



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

Evaluación del efecto de diferentes dosis de vermicomposta y condiciones de estrés hídrico sobre el crecimiento, contenido de polifenoles y el perfil proteómico de *Moringa oleifera*

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

JORGE MARTÍN GUZMÁN ALBORES

DIRECTOR DE TESIS:

DR. VÍCTOR MANUEL RUIZ VALDIVIEZO

TUXTLA GUTIÉRREZ

NOVIEMBRE 2020



Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez
División de Estudios de Posgrado e Investigación

"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas **24/noviembre/2020.**

OFICIO No. DEPI-659/2020.

C. M.C. JORGE MARTÍN GUZMÁN ALBORES
PASANTE DEL DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
EGRESADO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ
PRESENTE.

Habiendo recibido la comunicación, por parte de los CC. DR. VÍCTOR MANUEL RUIZ VALDIVIEZO, DR. FEDERICO ANTONIO GUTIERREZ MICELI, DR. MIGUEL ABUD ARCHILA, DR. JOAQUIN ADOLFO MONTES MOLINA, en el sentido de que se encuentra satisfactorio el contenido de la tesis denominada "Evaluación del efecto de diferentes dosis de vermicomposta y condiciones de estrés hídrico sobre el crecimiento, contenido de polifenoles y el perfil proteómico de Moringa oleifera", elaborada por usted, como prueba escrita para obtener el Grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos y Biotecnología, AUTORIZAMOS a que se proceda a la impresión de la misma.

SIN MAS POR EL MOMENTO ENVIO UN CORDIAL SALUDO.

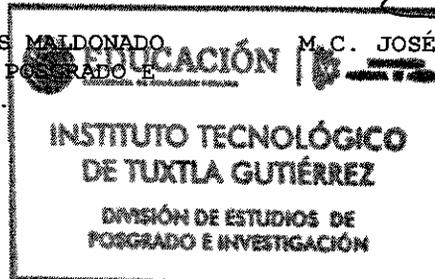
ATENTAMENTE.

Vo. Bo.

Educación Tecnológica
con Sentido Humano

Excelencia en
"Ciencia y Tecnología"

DR. JUAN JOSÉ VILLALOBOS MALDONADO
JEFE DE LA DIVISION DE POSGRADO E
INVESTIGACION.



M.C. JOSÉ MANUEL ROSADO PÉREZ
DIRECTOR.

C.c.p. Servicios escolares
C.c.p. Archivo



AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca otorgada (590455) para la realización del Doctorado en Ciencias de los alimentos y Biotecnología.

Al Tecnológico Nacional de México por el financiamiento (5663.15-P) para el desarrollo del proyecto.

A la Dr. Víctor Manuel Ruíz Valdiviezo por la dirección y apoyo en este trabajo. A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Federico Antonio Gutiérrez Miceli, Dr. Miguel Abud Archila y Dr. Joaquín Adolfo Montes Molina, por sus valiosas aportaciones a esta tesis. Al Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa por el apoyo incondicional en el análisis proteómico, al M. en C. Alberto Barrera Pacheco, Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular, División de Biología Molecular, a la M en C. Martha Leticia Ramírez Merchant por su apoyo y motivación, a mis amigos y compañeros del laboratorio 4 del Polo Tecnológico Nacional de México por todo el apoyo, motivación y consejos en la realización de este trabajo y a mi familia por toda la motivación en todo el proceso del doctorado.

RESUMEN

El rápido crecimiento de la población en los últimos años ha propiciado el desarrollo de investigaciones enfocadas en la búsqueda de alternativas de alimentos ricos en nutrimentos y metabolitos secundarios. Entre las plantas que se han estudiado por su alto contenido de proteínas, aminoácidos, vitaminas y compuestos fenólicos se encuentra el género *Moringa*. Sin embargo, los metabolitos secundarios y primarios, así como también el rendimiento de los cultivos se ven afectados por el estrés por el exceso o déficit hídrico. Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes dosis de vermicomposta sobre el crecimiento, desarrollo, contenido de clorofila, concentración de compuestos fenólicos y el perfil proteómico en hojas de *Moringa oleifera* sometida a estrés hídrico en un experimento en invernadero. El diseño experimental fue un diseño de parcelas divididas con bloques completamente aleatorizado con tres réplicas biológicas. Inicialmente el suelo fue caracterizado y enmendado con vermicomposta y urea a la misma tasa de fertilización. El volumen y frecuencia de riego fueron controlados para cada uno de los niveles de capacidad de retención agua (CRA), bajo (20% de CRA), óptimo (40 % CRA) y alto (60% de CRA). La concentración de proteínas, el patrón electroforético en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) fueron determinados, mientras que el perfil proteómico se realizó empleando el análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). La concentración de compuestos fenólicos y flavonoides, la actividad antirradical y enzima peroxidasa fueron evaluados en hojas de *Moringa oleifera* en cada condición de cultivo. El análisis proteómico LC-MS//MS permitió identificar un total de 157 proteínas a partir de extractos de hojas de *Moringa* de las cuales 15 fueron proteínas diferenciales en condiciones de estrés con respecto al control (sin estrés). El crecimiento y el contenido de proteínas en *Moringa* dependieron de la dosis de fertilización con vermicomposta e indicaron las ventajas de este tipo de enmienda orgánica sobre el estrés hídrico en comparación con el control y la fertilización química. Así mismo, la aplicación de vermicomposta mejoró la respuesta fotosintética y fisiológica en condiciones de déficit hídrico. Por otro lado, bajo condiciones de anegamiento la adición de vermicomposta a dosis de 300 y 500 kg N ha⁻¹ aumentaron el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante en comparación con las condiciones óptimas y déficit hídrico, por lo tanto, las enmiendas con vermicomposta mitigaron los efectos del estrés hídrico.

Palabras claves: LC-MS/MS, Vermicomposta, Proteómica, *Moringa oleifera*

ABSTRACT

Rapid population growth in recent years has led to the development of research focused on finding alternative foods rich in nutrients and secondary metabolites. Among the plants that have been studied for their high content of proteins, amino acids, vitamins, calcium, minerals and phenolic compounds found in the genus *Moringa*. However, secondary and primary metabolites, as well as crop yield, are affected by abiotic stress mainly by water excess or deficit. Therefore, the aim of this work was to evaluate the effect of different vermicompost doses on growth, development, chlorophyll content, phenolic compounds concentration and proteomic profile in *Moringa oleifera* leaves subjected to hydric stress in a greenhouse experiment. The experimental design was a fully randomized split-plot design with three biological replicates. Initially, the soil was dried, characterized, and amended with vermicompost and urea at the same rate of fertilization. The volume and frequency of irrigation were controlled for each of the levels of water holding capacity (WHC), low (20% WHC), optimal (40% WHC) and high (60% WHC). The protein concentration and the electrophoretic pattern were determined using the Bradford technique and polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) respectively, while the proteomic profile was performed using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis. The activity of the enzyme peroxidase, the concentration of phenolic and flavonoid compounds and anti-radical activity were evaluated in *Moringa oleifera* leaves in each culture condition. The proteomic analysis LC-MS//MS allowed the identification of a total of 157 proteins from *Moringa* leaf extracts of which 15 were differential proteins under stress conditions with respect to the control (without stress). Growth and protein content in *Moringa* depended on the dose of vermicompost fertilization and indicated the advantages of this type of organic amendment on water stress compared to chemical control and fertilization. Likewise, the application of vermicompost improved the photosynthetic and physiological response under water deficit conditions. On the other hand, under waterlogged conditions the addition of vermicompost at doses of 300 and 500 kg N ha⁻¹ increased the content of phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity compared to optimal conditions and water deficit, therefore, vermicompost amendments mitigated the effects of water stress.

Keywords: LC-MS/MS, vermicompost, proteomics, *Moringa oleifera*

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS	i
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Generalidades de <i>Moringa oleifera</i> Lam.....	2
2.2. Compuestos fenólicos y su relación con el estrés hídrico	5
2.3. Proteínas y péptidos de <i>Moringa oleifera</i>	9
2.4 Cultivo de <i>Moringa oleifera</i>	12
2.5 Insumos orgánicos.....	12
2.6 Vermicompostaje	13
2.7 Estrés hídrico.....	15
2.7.1. Tipos de estrés	15
2.7.2 Estrés por déficit hídrico	18
2.8 Análisis proteómico en plantas	19
2.9 Análisis metabolómico en plantas.....	20
2.9.1 Análisis metabolómico dirigido	22
2.9.2 Análisis metabolómico no dirigido	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. OBJETIVOS	25
4.1. Objetivo general	25
4.2. Objetivos específicos.....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1. Materiales biológicos	26
5.2. Caracterización del suelo	26
5.3. Cultivo de <i>Moringa oleifera</i>	26
5.4. Establecimiento del experimento	26
5.5. Determinación de las variables morfométricas	27
5.6. Determinación del contenido de clorofila	27
5.7. Preparación del material biológico.....	28
5.8. Extracción de proteínas	28

5.9. Determinación de proteínas en las hojas <i>Moringa oleifera</i> por el método de Bradford ..	28
5.10. Electroforesis SDS-PAGE.....	28
5.10.1. Desnaturalización de las proteínas	29
5.11. Actividad enzimática de la enzima peroxidasa	29
5.12. Análisis proteómico de hojas de <i>Moringa oleifera</i> mediante LC- MS/MS.....	30
5.13. Análisis bioinformático de proteínas de hojas de <i>Moringa oleifera</i>	30
5.14. Procedimiento de extracción de compuestos fenólicos y flavonoides en hojas de <i>Moringa oleifera</i>	31
5.14.1 Contenido de fenoles totales	31
5.14.2 Contenido de flavonoides totales	31
5.14.3 Determinación de actividad antirradical por ensayo DPPH	32
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	33
6.1. Caracterización del suelo	33
6.2. Variables morfológicas del cultivo de <i>Moringa oleifera</i> en invernadero.....	34
6.3 Efecto del estrés hídrico sobre las características morfológicas, contenido de proteínas y clorofila en <i>Moringa oleifera</i>	35
6.4 Contenido de clorofila en hojas de <i>Moringa oleifera</i> en condiciones de estrés hídrico....	39
6.5 Actividad enzimática de la peroxidasa (POD) en hojas de <i>Moringa</i> en condiciones de estrés hídrico	41
6.6 Análisis proteómico de hojas de <i>Moringa oleifera</i> cultivadas con diferentes dosis de vermicomposta en condiciones de estrés hídrico.	42
6.7 Identificación de proteínas expresadas por hojas de <i>Moringa oleifera</i> e respuesta al estrés hídrico.....	43
6.8 Análisis del contenido de compuestos fenólicos y potencial antioxidante de hojas de <i>Moringa oleifera</i> en condiciones de estrés hídrico.....	48
7 . CONCLUSIONES	51
8. PERSPECTIVAS Y SUGERENCIAS.....	52
9. BIBLIOGRAFÍA	53
10. ANEXOS.....	85

