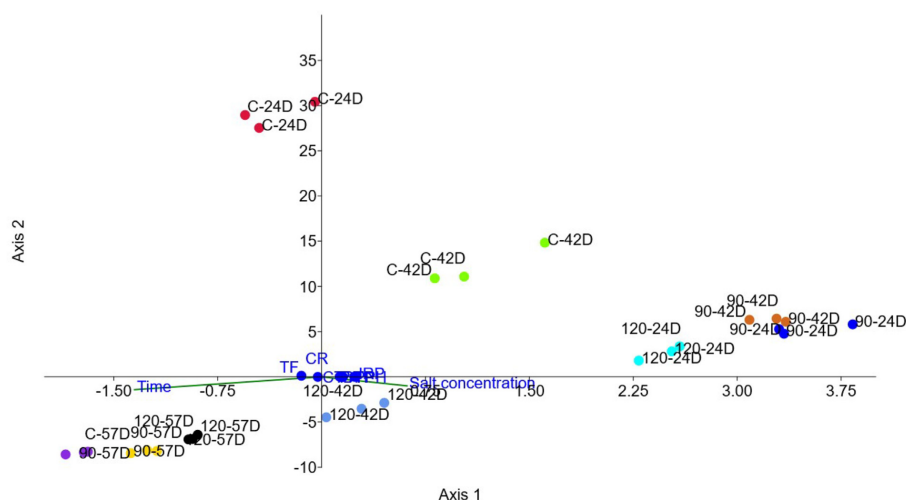


Fig. 7. CCA showing the influence of salt concentration and time of exposure on the chemical responses of *Physalis ixocarpa* exposed to different saline treatments. Saline treatments according to Table 1. Each treatment is represented by three replicates.

3.4. Relation of the chemical and biochemical responses and salt concentration and time of exposure

The effect of salt concentration and time of exposure on the chemical responses evaluated for salt-stressed *P. ixocarpa* were assessed by a CCA (Fig. 7). CCA1 explained 96.23% of total variance (1,000 permutations, $P = 0.001$). The results indicate that the time of exposure mainly affected TF and CR, whereas salt concentration had a greater impact on TP, TCT, PA, and the antioxidant properties.

The effect of salt concentration and time of exposure on the biochemical responses evaluated of salt-stressed *P. ixocarpa* were

assessed by other CCA (Fig. 8). CCA1 explained 97.73% of total variance (1,000 permutations, $P = 0.001$). The time of exposure mainly influenced CAT activity, whereas salt concentration mainly influenced proline content and SOD activity.

The current results reveal that for *P. ixocarpa* some chemical and biochemical responses were mainly triggered by salt concentration, whereas others mainly responded to exposure time. As chemical changes determine variations in the organoleptic and functional properties of plants [35], the accurate registration of these changes can be useful as control quality tools.

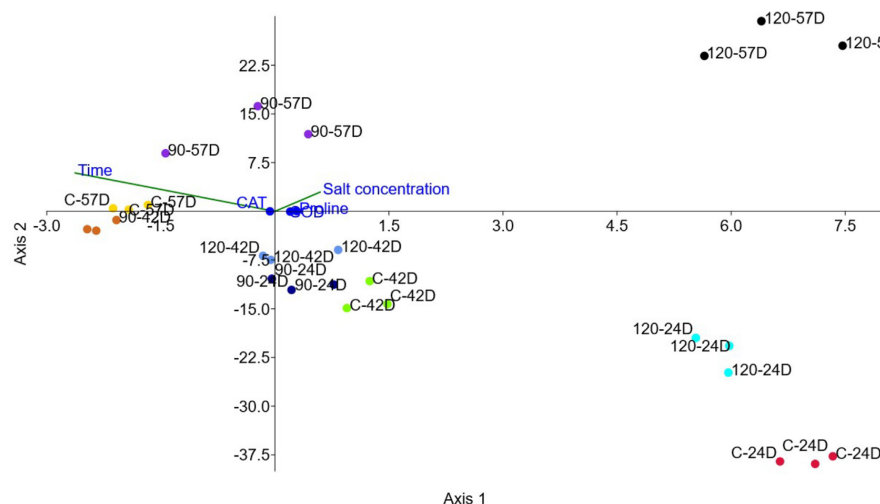


Fig. 8. CCA showing the influence of salt concentration and time of exposure on the biochemical responses of *Physalis ixocarpa* exposed to different treatments. Saline treatments according to Table 1. Each treatment is represented by three replicates.

4. Conclusions

Physalis ixocarpa has developed complex defense systems to cope with salt stress. Proline was revealed as the main defense mechanism; however, under particular saline conditions, proline can synchronize with the increase in compound 3 and CAT and SOD activities. The panorama revealed here for *P. ixocarpa*, suggests that the participation of the different mechanisms is dynamic and complementary, and it is differentially modulated by intensity of salinity and duration of the treatments. Since the responses can vary as the time of exposure increases, it is necessary to register not only short-time responses but long-time responses to determine the adaptation potential of economically important plants to salinity. The collected data have agronomic and food quality implications.