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Caracterización de suelo y vermicomposta	33
Cuadro 2. Efecto de la enmienda orgánica y química en el crecimiento de <i>Moringa</i>	34
Cuadro 3. Efecto del estrés hídrico sobre el crecimiento de <i>Moringa oleifera</i>	38
Cuadro 4. Efecto del estrés hídrico sobre el contenido de clorofila en hojas de <i>Moringa oleifera</i>	40
Cuadro 5. Actividad enzimática de peroxidasa en hojas de <i>Moringa</i> bajo estrés hídrico.....	41
Cuadro 6. Contenido de compuestos fenólicos y porcentaje de captación de radicales libres en hojas de <i>Moringa oleifera</i> bajo condiciones de estrés hídrico.....	48
Cuadro 7. Efecto del estrés hídrico sobre el contenido de compuestos fenólicos y porcentaje de captación de radicales libres en hojas de <i>Moringa oleifera</i>	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de la planta de <i>Moringa</i>	4
Figura 2. Diseño experimental.....	27
Figura 3. Establecimiento del método de extracción de proteínas en hojas de <i>Moringa</i> ..	42
Figura 4. Diagrama de Venn de las proteínas expresadas en diferentes condiciones de cultivo	44
Figura 5. Red de interacción de ATP sintetasa de hojas de <i>Moringa</i> en condiciones sin estrés	45
Figura 6. Red de interacción de clorofila a-b en condiciones de estrés por déficit	46
Figura 7. Red de interacción de rubisco en condiciones de estrés por déficit hídrico.....	47

1. INTRODUCCIÓN

Moringa oleifera conocido comúnmente como el árbol del rábano por el sabor característico de sus raíces pertenece a la familia *Moringaceae*, cuya importancia radica principalmente por su alto contenido de nutrimentos, así como también su diversidad de metabolitos secundarios presentes en sus semillas, hojas, flores y raíces (Oyeyinka y Oyeyinka, 2018). Este árbol tiene un gran potencial para su cultivo en México, así como también en muchas partes de América por su combinación singular de propiedades, las hojas son comestibles y ricas en proteínas, con un perfil de aminoácidos muy balanceado. Al mismo tiempo contiene vitaminas, principalmente A y C, en altas cantidades, así como metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, alcaloides, terpenos y flavonoides (Siddhuraju y Becker, 2003). Los frutos jóvenes son comestibles y las semillas producen un aceite comestible y un lubricante de alta calidad. Sus hojas ofrecen un forraje nutritivo para los animales, así como también los residuos de las semillas después de la extracción del aceite (Sánchez et al., 2006). La disponibilidad de agua es una de las limitaciones más importantes para la fotosíntesis y productividad de la planta (Akula y Ravishankar, 2011); el control adecuado del estrés hídrico de la planta, antes de que los síntomas de daño se hagan visibles, es necesario e imprescindible reactivar la vitalidad de la planta con los programas de riego adecuados de lo contrario esto puede influir en la fenología de la planta y en consecuencia en su productividad, calidad del producto y rendimiento (Bowden et al., 2010). Una de las alternativas para controlar el estrés hídrico ha sido el uso de vermicomposta ya que mantiene la estructura del suelo, rico en todo tipo de micronutrientes y macro nutrientes a través de la fijación de nitrógeno, solubilización o mineralización de fosfato y potasio, liberación de sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas proporcionando una mejor absorción de nutrientes y una mayor tolerancia a la sequía y al estrés por humedad (Sinha et al., 2010). Para poder entender los cambios fenológicos, metabólicos y morfológicos de las plantas en condiciones de estrés a nivel proteómico es necesario el uso de análisis instrumentales como LC-MS/MS, las cuales permiten la identificación de proteínas diferenciales en distintas condiciones de cultivo, una proteína diferencial permite estudiar las funciones biológicas, modificaciones o proteínas únicas en diferentes condiciones (Khan et al., 2019). Por esta razón, esta investigación ofrece el primer análisis proteómico en hojas de *Moringa oleifera*

en condiciones de estrés hídrico, así como también evaluar el efecto de diferentes tasas de fertilización con vermicomposta bajo estas condiciones en cultivo en invernadero.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de *Moringa oleifera* Lam.

La planta de *Moringa oleifera*, es nativa de la India, se cultiva en todo el subcontinente por alto contenido de nutrimentos y metabolitos secundarios presentes en sus vainas tiernas, hojas y flores. *Moringa oleifera* Lam es uno de los árboles más conocidos y de mayor distribución y especies que proviene de la familia monogénica *Moringaceae* (Nadkarni, 1976; Ramachandran et al., 1980). El cultivo de la *Moringa* en la India se presenta principalmente en los estados de Tamil Nadu, Karnataka, Kerala y Andhra Pradesh. La India es el mayor productor de *Moringa* con una producción anual de 1.1 a 1.3 millones de toneladas de frutas tiernas de una superficie de 38,000 ha. Mientras que en Puerto Rico se cultiva más que nada como una planta ornamental, como setos y a lo largo de cercos. Se ha naturalizado al lado de caminos y carreteras en los llanos costeros y en los cerros bajos al pie de las montañas.

La planta se encuentra en estado silvestre y se cultiva a lo largo de los llanos, especialmente en las cercas y en los patios de las casas, se desarrolla mejor en el clima isleño tropical, y es abundante cerca de las camas de arena de los ríos y arroyos (Anwar et al., 2007). *Moringa oleifera* Lam tolera un amplio rango de precipitaciones, las condiciones óptimas de precipitación anual se estiman en 250 mm y el máximo en más de 3,000 mm y un pH de 5.0 a 9.0 (Palada y Changl, 2003).

En su hábitat natural, las fluctuaciones anuales de temperatura tienden a ser muy marcadas, con temperaturas a la sombra mínimas y máximas oscilando entre -1 a 3°C hasta 38 a 48 °C durante los meses más fríos y los más calientes, respectivamente, la precipitación anual en esta región oscila entre 750 y 2,200 mm (Leone et al., 2015). *Moringa oleifera* es muy resistente a la sequía y se cultiva en regiones áridas y semiáridas de la India, Paquistán, Afganistán, Arabia Saudita y África del este, en donde la precipitación puede ser de 300 mm (Ramachandran et al.,1980). En Puerto Rico, la *Moringa* se ha naturalizado hasta cierto punto en lugares con una precipitación anual de entre 1000 y 1800 mm (Francis et al., 1991).

Las plantas de *Moringa* pertenecen a una familia mono-genérica llamada Moringaceae, que incluye 13 especies de arbustos y árboles que se originan en India y África y se distribuyen en muchos otros países tropicales y áridos (Salaheldeen et al., 2014; Al_husnan y Alkahtani, 2016). Estas plantas son bien conocidas como agentes medicinales, nutricionales y de purificación de agua (Salaheldeen et al., 2015).

Por otro lado, algunos estudios han demostrado que los compuestos bioactivos de las plantas de *Moringa* podrían usarse para la innovación de productos alimenticios funcionales y para otras aplicaciones industriales de alimentos (Oyeyinka y Oyeyinka, 2018).

La clasificación taxonómica de *Moringa oleifera* es la siguiente (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>):

Dominio: Eukaryota

Reino: Viridiplantae

Filo: Streptophyta

Subclase: Rosids

Orden: Brassicales

Familia: *Moringaceae*

Género: *Moringa*

Se conoce comúnmente como árbol de rábano picante (que describe el sabor de sus raíces) o caña-fístula (que describe la forma de sus vainas). Las flores y los frutos aparecen dos veces cada año, y las semillas o esquejes pueden propagar el árbol (Tsaknis y Lalas, 2002).

Es un árbol deciduo de tamaño pequeño y crecimiento acelerado que usualmente alcanza de 10 a 12 m de alto. Tiene una copa abierta y esparcida de ramas inclinadas y frágiles, un follaje plumoso de hojas pinadas en tres, y una corteza gruesa, blanquecina (figura 1). Se valora principalmente por sus frutas, hojas, flores, raíces, todas comestibles, y por el aceite (también comestible) obtenido de las semillas. Se usa extensamente en la medicina tradicional en las áreas en donde es nativo y en donde ha sido introducido (Fahey, 2005).

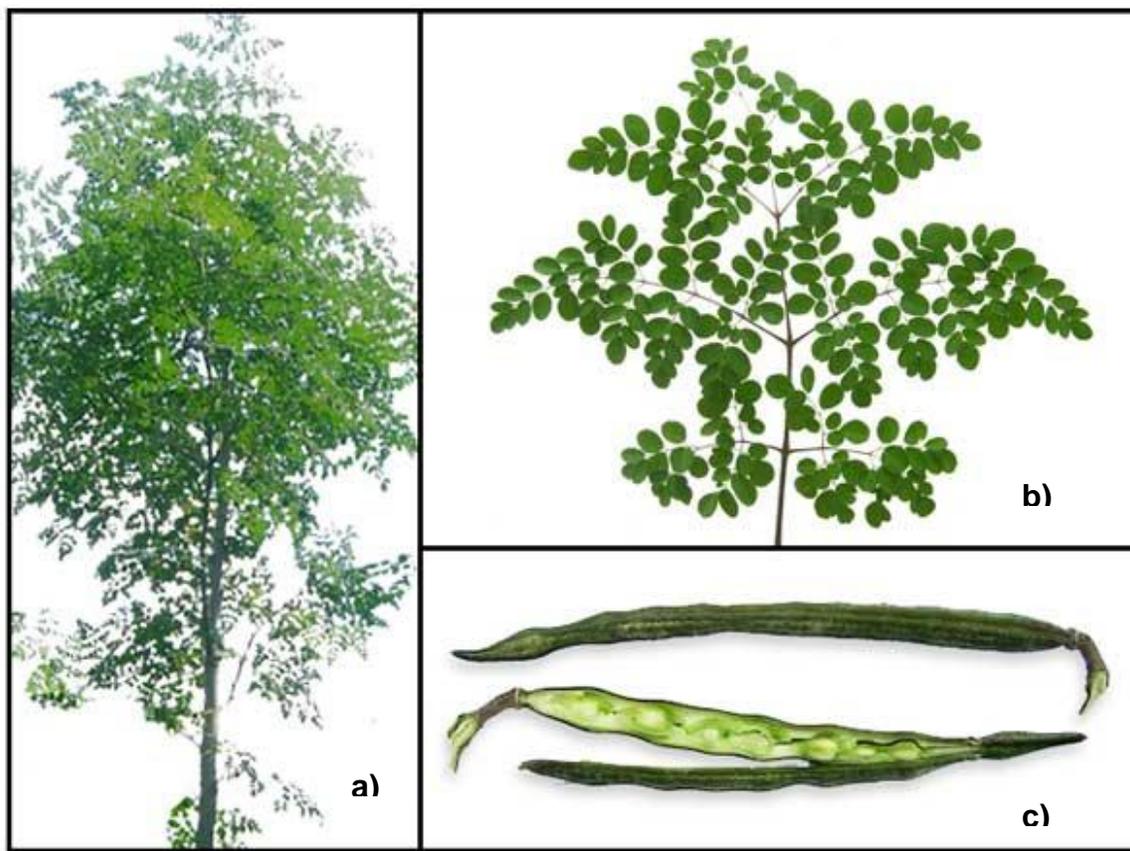


Figura 1. Morfología de la planta de *Moringa oleifera*. a) ramas y tallo, b) hojas y c) semillas (<http://www.ecoagricultor.com>)

La corteza, savia, raíces, hojas, semillas, aceite y flores de *Moringa oleifera* se utilizan como remedio popular para los dolores de estómago, catarro, el cáncer, las úlceras gástricas, enfermedades de la piel, disminución de azúcar en la sangre, condiciones nerviosas, la diabetes, la fatiga, la fiebre del heno, la impotencia, edema, calambres, hemorroides, dolores de cabeza, dolor en las encías, aumenta la lactancia y la densidad ósea. También se utilizan para mejorar la vista, causa un mejor desarrollo del cerebro, mejora el funcionamiento del hígado, la vesícula, el aparato respiratorio y digestivo y el sistema inmunológico, y como limpiador de la sangre (Patel et al., 2010). Debido a la alta cantidad y alta calidad de los compuestos bioactivos de las plantas de *Moringa*, estas plantas podrían usarse en varias tecnologías de alimentos como agentes antimicrobianos, factores antioxidantes y fortificantes de alimentos, entre otras aplicaciones nutricionales y tecnológicas (Ogunsina y Indrani, 2011; Manaois et al., 2013; Nkukwana et al., 2014; Radha et al., 2015; Devisetti et al., 2016; Oyeyinka y Oyeyinka, 2018).

Por ejemplo, el empleo de los extractos acuosos de la hoja de *Moringa* ha demostrado ser una alternativa para la aplicación de alimentos, porque pueden conservar los alimentos al inhibir la oxidación de los lípidos y al controlar una amplia gama de microorganismos patógenos, como las bacterias y los hongos, que son importantes en la industria alimentaria (Al_husnan y Alkahtani, 2016; Shah et al., 2015). Además, la composición química y los supuestos beneficios para la salud humana del aceite de *Moringa* nos permiten considerar esta planta como un alimento nutracéutico (Sánchez-Machado et al., 2015). Finalmente, debido a la importancia de los compuestos bioactivos en diferentes sectores comerciales, recientemente se han realizado varios esfuerzos para determinar los métodos más apropiados y estandarizados para la extracción y análisis de estos compuestos de diferentes materiales vegetales y matrices de alimentos, incluidas las plantas de *Moringa* y los productos derivados (Sánchez-Machado et al., 2015; Anudeep et al., 2016; Nouman et al., 2016; Rodríguez-Pérez et al., 2016).

Diversas investigaciones han revelado que las hojas de *Moringa oleífera* contienen un contenido de proteínas significativamente alto (20-35% del peso seco). Además, el perfil nutricional en las hojas de *M. oleífera* está bien equilibrado con los aminoácidos esenciales y un enriquecimiento de ácido graso insaturado, que involucra el ácido alfa linoleico, que es muy inusual en los alimentos vegetales (Gopalakrishnan et al., 2016; Moyo et al., 2011).

2.2. Compuestos fenólicos y su relación con el estrés hídrico

Los metabolitos secundarios desempeñan un papel importante en los procesos ecológicos y fisiológicos de las plantas, así como en las interacciones entre plantas y animales y en la adaptación a las variables bióticas y abióticas (Horner, 1990). Factores ambientales como los nutrientes del suelo, la temperatura, la disponibilidad de agua y la luz pueden afectar la composición y concentración de estos compuestos, así como a las propiedades terapéuticas de las plantas medicinales (Akula y Ravishankar, 2011).

Existen diversos estudios sobre el aumento de los metabolitos secundarios en cultivos de *Lycopersicon esculentum* y *Aegiceras corniculatum* en condiciones de estrés ambiental. Sin embargo, algunas investigaciones indican que este efecto no es permanente y que, en tales situaciones, incluso puede producirse una disminución de los metabolitos secundarios (Akula

y Ravishankar, 2011). Debido a la reducción del crecimiento causada por la inducción del estrés de la sequía en las plantas medicinales, el carbono fijado durante la fotosíntesis se utiliza para producir metabolitos secundarios. Por lo tanto, cuando las plantas medicinales están expuestas a tensiones ambientales, se protegen de estas condiciones mediante diferentes metabolitos secundarios (Ashraf et al., 2018).

Los compuestos polifenólicos poseen una estructura química que permite eliminar ROS una vez que se forman durante el estrés por sequía (Petridis et al., 2012). Además de su función como antioxidantes, se ha considerado que la biosíntesis de fenilpropanoides actúa como filtro frente a los efectos dañinos de la radiación UV-B, que suele acompañar al estrés por sequía, contribuyen a la protección de la maquinaria fotosintética (Gill y Tuteja, 2010). Las principales clases importantes de compuestos fenólicos en hojas reportados incluyen alcoholes fenólicos, ácidos fenólicos, secoiridoides, flavonoides, derivados del ácido hidroxicinámico y lignanos. Numerosos estudios han explorado la presencia de un alto número de compuestos fenólicos en las hojas de olivo, especialmente: hidroxitirosol, tirosol, ácido p-hidroxibenzoico, luteolina 7-O-rutinosido, luteolina 7-O-glucósido, apigenina 7-O-glucósido, catequina, apigenina, verbascósido, oleuropeína, quercetina bajo condiciones de estrés (Michel et al., 2015). Asimismo, la concentración de los compuestos fenólicos en las hojas de diversos cultivos como el arroz, el maíz y el *Hypericum brasiliense* Choisy (Abreu y Mazzafera, 2005; Hura et al., 2008; Ayaz et al., 1999) generalmente aumentaron en condiciones de estrés por sequía. Desde un punto de vista molecular, esto puede atribuirse a que el estrés hídrico puede estimular la expresión del gen *Pal* asociado al aumento de la actividad de la enzima fenilalanina amoníaco-liasa (PAL) y por ende estimula la síntesis de compuestos fenólicos bajo estas condiciones (Lewis, 2017).

Varios estudios han reportado la presencia de compuestos fenólicos de diferentes tejidos de *Moringa* y han descrito su bioactividad tanto en pruebas *in vitro* como *in vivo*. Recientemente, Juhaimi et al. (2017) informaron que el contenido fenólico total de las hojas jóvenes de *M. oleifera* es un 22% más alto que el de las hojas jóvenes de *M. peregrina*, lo que probablemente hace que *M. oleifera* sea mejor fuente para la obtención de estos compuestos bioactivos. Entre las otras moléculas bioactivas, los principales compuestos fenólicos en las hojas de *M. oleifera* incluyen al menos 5 lignanos (mediorresinol,

isolariciresinol, secoisolariciresinol y epipinoresinol), 26 flavonoides (quercetina, kaempferol, apigenina, luteolina y miricetina) y 11 ácidos fenólicos y sus derivados (ácidos cafeicoquínico, feraloilquínico y cumaroquínico y sus isómeros) (Castro-López et al., 2017; Rodríguez-Pérez et al., 2015). Los flavonoides, metabolitos secundarios con varias funciones metabólicas, podrían considerarse los principales compuestos fenólicos en las plantas de *Moringa*.

Nouman et al. (2016) informaron que doce flavonoides, incluidos la quercetina, el kaempferol y la apigenina, constituyen la clase principal de compuestos fenólicos en siete cultivares de *M. oleifera*. Las cantidades de flavonoides totales registradas en los diferentes cultivares analizados correspondieron a 47.0, 30.0 y 20.0% para quercetina, kaempferol y derivados de apigenina, respectivamente. Estos hallazgos coinciden con Rodríguez-Pérez et al. (2015), quienes informaron los flavonoides como el grupo predominante de compuestos fenólicos en las hojas de *M. oleifera* y registraron 46, 34 y 7.7% para quercetina, kaempferol y derivados de apigenina, respectivamente. Sin embargo, es importante tener en cuenta que los rendimientos de compuestos fenólicos dependen en gran medida no solo de la estación, las condiciones climáticas y la aplicación de fertilizantes, sino también de la variedad genética y del cultivar, que podrían ser los factores más relevantes para la composición fitoquímica de *Moringa* (Nouman et al., 2016). Castro-López et al. (2017); Makita et al. (2016) y Nouman et al. (2016) reportaron 35, 35, 24 y 6% de quercetina, kaempferol, isorhamnetina y derivados de apigenina, respectivamente, tanto en *M. oleifera* como en *M. ovalifolia*. Estas investigaciones revelaron que la mayoría de los flavonoides en hojas de diferentes cultivares de *Moringa* están glicosilados con distintos grupos de azúcar (ramnosa, rutinosa y otros no identificados por los autores) y que las diferencias dependen de la maquinaria de glicosilación de cada planta. En general, se glicosilan los flavonoides con fines de almacenamiento en diferentes orgánulos, lo que aumenta la biodisponibilidad de estos compuestos para el consumo humano (Makita et al., 2016; Nouman et al., 2016). Además, los glucósidos flavonoides como la rutina se han identificado como uno de los compuestos más importantes responsables de la actividad antioxidante en los extractos de hojas de *M. peregrina*, lo que sugiere que esta propiedad de los compuestos fenólicos aún permanece a pesar de la glicosilación (Dehshahri et al., 2012).