Financial support

This research was supported by Instituto Politécnico Nacional [grant number 20201102].

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

To Comisión de Fomento a las Actividades Académicas del Instituto Politécnico Nacional for stimuli for research, and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for the stimuli (708322) to one of the authors (CEHP). To Dr. María da Graça Campos for her help in the interpretation of UV spectra.

References

- [1] Hanin M, Ebel C, Ngom M, et al. New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding. *Front Plant Sci* 2016;7:1787. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01787>. PMID: 27965692.

- [2] Ahanger MA, Alyemeni MN, Wijaya L, et al. Potential of exogenously sourced kinetin in protecting *Solanum lycopersicum* from NaCl induced oxidative stress through up-regulation of the antioxidant system, ascorbate-glutathione cycle and glyoxalase system. *PLoS ONE* 2018;13(9):e0202175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202175>. PMID: 30180173.
- [3] Li Y, Zhang T, Zhang Z, et al. The physiological and biochemical photosynthetic properties of *Lycium ruthenicum* Murr in response to salinity and drought. *Sci Hort* 2019;256:108530. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.05.057>.
- [4] Sarker U, Oba S. Catalase, superoxide dismutase and ascorbate-glutathione cycle enzymes confer drought tolerance of *Amaranthus tricolor*. *Sci Rep* 2018;8:16496. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34944-0>.
- [5] Minh LT, Khang DT, Ha PTT, et al. Effects of salinity stress on growth and phenolics of rice (*Oryza sativa* L.). *Int Lett Nat Sci* 2016;57:1–10. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ILNS.57.1>.
- [6] Yan K, Zhao S, Bian L, et al. Saline stress enhanced accumulation of leaf phenolics in honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) without induction of oxidative stress. *Plant Physiol Biochem* 2017;112:326–34. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.01.020>. PMID: 28131061.
- [7] Medina-Medrano JR, Almaraz-Abarca N, González-Elizondo MS, et al. Phenolic constituents and antioxidant properties of five wild species of *Physalis* (Solanaceae). *Bot Stud* 2015;56:24. <https://doi.org/10.1186/s40529-015-0101-y>. PMID: 28510833.
- [8] González-Pérez JE, Guerrero-Beltrán JA. Tomatillo or husk tomato (*Physalis philadelphica* and *Physalis ixocarpa*): A review. *Sci Hort* 2021;288:110306. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110306>.
- [9] Valdivia-Mares LE, Rodríguez Zaragoza FA, Sánchez González JJ, et al. Phenology, agronomic and nutritional potential of three wild husk tomato species (*Physalis*, Solanaceae) from Mexico. *Sci Hort* 2016;200:83–94. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.01.005>.
- [10] Perez-Aguilar LY, Plata-Rocha W, Monjardin-Armenta SA, et al. The identification and classification of arid zones through multicriteria evaluation and geographic information systems—Case study: Arid regions of northwest Mexico. *ISPRS Int J Geo-Inf* 2021;10(11):720. <https://doi.org/10.3390/ijgi10110720>.
- [11] Cuong DM, Kwon S-J, Nguyen BV, et al. Effect of salinity stress on phenylpropanoid genes expression and related gene expression in wheat sprout. *Agronomy* 2020;10(3):390. <https://doi.org/10.3390/agronomy10030390>.
- [12] Eşringü A, Kant C, Yildirim E, et al. Ameliorative effect of foliar nutrient supply on growth, inorganic ions, membrane permeability, and leaf relative water content of *Physalis* plants under salinity stress. *Commun Soil Sci Plant Anal* 2011;42(4):408–23. <https://doi.org/10.1080/00103624.2011.542220>.
- [13] Rosas-Medina I, Colmenero-Robles A, Naranjo-Jiménez N, et al. La salinidad incrementa el contenido de flavonoides, de antocianinas, y el potencial hipoglucemiante de tomatillo (*Physalis ixocarpa*). *e-Cucba* 2020;7:21–9. <https://doi.org/10.32787/e-cucba.v0i3.144>.
- [14] Vasavilbazo-Saucedo A, Almaraz-Abarca N, González-Ocampo HA, et al. Phytochemical characterization and antioxidant properties of the wild edible acerola *Malpighia umbellata* Rose. *CYTA-J Food* 2018;16(1):698–706. <https://doi.org/10.1080/19476337.2018.1475424>.