Dos estudios recientes han reportado diferentes porcentajes de flavonoides, pero casi el mismo comportamiento en términos de los derivados de flavonoides presentes en las plantas de *Moringa*. Rodríguez-Pérez et al. (2016) informaron el porcentaje más alto (43.75%) de derivados de quercetina en hojas de *M. oleifera*, seguidos de porcentajes iguales (18.75%) de kaempferol, multiforina B y derivados de apigenina. Aunque no hay información suficiente sobre los compuestos fenólicos de *M. peregrina*, se ha informado que los niveles de estos compuestos varían de 88 ± 1.1 a 454 ± 16.3 mg por gramo de hojas secas según el solvente de extracción (Marwah et al., 2007; Dehshahri et al., 2012; Al-Owaisi, et al., 2014). Se han reportado flavonoides en extractos metanólicos de *M. concanensis* (Balamurugan y Balakrishnan, 2013). Sin embargo, es esencial realizar estudios destinados a describir y caracterizar químicamente las propiedades funcionales de estas especies de *Moringa* para aplicaciones alimentarias.

Nouman et al. (2016) indicaron que los ácidos fenólicos en las hojas de *M. oleifera* están presentes entre 77 y 187 μg por gramo de material seco, dependiendo de la variabilidad genética del cultivar. Además, se ha informado de que los ácidos fenólicos y los ácidos de cumáricos son los principales ácidos fenólicos en *M. oleifera*, que representan al menos 45.45 y 36.37%, respectivamente, de los ácidos fenólicos en las hojas de esta planta, según el método de extracción (Amaglo et al., 2010; Nouman et al., 2016; Rodríguez-Pérez et al., 2015; Rodríguez-Pérez et al., 2016). Este resultado concuerda con los valores reportados en el estudio realizado por Makita et al. (2017), quienes reportaron por primera vez la presencia de ácidos cis y trans 3-acilo, 4-acilo y 5-acil-cafeína, p-coumaroilquinico y feruloilquinico, entre otros glucósidos, en *M. ovalifolia*. Sin embargo, en su reciente estudio, Juhaimi et al. (2017) determinaron que los ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico y ácido p-hidroxibenzoico) son los principales ácidos fenólicos tanto en *M. oleifera* como en *M. peregrina* cultivados en Sudán. Esto sugiere que el área geográfica, el clima y la composición del suelo tienen una gran influencia en la composición fenólica de las plantas de *Moringa*. Por otro lado, Torres-Castillo et al. (2013) asociaron los contenidos fenólicos con actividad antioxidante en hojas, raíces y tallos de *M. oleifera*, siendo las hojas los órganos con la mayor cantidad de estos compuestos bioactivos. Además, los compuestos fenólicos se han asociado con las actividades antimicrobianas y antifúngicas de los extractos de *Moringa* (Al_husnan y Alkahtani, 2016; Tesfay et al., 2017), lo que sugiere que las propiedades funcionales de las

plantas de *Moringa* podrían estar estrechamente relacionadas con su composición bioquímica, como los contenidos fenólicos. Además, se ha demostrado que la presencia de pterigospermina y los bajos valores de pH causados por la adición de hojas de *M. oleifera* a los productos alimenticios es adecuada para controlar el crecimiento de microorganismos indeseables en los productos alimenticios (Jayawardana et al., 2015). Independientemente de los compuestos fenólicos específicos que están presentes (flavonoides o ácidos fenólicos), estas biomoléculas se han asociado con otras ventajas funcionales que previenen la oxidación de los lípidos y el daño hepático (Moyo et al., 2011; Shah et al., 2015).

2.3 Proteínas y péptidos de *Moringa oleifera*

La proteína es potencialmente el nutriente más importante en las plantas debido a que es el componente clave de las células y tejidos (Leser, 2013). Sin embargo, el estrés de la sequía induce una serie de cambios a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico en todos los órganos de las plantas (Anjum et al., 2011). La respuesta al estrés de las plantas representa un proceso complejo y altamente dinámico destinado a establecer una nueva homeostasis en condiciones de crecimiento desfavorables. Específicamente, los mecanismos de respuesta a la sequía incluyen la inducción de hormonas, la señalización de la cascada de quinasas, la regulación de la expresión génica, la eliminación de especies reactivas de oxígeno, la síntesis de osmolitos, la modulación de la estructura celular, la activación de los canales iónicos, el metabolismo de carbohidratos y energía, la asimilación de nitrógeno y el metabolismo de aminoácidos (Johnová et al., 2016; Wang et al., 2016).

Este proceso activo de homeostasis involucra genes, proteínas y metabolitos, pero estas últimas juegan un papel crucial al estar directamente involucradas en la estructura y el metabolismo de las células vegetales dando forma al fenotipo final (Kosová et al., 2015). En las plantas, la resistencia al estrés es conferida por proteínas que funcionan en la señalización del estrés, la regulación de la transcripción, la desintoxicación celular, la protección de macromoléculas y otros procesos (Kosová et al., 2015). Por lo tanto, los enfoques proteómicos comparativos han sido herramientas poderosas y prometedoras para investigar las respuestas al estrés de las plantas (Liu et al., 2015).

En cuanto al estudio de proteínas en *Moringa oleifera* se ha demostrado que los contenidos de proteínas en las hojas de *Moringa* varían de 22 a 36.7 g de proteína / 100 g de peso seco

(Gopalakrishnan et al., 2016; Makkar y Becker, 1997; Nouman et al., 2016; Vaknin y Mishal, 2017). Estos resultados concuerdan con los reportados por Amaglo et al. (2010), quienes registraron el mayor contenido de proteína (29.4 g y 7.8 de proteína / 100 g de peso seco) en hojas de *Moringa*.

Por otro lado, las plantas de *Moringa* contienen péptidos alcalinos que varían de 6 a 16 kDa y lectinas con propiedades aglutinantes para la purificación del agua (Bichi, 2013; Santos et al., 2009), la presencia de otros compuestos bioactivos con la naturaleza de la proteína de diferentes tejidos. Por lo tanto, el contenido de proteínas y la diversidad deben considerarse, ya que este grupo puede incluir péptidos y proteínas con varias bioactividades y aplicaciones en procesos industriales y nutrición humana, que actúan como agentes antioxidantes, antidiabéticos, antihipertensivos, antimicrobianos y caseinolíticos (Pinto et al., 2015; González-Garza et al., 2017). Recientemente, González-Garza et al. (2017) reportaron un aumento en las propiedades nutraceuticas como las actividades antioxidantes, antihipertensivas y antidiabéticas de las proteínas de las semillas de *M. oleifera* después de la digestión con pepsina-tripsina; este aumento se asoció con la composición de aminoácidos y el amplio espectro de péptidos generados por el posible efecto sinérgico de estas enzimas.

En las principales estructuras vegetativas de *M. oleifera* se han descrito enzimas hidrolíticas relacionadas con el reciclaje y el mantenimiento de procesos fisiológicos, incluidas las proteinasas, amilasas, celulasas e invertasas (Khatun et al., 2003; Pontual et al., 2012; Torres-Castillo et al., 2013). Las amilasas y proteinasas son enzimas con aplicaciones potenciales en la industria alimentaria. Según Torres-Castillo et al. (2013), el peso molecular de las amilasas de *M. oleifera* varía según la fuente de extracción, y las amilasas son generalmente activas a pH neutro, lo que hace que estas enzimas sean buenos aditivos auxiliares para la hidrólisis de almidones en panaderías para modificar las propiedades fisicoquímicas de productos finales.

Se ha sugerido que las proteinasas se agreguen a los productos alimenticios para degradar parcialmente algunas proteínas y modificar las propiedades fisicoquímicas de la carne y los productos lácteos para aumentar la digestibilidad, mejorar la textura y afectar la retención de agua, la viscosidad y las propiedades gelificantes (Pontual et al., 2012). Aunque estas proteinasas responsables de la actividad proteolítica son activas a pH ácido, las proteinasas

de las hojas y raíces de *M. oleifera* también se han relacionado con la actividad proteolítica a pH alcalino y con la hidrólisis de proteínas complejas de la sangre, lo que sugiere el uso potencial de estas proteinasas. en la modificación y el procesamiento de productos alimenticios ricos en proteínas (Satish et al., 2012). Se han reportado enzimas hidrolíticas adicionales de *Moringa*; sin embargo, se necesitan más estudios para incluirlos en aplicaciones de alimentos. Las enzimas hidrolíticas más estudiadas han sido la celulasa y la invertasa, cuyas actividades están asociadas con la maduración de las hojas (Khatun et al., 2003). En este sentido, estas enzimas podrían aplicarse para la modificación de la textura, el dulzor o las propiedades reológicas de las materias primas o productos alimenticios.

Además, las enzimas involucradas en los procesos oxidativos en *M. oleifera* incluyen peroxidasas en raíces, tallos y hojas jóvenes, mientras que las enzimas polifenoles oxidadas se han caracterizado a partir de hojas maduras (Khatun et al., 2001; Khatun et al., 2012; Shank et al., 2013). Los niveles de peroxidasa de diferentes estructuras vegetativas varían de 13.3 a 167 unidades por miligramo de proteína; los tejidos callosos que se derivan de estos órganos presentan los niveles más altos de esta enzima (Khatun et al., 2012; Shank et al., 2013).

Recientemente, se ha demostrado la presencia de varios componentes de la naturaleza proteica, que incluyen propiedades procoagulantes, antihipertensivas, antiinflamatorias, antiproteolíticas y antidiabéticas, con efectos bioactivos en la salud humana (Pereira et al., 2011; Satish et al., 2012; González-Garza et al., 2017). Por lo tanto, el estudio de estas moléculas constituye un punto de partida para el diseño de alimentos funcionales o suplementos nutricionales con potencial nutracéutico a partir de plantas de *Moringa*. Los extractos de las raíces y hojas de *M. oleifera* han mostrado propiedades procoagulantes y fibrinogenolíticas relacionadas con la presencia de varias actividades proteolíticas y, por lo tanto, se consideran para uso potencial como agentes antihemorrágicos. Es importante tener en cuenta que debido a que se ha detectado dicha actividad proteolítica para la hidrólisis de fibrina y caseína, estos extractos tienen un uso potencial para modificar texturas en productos lácteos y cárnicos, además del potencial clínico indicado (Satish et al., 2012). La proteína Mo-CBP4 (proteína de unión a quitina *M. oleifera* 4) se aisló de las semillas de *Moringa*, disminuye los calambres abdominales relacionados con el dolor en aproximadamente un

50%, y aunque su mecanismo de acción aún se desconoce, esta proteína es resistente a la digestión proteolítica y altas temperaturas y, por lo tanto, se considera que tienen un buen potencial para diseñar fármacos específicos o proporcionar propiedades funcionales para alimentos derivados de semillas de *Moringa* (Pereira et al., 2011). Además, se han notificado inhibidores de la proteasa activa contra la tripsina, la quimotripsina, la elastasa, la trombina, la catepsina B y la papaína en las raíces y hojas de *Moringa*; esto abre la posibilidad de aplicar estos agentes con fines terapéuticos junto con agentes para disminuir la hidrólisis de proteínas en alimentos, específicamente en alimentos de mar y productos que requieren largos períodos de almacenamiento a bajas temperaturas (Bijina et al., 2011).

Los componentes proteicos antihipertensivos son otras moléculas biofuncionales interesantes que se han descrito en semillas y hojas de *Moringa*. Estas biomoléculas tienen una inhibición considerable y específica contra la enzima convertidora de angiotensina cuando están en el estado nativo; sin embargo, los productos de hidrólisis enzimática con pepsina y tripsina aumentaron la inhibición a niveles comparables a los medicamentos de referencia (Mansurah et al., 2015).

2.4 Cultivo de *Moringa oleifera*

La propagación puede ser por semillas o de manera vegetativa a partir de esquejes. Las semillas viables germinan en cinco a doce días. Las semillas de *Moringa* no tienen período de latencia, por lo que se pueden plantar tan pronto como estén maduras y van a mantener su capacidad de germinar hasta por un año. Un árbol de *Moringa* en etapa adulta puede producir entre 15,000 y 35,000 semillas por año, con un peso promedio por semilla de 0.3 g y una proporción núcleo- cáscara de 15:25. El árbol es de crecimiento rápido, y puede alcanzar una altura promedio de seis a siete metros al año en las zonas que reciben menos de 400 mm de precipitación media anual (Makkar y Becker, 1997).

2.5 Insumos orgánicos

El uso de insumos orgánicos, como la paja, el abono verde, el abono o el estiércol animal, contribuye al incremento del contenido de materia orgánica del suelo (MOS) de un suelo (Panagos et al., 2015). El contenido de materia orgánica generalmente se considera un

indicador importante para la fertilidad del suelo (Reeves, 1997), ya que se sabe que promueve la agregación y estabilización de la estructura del suelo, aumenta la disponibilidad de nutrientes y mejora la capacidad de retención de agua (Johnston et al., 2009). Además, el contenido de materia orgánica puede tener beneficios medioambientales como el apoyo a la biodiversidad del suelo o la inmovilización de contaminantes orgánicos tóxicos (Chang et al., 2007; Bollag et al., 1992). Los agro-ecosistemas tropicales generalmente tienen recursos limitados, lo que justifica el uso de insumos orgánicos como complemento de los fertilizantes minerales para reponer los nutrientes del suelo (por ejemplo, nitrógeno para el crecimiento de los cultivos (Rasche y Cadisch, 2013). Una alternativa que se podría explorar en México es el uso del vermicomposta debido a que en el país se producen grandes cantidades de desechos orgánicos tales como: los biosólidos derivados de las plantas de tratamiento de aguas residuales, las excretas de animales en áreas de producción y los desechos domésticos y agrícolas (Ndegwa y Thompson, 2001). Estos residuos orgánicos, en calidad de composta o vermicomposta, tienen aplicación en la horticultura, producción de vegetales, en la agricultura o para restauración de suelos degradados (Krogman et al., 1997, Hernández et al., 2003; Gutiérrez-Miceli et al., 2007).

2.6 Vermicompostaje

La vermicomposta es un tipo de eco-abono natural, que es el producto de un proceso de degradación de la materia orgánica a través de la interacción entre las lombrices y microorganismos (Hu et al., 2004). Consecuentemente, el proceso de vermicompostaje permite generar un sustrato orgánico con alto contenido de nutrientes que son fácilmente absorbidos por las plantas tales como nitrato, fósforo disponible, potasio, calcio y magnesio. Además, la vermicomposta ha sido una enmienda del suelo o un acondicionador excelente debido al incremento de la porosidad, aireación, el drenaje, la capacidad de retención de agua y la actividad microbiana (Edwards y Burrows, 1988 y Orozco et al., 1996). Al contrario, del compostaje no tiene aplicación directa en el suelo, ya que los nutrientes no están disponibles en forma libre debido a la falta de contenido microbiano que ayuda a la mineralización (Bhattacharya y Chattopadhyay, 2006). Los datos de la literatura indican que la vermicomposta contiene más compuestos orgánicos estables y humificados que los de la composta, tienen un efecto fertilizante prolongado debido a una liberación más lenta de

nutrientes y contienen concentraciones más altas de reguladores del crecimiento de las plantas, que ejercen un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas (Jack y Thies, 2006).

Adicional a ello, es conocido que la aplicación de vermicomposta mitiga el estrés hídrico en las plantas debido a que el aumento de la materia orgánica del suelo, mejora la estructura y aumenta la permeabilidad del agua y por ende la disponibilidad de los nutrimentos (Haynes y Naidu 1998; Najafi-Ghiri y Rahimi 2016). Por ello, la aplicación de este tipo de sustrato orgánico y sus extractos mejoran la fertilidad del suelo y estimula el crecimiento, la floración y el rendimiento de los frutos (Hudson 1994).

Por otro lado, la tolerancia al estrés hídrico se le atribuye al contenido de ácidos húmicos que posee la vermicomposta, ya que estas sustancias inducen la actividad de la H⁺-ATPasa que, a su vez, puede energizar los transportadores de iones secundarios y promover la absorción de nutrientes (Serrano, 1993). Aunado a ello, las sustancias húmicas pueden promover el crecimiento de las plantas mediante la inducción del metabolismo del carbono y el nitrógeno por medio de la enzima nitrato-reductasa (NR), la glutamato deshidrogenasa (GDH) y la glutamina sintetasa (GS) son enzimas vinculadas a las vías de asimilación del N (Hernández et al., 2015).

Otras características de la aplicación de la vermicomposta han sido la restauración de suelos contaminados por plaguicidas (Romero et al., 2006; Fernández-Bayo et al., 2009). También se ha reportado que la vermicomposta disminuye el efecto de la salinidad sobre la germinación y el crecimiento de las plantas (Bidabadi et al., 2017). Adicionalmente, el proceso de vermicompostaje permite conservar la mayor parte de los nutrimentos, reduciendo grandes cantidades de los agentes patógenos y los contaminantes orgánicos con respecto al material de partida (Ndegwa et al., 2000).

2.7 Estrés hídrico

La disponibilidad de agua es una de las limitaciones más importantes para la fotosíntesis y productividad de la planta; el control adecuado del estrés hídrico de la planta, antes de que los síntomas de daño se hagan visibles, es necesario e imprescindible para reactivar la vitalidad de la planta con los programas de riego adecuados. El estrés hídrico afecta el transporte de nutrimentos a la raíz y el crecimiento de la raíz. Sin embargo, las especies de cultivos y genotipos dentro de una especie se sabe que difieren en su capacidad para absorber los nutrimentos bajo condiciones de estrés de sequía (Garg, 2003). En general, la absorción de nutrimentos por las plantas de cultivo, cultivadas en suelo está fuertemente influenciado por varios factores, incluyendo el clima y la escasez de agua (Alam, 1999).

2.7.1. Tipos de estrés

Las plantas están sometidas a diferentes tipos de estrés, durante su crecimiento y desarrollo, tales como el estrés (biótico y/o abiótico) en las plantas. Así, los diferentes tipos de estrés dan lugar a la regulación positiva de genes asociados con la producción de metabolitos tales como los inhibidores de proteinasa, toxinas, entre otros (Rani y Prasannalaxmi, 2014).

El estrés abiótico se debe principalmente a diferentes factores como son la sequía, temperaturas extremas, frío, metales pesados o de alta salinidad; los cuales ponen en peligro el crecimiento de las plantas y la productividad en todo el mundo (Rani y Prasannalaxmi, 2014). Sin embargo, respuestas de las plantas al estrés abiótico asociados con la inducción de especies reactivas de oxígeno son menos estudiadas en comparación con las especies de estrés biótico que induce las especies reactivas de oxígeno (ROS) los cuales pueden actuar como moléculas de señalización relacionadas con la aclimatación de las plantas (Rani y Prasannalaxmi, 2014).

El estrés abiótico impacta directamente en el aparato fotosintético y se caracteriza por el cierre de las estomas, pérdida de turgencia, la reducción de la capacidad de retención de agua (CRA) y en casos graves la fotosíntesis se frena, el metabolismo es alterado y finalmente conduce a la muerte de la planta (Allen y Ort, 2001; Jaleel et al., 2008). Esto perjudica gravemente el crecimiento y desarrollo de las plantas. Junto con los cambios bioquímicos y

fisiológicos, el aumento de las condiciones de sequía puede aumentar la frecuencia y severidad de los brotes de la población de insectos (Paritsis y Veblen, 2011), porque el estrés ambiental aumenta la susceptibilidad de la planta a insectos herbívoros mediante la alteración química de la hoja y la fisiología de la planta entera (Koricheva *et al.*, 1998).

Con frecuencia las plantas están expuestas a restricciones ambientales, tales como la sequía y las altas temperaturas, las cuales están consideradas entre los factores ambientales más importantes que limitan la fotosíntesis alrededor del mundo (Berry y Björkman, 1980; Yordanov *et al.*, 1986; Lawlor y Uprety, 1993; Sinsawat *et al.*, 2004) y se sabe que se producen simultáneamente (Craufurd y Peacock, 1993; Jiang y Huang, 2001). La sequía limita la fotosíntesis a través de limitaciones estomatales y no estomatales (Lawlor y Cornic, 2002; Chaves *et al.*, 2003). Por otro lado, las condiciones de sequía también aumentan las concentraciones de los metabolitos secundarios en algunas especies de plantas (Hale *et al.*, 2005). Bajo estrés hídrico ligero, se ha observado una reducción en la conductancia de las estomas y las hojas mesofilicas; esto puede conducir a la difusión restrictiva de CO₂ del aire en los sitios de carboxilación (Flexas y Medrano, 2002). Conforme el estrés hídrico aumenta, se han reportado limitaciones fotosintéticas, ya sea como consecuencia del daño a los fotosistemas (Havaux *et al.*, 1986), como resultado de que la luz es absorbida en exceso de la capacidad de reducción de CO₂ (Navari-Izzo y Rascio, 1999), o de deficiencias en la fotofosforilación, la actividad Rubisco y / o la regeneración de la ribulosa-bifosfato (Boyer y Younis, 1983; Havaux *et al.*, 1988; Cornic y Massacci, 1996; Medrano *et al.*, 1997; Tezara *et al.*, 1999; Lawlor, 2002). Además, en muchas plantas, el estrés abiótico reduce los compuestos de defensa de las plantas y aumenta las proteínas digeribles que conducen a un mejor sabor para insectos herbívoros (Huberty y Denno, 2004; Gutbrodt *et al.*, 2011).