- [15] Noreen H, Semmar N, Farman M, et al. Measurement of total phenolic content and antioxidant activity of aerial parts of medicinal plant *Coronopus didymus*. Asian Pac J Trop Med 2017;10(8):792–801. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.07.024>. PMID: 28942828.
- [16] Julkunen-Tiitto R. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. J Agric Food Chem 1985;33(2):213–7. <https://doi.org/10.1021/jf00062a013>.
- [17] Conesa A, Manera FC, Brotons JM, et al. Changes in the content of chlorophylls and carotenoids in the rind of Fino 49 lemons during maturation and their relationship with parameters from the CIELAB color space. Sci Hortic 2019;243:252–60. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.08.030>.
- [18] Campos MG, Markham KM. Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: Flavones, flavonols and phenolic acids. Coimbra: Coimbra University Press; 2007. 118 p. <https://doi.org/10.14195/978-989-26-0480-0>.
- [19] Chavan RR, Bhinge SD, Bhutkar MA, et al. Characterization, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of green synthesized silver and iron nanoparticles using alcoholic *Blumea eriantha* DC plant extract. Mater Today Commun 2020;24:101320. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101320>.
- [20] Mæhre HK, Dalheim L, Edvinsen GK, et al. Protein determination - Method matters. Foods 2018;7(1):5. <https://doi.org/10.3390/foods7010005>. PMID: 29301260.
- [21] Šamec D, Linić I, Salopek-Sondi B. Salinity stress as an elicitor for phytochemicals and minerals accumulation in selected leafy vegetables of Brassicaceae. Agronomy 2021;11(2):361. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020361>.
- [22] Farooq M, Ahmad R, Shahzad M, et al. Differential variations in total flavonoid content and antioxidant enzymes activities in pea under different salt and drought stresses. Sci Hortic 2021;287:110258. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110258>.
- [23] Gengmao Z, Yu H, Xing S, Shihui L, Quanmei S, Changhai W. Salinity stress increases secondary metabolites and enzyme activity in safflower. Ind Crop Prod 2015;64:175–81. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.058>.
- [24] Hernández I, Alegre L, Van Breusegem F, et al. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? Trends Plant Sci 2009;14(3):125–32. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.12.003>. PMID: 19230744.
- [25] Linić I, Šamec D, Grúz J, et al. Involvement of phenolic acids in short-term adaptation to salinity stress is species-specific among Brassicaceae. Plants 2019;8(6):153. <https://doi.org/10.3390/plants8060153>. PMID: 31174414.
- [26] Farooq F, Rashid N, Ibrar D, et al. Impact of varying levels of soil salinity on emergence, growth and biochemical attributes of four *Moringa oleifera* landraces. PLoS ONE 2022;17(2):e0263978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263978>. PMID: 35192653.
- [27] Mirkovic T, Ostroumov EE, Anna JM, et al. Light absorption and energy transfer in the antenna complexes of photosynthetic organisms. Chem Rev 2017;117(2):249–93. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00002>. PMID: 27428615.
- [28] Barriada-Bernal LG, Almaraz-Abarca N, Delgado-Alvarado EA, et al. Flavonoid composition and antioxidant capacity of the edible flowers of *Agave durangensis* (Agavaceae). CYTA-J Food 2014;12:105–14. <https://doi.org/10.1080/19476337.2013.801037>.
- [29] Fusari CM, Nazareno MA, Locatelli DA, et al. Phytochemical profile and functionality of Brassicaceae species. Food Biosci 2020;36:100606. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100606>.
- [30] Cobaleda-Velasco M, Alanís-Bañuelos RE, Almaraz-Abarca N, et al. Phenolic profiles and antioxidant properties of *Physalis angulata* L. as quality indicators. J Pharm Pharmacogn Res 2017;5:114–28.
- [31] Xu Z, Zhou J, Ren T, et al. Salt stress decreases seedling growth and development but increases quercetin and kaempferol content in *Apocynum venetum*. Plant Biol 2020;22(5):813–21. <https://doi.org/10.1111/plb.13128>. PMID: 32378758.
- [32] Martínez V, Mestre TC, Rubio F, et al. Accumulation of flavonols over hydroxycinnamic acids favors oxidative damage protection under abiotic stress. Front Plant Sci 2016;7:838. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00838>.
- [33] Shafi A, Zahoor I, Mushtaq U. Proline accumulation and oxidative stress: diverse roles and mechanism of tolerance and adaptation under salinity stress. In: Akhtar MS, editor. Salt stress, microbes, and plant interactions: Mechanisms and molecular approaches. Singapore: Springer; 2019. p. 269–300. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8805-7_13.
- [34] Meena A, Dubey MK, Meena M, Upadhyay RS. Mannitol and proline accumulation in *Lycopersicon esculentum* during infection of *Alternaria alternata* and its toxins. In: Proceedings of the fourth international conference on advances in applied science and environmental technology, New York, USA, 7–8 May 2016; pp. 36–40.
- [35] Scarano A, Chieppa M, Santino A. Looking at flavonoid biodiversity in horticultural crops: A colored mine with nutritional benefits. Plants 2018;7(4):98. <https://doi.org/10.3390/plants7040098>. PMID: 30405037.