La tasa de fijación de CO₂ más baja que está asociada con el estrés hídrico puede disminuir la demanda de NADPH y ATP en el estroma del cloroplasto, el cual regula a la baja el transporte electrónico fotosintético. Por lo tanto, algunas adaptaciones que han llevado a la resistencia a estrés hídrico a nivel de fotosíntesis en las plantas, implican cambios en el contenido de pigmento de los fotosistemas a (i) reducir el alcance de la luz que se absorben en exceso de la capacidad de reducción de CO₂, (ii) incremento en la capacidad de disipación de energía en forma de calor y (iii) adaptar la estequiometría del fotosistema (He *et al.*, 1999;

Flexas y Medrano, 2002; Yuan et al., 2005). Sin embargo, las temperaturas que están por encima del óptimo para el crecimiento de la planta, causan reducciones importantes en la fotosíntesis neta (Wahid et al., 2007).

Por otro lado, bajo temperaturas moderadamente elevadas, la asimilación de CO₂ se reduce como consecuencia de la disminución en el estado de activación de la Rubisco (Crafts-Brandner y Salvucci, 2000; Salvucci y Brandner, 2004), lo cual se produce principalmente debido a la inactivación térmica de la Rubisco activasa (Salvucci et al., 2001; Haldimann y Feller, 2004; Salvucci y Brandner, 2004). Se ha considerado durante mucho tiempo que el aparato fotosintético es el sitio principalmente dañado bajo a temperaturas altas. Se ha sugerido que el fotosistema I (PSI) es más resistente al calor que el fotosistema II (PSII) (Havaux, 1993; Venkataramanaiah et al., 2003; Hu et al., 2004) debido a un aumento en el flujo cíclico de electrones que ocurre tras el tratamiento térmico (Sayed et al., 1994; Pastenes y Horton, 1996). El PSII, sin embargo, ha demostrado ser un componente sensible a diferentes formas de estrés, y es especialmente sensible al calor (Berry y Björkman, 1980; Mamedov et al., 1993, Havaux, 1993.). De hecho, el aumento de las temperaturas puede deteriorar el complejo de evolución del oxígeno del PSII (Nash et al., 1985; Enami et al., 1994; Büchel et al., 1999) y causar alteraciones en la fluidez de la membrana del tilacoide (Raison et al., 1982; Havaux, 1993), lo cual desestabiliza las interacciones proteína-lípido y, por lo tanto, la organización y la función del PSII (Vijayan et al., 1998).

En conjunto, la sequía y temperatura alta son responsables de la reducción del rendimiento de los cultivos en todo el mundo, en particular en frijoles (Slinkard et al., 1992; Monti et al., 1992), y ambos factores afectan directamente y / o indirectamente el proceso fotosintético. Por lo tanto, es probable que ambas limitaciones ambientales, que a menudo se producen simultáneamente, desencadenan vías comunes de defensa y resistencia en las plantas. De hecho, el análisis proteómico de las hojas de arroz (*Oryza sativa*) que fueron expuestos separadamente a la sequía y al calor dio como resultado la sobreexpresión de proteínas; estas proteínas se relacionan principalmente con la fotosíntesis y el atrapamiento de las especies reactivas de oxígeno (He et al., 2008). Pastori y Foyer (2002), reportaron que la sequía y el frío comparten procesos correspondientes a las señales redox como mecanismo de respuestas

de las plantas a ambos tipos de estrés; esto permite a las plantas que han sido expuestas previamente a una restricción ambiental, adaptarse o aclimatarse a la otra.

2.7.2 Estrés por déficit hídrico

El estrés por déficit hídrico limita el crecimiento y la productividad de plantas en más del 30% de áreas cultivadas del mundo (Massaci et al., 2008). Investigaciones realizadas en cultivos tales como: soja, maíz y arroz han indicado que el metabolismo de carbohidratos de las unidades reproductivas de una planta se ve afectado a gran medida bajo condiciones de suministro de agua limitado, resultando la acumulación de azúcares solubles (Liu et al., 2004; Nguyen et al., 2010).

Se ha reportado que la acumulación de carbohidratos en las hojas sometidas a estrés hídrico es un mecanismo de adaptación bajo condiciones de estrés en una gran variedad de cultivos, sin embargo, en unidades reproductivas se han reportado que el aumento en las concentraciones de carbohidratos da lugar al aborto (Andersen et al., 2002; Liu et al., 2004), o la esterilidad de las anteras (Nguyen et al., 2010; Fu et al., 2010). Por otra parte, los estudios realizados en otros cultivos han asociado altos niveles de especies reactivas de oxígeno con el aborto del ovario u óvulo (Sun et al., 2004; Hauser et al., 2005). Se ha reportado que concentraciones más altas disminuyen la esterilidad masculina en las anteras de arroz sometidas a estrés hídrico (Selote y Khanna-Chopra, 2004; Fu et al., 2010).

Las plantas necesitan agua para el crecimiento, pero el exceso de agua que se produce durante la inmersión o el anegamiento es dañino o incluso mortal. Una planta sumergida se define como "una planta de pie en el agua o completamente cubierto con agua" Catling 1992).

La inmersión somete a las plantas al estrés de poca luz, la difusión del gas limitada, pérdida de nutrientes del suelo, daños mecánicos, y una mayor susceptibilidad a plagas y enfermedades (Greenway y Setter 1996; Ram et al., 1999). Básicamente, las inundaciones (es decir, la inmersión) se pueden clasificar en "inundaciones repentinas" y "la inundación de aguas profundas" de acuerdo con la duración de la inundación y la profundidad del agua (Jackson y Ram, 2003; Bailey-Serres et al., 2010).

2.8 Análisis proteómico en plantas

El término "proteómica" fue utilizado por primera vez en la década de 1990 (James, 1997). Proteómica genera una descripción completa de las proteínas en los organismos y permite la caracterización de modulación de nivel de proteínas y modificaciones en respuesta a las perturbaciones. Proteómica abarca perfiles de proteínas, cuantificación de proteínas, las modificaciones posteriores a la traducción, así como las interacciones proteína / proteína (Baginsky, 2009).

La información de los genomas vegetales permitió el uso de tecnologías de alto rendimiento "ómicas", como la transcriptómica, la proteómica en gel y no basados en gel, y la metabolómica dirigidas y no dirigidas que proporcionan una plataforma novedosa para revelar sistemáticamente los aspectos funcionales de diversos procesos biológicos.

El término proteómica se ha asociado tradicionalmente con la separación de un gran número de proteínas de una célula u organismo mediante 2D-PAGE. Según esto, la proteómica comenzó en los años setenta cuando se empezaron a construir bases de datos de proteínas utilizando la electroforesis bidimensional. Sin embargo, la identificación de las proteínas era difícil debido a la falta de métodos caracterización de proteínas. En los años noventa, la espectrometría de masas surge como un método analítico muy poderoso, ya que elimina la mayoría de las limitaciones del análisis de proteínas. Actualmente muchas áreas de estudio han sido agrupadas dentro de la proteómica. Se pueden incluir, entre otros, los estudios de interacciones de proteínas, de modificaciones pos-traduccionales, el análisis funcional de proteínas y estudios de localización. Se puede hablar de dos tipos de proteómica: proteómica de expresión y proteómica del mapa celular (Gil, 2003).

La proteómica de expresión es el estudio cuantitativo de la expresión de proteínas entre muestras que difieren en alguna variable. En esta estrategia se compara la expresión del proteoma total o de subproteomas entre diferentes muestras. La información obtenida puede permitir la identificación de nuevas proteínas implicadas en transducción de señales, la identificación de proteínas específicas de una enfermedad y proteínas de interés en microbiología médica (Yan y Chen, 2005).

La proteómica del mapa celular o estructural es el estudio de la localización subcelular de las proteínas y de las interacciones proteína-proteína mediante la purificación de orgánulos o complejos y la posterior identificación de sus componentes mediante espectrometría de masas (Kosová et al., 2011). También se utiliza el término de proteómica funcional para referirse a diversas aproximaciones proteómicas que permiten el estudio y caracterización de un grupo de proteínas determinado proporcionando información importante sobre señalización, mecanismos de la enfermedad o interacciones proteína-fármaco (Gil,2003).

En la actualidad, la aplicación de la proteómica en plantas está jugando un papel importante en: (1) la comprensión de la biología y fisiología de la planta, (2) el desarrollo de biomarcadores de plantas para la salud humana y la seguridad alimentaria, y (3) el análisis de alimentos y problemas de bioseguridad (Yan y Chen, 2005). Aunado a ello, la proteómica de expresión diferencial se basa en la comparación de la composición de diferentes proteomas. En el campo de la investigación del estrés abiótico de las plantas, el caso más común es la comparación de proteomas aislados de plantas no estresadas (control) y los proteomas correspondientes en condiciones de estrés (Hashiguchir et al., 2010).

2.9 Análisis metabolómico en plantas

La metabolómica es un enfoque ómico que se puede utilizar para adquirir información completa sobre la composición de un metabolito para proporcionar una evaluación funcional del estado celular. Los estudios del metaboloma de plantas incluyen el análisis de una amplia gama de especies químicas con diversas propiedades físicas, desde compuestos iónicos inorgánicos hasta carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos derivados hidrofílicamente, y una gama de compuestos relacionados con los lípidos hidrófobos (Tiago et al., 2014). Esta complejidad trae enormes desafíos a las tecnologías analíticas empleadas actualmente en los programas de metabolómica de plantas, y se requieren poderosas herramientas para la separación y caracterización de esta extremadamente alta diversidad de compuestos presentes en matrices de muestras biológicas. El uso de la espectrometría de masas (MS) basada en plataformas analíticas para el perfil de respuesta de metabolitos al estrés que permite a algunas plantas adaptarse a las condiciones ambientales adversas es fundamental en los programas de investigación de biotecnología vegetal actual para el entendimiento y desarrollo de plantas tolerantes al estrés (Tiago et al., 2014).

Más de una década atrás, la metabolómica surgió como una herramienta complementaria para la genómica funcional que, junto con las bien establecidas tecnologías de alto rendimiento de secuenciación de ADN (genómica), el perfil de expresión del ARNm (transcriptómica), y el perfil de proteínas (proteómica), tienen el potencial de acelerar nuestra comprensión de las complejas interacciones moleculares en los sistemas biológicos (Bino et al., 2004; Saito y Matsuda, 2010). La metabolómica es un enfoque ómico que se puede utilizar para adquirir información completa sobre la composición de un metabolito para proporcionar una evaluación funcional del estado celular. Los metabolitos son moléculas estructuralmente diversas que se transforman químicamente durante el metabolismo celular. El metaboloma es la recolección cuantitativa de todos los compuestos de bajo peso molecular presentes en una célula u organismo en un estado fisiológico o de desarrollo en particular, como originalmente fue definido por Oliver y colaboradores (Oliver et al., 1998).

La metabolómica de plantas, por lo tanto, tiene como objetivo el sistema de la planta a nivel molecular para proporcionar una caracterización no sesgada del conjunto de metabolitos totales (metaboloma) de un tejido de la planta en respuesta a su entorno (Ferne et al., 2004; Hall, 2006).

Estudios de la metabolómica de plantas incluyen el análisis de una amplia gama de especies químicas con diversas propiedades físicas, desde compuestos inorgánicos iónicos hasta carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos derivados hidrofílicamente y una gama de compuestos relacionados con los lípidos hidrófobos. Esta complejidad trae enormes desafíos a las tecnologías analíticas empleadas actualmente en los programas de metabolómica de plantas, y se requieren poderosas herramientas para la separación y caracterización de esta extremadamente alta diversidad de compuestos presente en matrices de muestras biológicas. El metaboloma de las plantas también se extiende sobre un amplio rango dinámico en concentraciones que pueden variar desde femtomolar hasta milimolar (Ferne, 2003), y para agregar a esta complejidad, se estima que existen en el reino de las plantas más de 200,000 metabolitos diferentes (Fiehn, 2001, 2002). A diferencia de los genes y las proteínas, cuyas funciones están sujetas a la regulación epigenética y modificaciones postraduccionales, respectivamente, los metabolitos funcionan como firmas directas de la actividad bioquímica y por lo tanto son más fáciles de correlacionar con el fenotipo. Además, en contraste con la

transcriptómica y proteómica, los beneficios metabolómicos tiene la ventaja de no depender de la disponibilidad de la información específica del genoma del organismo para el análisis de datos (Kopka et al., 2004; Kopka, 2006).

El primer paso en la realización de la metabolómica es determinar el número de metabolitos que se desea medir. En algunos casos, puede ser de interés para examinar un conjunto definido de metabolitos mediante el uso de un enfoque específico.

En otros casos, un enfoque no directo o global se puede tomar en el que el mayor número posible de metabolitos son medidos y comparados entre muestras sin sesgo.

En última instancia, el número y la composición química de los metabolitos a estudiar es un atributo que define a cualquier experimento metabolómico y formas de diseño experimental con respecto a la preparación de la muestra y la elección de la instrumentación.

2.9.1 Análisis metabolómico dirigido

Este enfoque se refiere a un método en el que se mide una lista especificada de metabolitos, por lo general se centra en uno o más relacionados con las vías de interés (Dudley et al., 2010). Este enfoque puede ser eficaz para estudios farmacocinéticos de metabolismo de fármacos, así como para la medición de la influencia de agentes terapéuticos o modificaciones genéticas en una enzima específica (Nicholson et al., 2002).

Los avances en la espectrometría de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN) ofrecen claras ventajas para la realización de estudios metabolómicos dirigidos a causa de su especificidad y reproducibilidad cuantitativa, sin embargo, hay muchas herramientas de análisis para la determinación de metabolitos que podrían, en principio, ser considerados como ultravioleta espectroscopía -visible y de ionización de llama.

2.9.2 Análisis metabolómico no dirigido

Los métodos metabolómicos no focalizados son de alcance global y tienen el objetivo de medir simultáneamente muchos metabolitos como sea posible a partir de muestras biológicas sin sesgos. Aunque la metabolómica no focalizado se puede realizar mediante el uso de cualquiera de las tecnologías de RMN o MS, la cromatografía líquida seguida de MS (LC / MS) permite la detección de la mayoría de los metabolitos y por lo tanto ha sido la técnica de elección para el perfil metabólico (Burton et al., 2008; Nordstrom et al., 2008). Mediante el uso de LC / métodos metabolómicos basados en MS, miles de picos pueden detectarse de manera rutinaria a partir de muestras biológicas (Patti et al., 2013). Cada uno de estos picos se les conoce como características de metabolitos y corresponden a un ion detectado con una relación única-masa-carga y un tiempo de retención único (cabe señalar que algunos metabolitos pueden producir más de una función).

3. JUSTIFICACIÓN

Los cambios morfológicos y las interacciones fisiológicas en las plantas están muy influenciados por la intensidad de la luz, la temperatura, la textura del suelo y su capacidad de retención de agua (Azam et al., 2019). De estos factores, la disponibilidad de agua es un factor muy importante que es absoluto para el crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que el agua afecta el rendimiento de los cultivos y su calidad. La disponibilidad limitada de agua puede provocar un retraso en el crecimiento de las plantas, un rendimiento reducido y una mala calidad en la composición de los compuestos, ya que la división celular y el alargamiento son las funciones de las plantas más sensibles que son sensibles a la disponibilidad de agua (Hussain et al., 2008; Farooq et al., 2009). El estrés hídrico afecta los parámetros morfológicos en forma de disminución de la altura de la planta, área de hojas y raíces, longitud de la raíz, crecimiento y rendimiento, y características fisiológicas, disminución de la fotosíntesis, contenido de clorofila y eficiencia en el uso del agua (Hopkins y Hüner, 2009). Un componente importante utilizado en la agricultura sostenible para mitigar el estrés hídrico es el uso de fertilizantes orgánicos, como es el caso de la vermicomposta. Algunos de los factores importantes en el proceso de mitigación del estrés hídrico han sido las tasas de fertilización con nitrógeno de enmiendas orgánicas que se agregan a los suelos cultivados (Hosseinzadeh et al., 2018).

Moringa oleifera es una planta que en los últimos años ha tomado un gran interés, ya que sus hojas ricas en nutrientes, antioxidantes y compuestos fenólicos se utilizan como forraje para animales o en la producción de alimentos con alto contenido de proteínas (Moyo et al., 2011). Sin embargo, si las limitaciones climáticas se vuelven más severas y frecuentes bajo la influencia del cambio climático, pueden amenazar la supervivencia y la producción de *M. oleifera*, así como también su fisiología y crecimiento (Valladares et al., 2007). Por ello, se realizó una evaluación de la aplicación de diferentes dosis nitrogenadas de vermicomposta sobre el crecimiento, contenido de compuestos fenólicos, actividades antioxidantes y el perfil proteómico en cultivos de *Moringa oleifera* bajo condiciones de estrés hídrico a nivel invernadero.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la aplicación de diferentes dosis de vermicomposta sobre el crecimiento, contenido de compuestos fenólicos, y el perfil proteómico de *Moringa oleifera* bajo diferentes condiciones de estrés hídrico.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de estrés hídrico sobre el contenido de compuestos fenólicos provenientes de extractos de hojas *Moringa oleifera* cultivadas con insumos orgánicos.
- Evaluar el efecto de las diferentes dosis de fertilización con vermicomposta sobre las variables agronómicas en cultivos de *Moringa oleifera* sometidas a estrés hídrico.
- Evaluar la actividad de la peroxidasa y la actividad antirradical en hojas de *Moringa oleifera* fertilizadas con vermicomposta en condiciones de anegamiento y déficit hídrico.
- Evaluar la influencia del estrés hídrico sobre la síntesis de proteínas en hojas de *Moringa oleifera* fertilizada con vermicomposta.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales biológicos

Las semillas *Moringa oleifera* y el suelo fueron recolectados en el “Rancho la Escondida” ubicado en la zona de riego del distrito 101 del Municipio de la Concordia, Chiapas 16°06'58"N 92°41'20"O a una altitud de 550 msnm.

La parte experimental de la caracterización del suelo, extracción y cuantificación de proteínas, así como la identificación de los pesos moleculares de las plantas se desarrollaron en el laboratorio de Biología Molecular del Polo Tecnológico Nacional para el Desarrollo de Investigación y Pruebas analíticas en biocombustibles ubicado en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (16° 45' 26.2'' LN y 93° 10' 24.8'' LO; altitud=584 msnm).

5.2. Caracterización del suelo

El suelo muestreado fue caracterizado fisicoquímicamente utilizando la metodología reportada por Thomas, (1996) para pH, conductividad eléctrica descrito por Rhoades et al. (1989), capacidad de retención de agua descrito por Gee y Bauder (1986), nitrógeno total se midió por el método de Kjeldahl usando H₂SO₄ concentrado, K₂SO₄ y HgO para digerir la muestra (Bremner, 1996) y el fósforo se determinó por el método de Olsen (NOM-021-RECNAT-2000).

5.3. Cultivo de *Moringa oleifera*

El cultivo de *Moringa oleifera* con insumos orgánicos se realizó en el invernadero del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, utilizando una tasa de fertilización 300 y 500 kg de N ha⁻¹, vermicomposta y urea fueron utilizados como fuente de nitrógeno.

5.4. Establecimiento del experimento

Para la realización del experimento se utilizó un diseño de parcelas divididas con tres bloques completamente aleatorizados con tres replicas biológicas por cada tratamiento los cuales son: suelo + planta (control -), suelo + planta + urea 300 kg N ha⁻¹ (control +), suelo + planta +

vermicomposta 300 kg N ha⁻¹, suelo + planta + urea 500 kg N ha⁻¹, suelo + planta + vermicomposta 500 kg N ha⁻¹ y tres porcentajes de capacidad de retención de agua (CRA), 20 % como déficit hídrico, 40 % como condiciones normales y 60 % como exceso hídrico como se observa en la figura 2 (Singh et al., 2008; Pramanik et al., 2009).

SUELO	V300	U500	V500	U300	60 % CRA Anegamiento
V300	U300	SUELO	U300	U500	
U500	V300	V500	V500	SUELO	
U300	V500	V300	V500	SUELO	40 % CRA Normal
U500	U300	U300	U300	V300	
SUELO	V500	V300	V500	U500	
V500	SUELO	U300	U500	V300	20 % CRA Déficit
U300	V300	U500	SUELO	U300	
V500	U500	SUELO	V500	V300	

Figura 2. Diseño experimental

Las variables de respuesta que se evaluaron durante a los 90 días después de la emergencia (dde) son las siguientes: altura (cm), diámetro (mm), clorofila (unidades SPAD), proteínas (%) y actividad enzimática (UAE/mg de proteína).

5.5. Determinación de las variables morfométricas

Las variables morfométricas que se determinaron fueron longitud de la planta utilizando un flexómetro de la marca pretul® y el diámetro fue medido con un vernier de la marca surtex®.

5.6. Determinación del contenido de clorofila

El contenido de clorofila se determinó con un equipo SPAD 502 KONICA MINOLTA, las unidades fueron reportadas en SPAD (Coste et al., 2010). Los valores corresponden seis lecturas de diferentes hojas por cada unidad experimental.

5.7. Preparación del material biológico

La preparación de las muestras se realizó pesando 0.5 gramos de hojas de *Moringa oleífera* frescas de cada uno de los tratamientos en una balanza marca Ohaus modelo PA214, para posteriormente ser maceradas con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino de malla 100, que se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se almacenaron a 4°C hasta su posterior uso (Chen et al., 2012).

5.8. Extracción de proteínas

La extracción de proteína de las hojas de *Moringa oleífera* fue realizada empleando el protocolo de extracción modificado de Chen et al. (2012). El tampón de extracción contiene [Tris-HCl 0.1 M + ácido ascórbico 0.1% + glicerina 10% + polivinilpolipirrolidona 1% + β -mercaptoetanol 5%] a un pH de 8.1 mL de tampón se le adicionó a cada una de las muestras y se incubó a 4 °C por 4 horas. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 15000 rpm por 15 minutos a 4 °C en una centrifuga marca Hermle tipo Z326K (Labortechnik GmbH, Stuttgart, Germany). Posteriormente, se tomó 1 mL para la cuantificación de proteína por el método de Bradford y 10 μ L (10 μ g de proteína) para realizar la electroforesis.

5.9. Determinación de proteínas en las hojas *Moringa oleífera* por el método de Bradford

Para la determinación de proteína total se empleó 1 mL de muestra y se le agregó 1mL del reactivo de Bradford que posteriormente se mezcló por inmersión. Se dejó en reposo durante 15 minutos para luego medir la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter, DU700, E.U. Para calcular la concentración se utilizó una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA) Sigma- Aldrich (1 mg/mL) (Bradford, 1976).

5.10. Electroforesis SDS-PAGE

La separación de las proteínas se llevó a cabo mediante la preparación de un gel de 0.75 mm de espesor con un gel de separación del 13 % y un gel de apilamiento del 4 % t, con un tiempo de corrida de 90 min a 150 volts (Guzmán-Albores et al., 2019).

5.10.1. Desnaturalización de las proteínas

La desnaturalización de las proteínas se realizó por calentamiento a 95 °C durante cinco minutos en un termobloque (Thermomixer Compact Eppendorf, USA) (Ramírez-Merchant, 2015).

Las muestras se prepararon colocando 10 µL del sobrenadante de las muestras + 10 µL de buffer Laemmli Sample 1x en tubos Eppendorf para PCR de 0.5 mL. El mismo procedimiento se realizó para albúmina sérica bovina (BSA 1 mg/mL) utilizado como control positivo.

5.11. Actividad enzimática de la enzima peroxidasa

La preparación de las muestras se realizó pesando 1 g de hojas de *M. oleífera* frescas de cada uno de los tratamientos en una balanza marca Ohaus modelo PA214, para posteriormente ser maceradas con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el cual se colocó en tubos Eppendorf de 2 mL. Posteriormente, se le adicionó 4 mL de la solución amortiguadora de fosfatos de sodio 100 mM (pH 7.0) que contenía EDTA 0.1 mM y 1 % de polivinilpirrolidona (PVP) (p/v) a 4 °C (Hanaa et al., 2011).

La actividad de esta enzima se determinó midiendo la aparición de tetraguayacol a 470 nm. La mezcla de reacción contenía 3 mL de solución amortiguadora de extracción, 0.25 % (v/v) guayacol en 10 mM de fosfato de sodio (pH 6.0) con 10 mM de peróxido de hidrógeno y 100 µL de extracto enzimático. La actividad de la enzima se calculó midiendo la relación a 470 nm/min = 0.01 que se define como 1 unidad de actividad enzimática. La actividad específica se expresó como UI mg⁻¹ / proteína (Hanaa et al., 2011).

5.12. Análisis proteómico de hojas de *Moringa oleifera* mediante LC-MS/MS

La digestión de proteínas se llevó a cabo con tripsina de grado de secuenciación (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Los péptidos trópticos se analizaron con un sistema nano ACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA, U.S.A.) acoplado a un espectrómetro de masas SYNAPT-HDMS Q-TOF (Waters). Se utilizaron conjuntos de datos de MS / MS spectra para generar archivos PKL utilizando el programa Protein Lynx Global Server v2.4 (PLGS, Waters). Luego se identificaron las proteínas utilizando el motor de búsqueda MASCOT v2.5 (Matrix Science, Londres, U.K.). Las búsquedas se realizaron contra el subconjunto Viridiplantae de la base de datos de proteínas NCBIInr (6 686 534 secuencias, mayo de 2018). Se usó tripsina como la proteasa específica, y se permitió una escisión perdida. La tolerancia de masa para los iones precursores y fragmentos se fijó en 50 ppm y 0.1 Da, respectivamente. La carbamidometilcisteína se fijó como modificación fija y la oxidación de la metionina se especificó como modificación variable. Los criterios de identificación de proteínas incluyeron al menos dos espectros de MS / MS con un nivel de confianza del 99%, y las identificaciones se consideraron exitosas cuando se obtuvieron puntuaciones MASCOT significativas > 50, lo que indica la identidad u homología extensa en $p < 0.01$ y la presencia de una Series de iones de más de tres aminoácidos (Bójorquez-Velázquez et al., 2018).

5.13. Análisis bioinformático de proteínas de hojas de *Moringa oleifera*

Se realizó una extracción total a partir de hojas de *Moringa oleifera* a los 90 días después de la emergencia. La tripsina se utilizó como la proteasa específica y se permitió una escisión perdida. La tolerancia de masa para los iones precursores y fragmentos se estableció en 50 ppm y 0.1 Da, respectivamente. La carbamidometil cisteína se fijó como modificación fija y la oxidación de la metionina se especificó como modificación variable. Los criterios de identificación de proteínas incluyeron al menos dos espectros de MS / MS con un nivel de confianza del 99%, y las identificaciones se consideraron exitosas cuando se obtuvieron puntuaciones MASCOT significativas > 50, lo que indica la identidad u homología extensa en $p < 0.01$ y la presencia de una Series de iones de más de tres aminoácidos (Bójorquez-Velázquez et al., 2018).

Las secuencias de los péptidos generadas del análisis de cromatografía líquida acoplada a masas fueron procesadas mediante el lenguaje de programación R versión 2.14.0, la base de datos de los programas MASCOT y String para realizar las redes de interacción proteína-proteína (Jiang et al., 2018).

5.14. Procedimiento de extracción de compuestos fenólicos y flavonoides en hojas de *Moringa oleifera*

Se realizó la colecta de hojas de *Moringa oleifera* para cada una de las condiciones de cultivo, las muestras fueron secadas a sombra. Las hojas secas se molieron utilizando un molino de café y posteriormente se tamizaron para lograr un tamaño de partícula de 100 mesh. Posteriormente se realizó la extracción de los compuestos fenólicos por triplicado utilizando metanol como disolvente (Vázquez-Léon, et al., 2017).

5.14.1 Contenido de fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales, se utilizó el ensayo Folin-Ciocalteu, siguiendo una metodología reportada por Chumark et al. (2008) con breves modificaciones. En un tubo de ensayo se agregaron 30 µl de muestra a 750 µl destilada y se mezclaron, seguido de la adición de 120 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu. Luego, se añadieron 320 µl de Na₂CO₃ al 20 % y la mezcla se dejó reposar por 2 h a temperatura ambiente. La absorbancia se leyó a 765 nm en un espectrofotómetro de UV-Vis. El contenido de fenoles totales se expresó como equivalentes de ácido gálico en gramos por cada 100 g de base seca. La curva de calibración se realizó con una solución madre de ácido gálico (1 mg/ml) con el disolvente de extracción.

5.14.2 Contenido de flavonoides totales

La cuantificación total de flavonoides se realizó siguiendo el método reportado por Chang et al. (2002) con algunas modificaciones. Brevemente, se agregaron 30 µl de extracto a 700 µl de agua destilada y se mezclaron con 750 µl de AlCl₃ al 2 %, se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente. La absorbancia se leyó a 430 nm en un espectrofotómetro de UV-Vis. El contenido total de flavonoides se determinó como mg de equivalente de quercetina por

gramo utilizando la curva de calibración de una solución madre de quercetina (50 mg/ml) con el disolvente de extracción.

5.14.3 Determinación de actividad antirradical por ensayo DPPH

La actividad antioxidante de radicales libres por DPPH de los extractos de hojas secas de *Moringa* se midió en términos de capacidad de donación de hidrógeno o de eliminación de radicales según el método descrito previamente por Siddhuraju y Becker (2003). Se añadieron 0.1 ml de extracto de muestra a 3.9 ml de solución metanólica DPPH (0.025 g / L). La muestra se incubó durante 90 minutos a 25 ° C. La disminución de la absorción a 517 nm se determinó con un espectrofotómetro UV-visible. La solución de referencia se preparó con 0.1 ml de disolvente de extracción y 3.9 ml de solución de DPPH. La actividad antirradical (AAR) en porcentaje se calculó con la ecuación (1).

$$ARR(\%) = \frac{AR-AS}{AR} 100 \quad (1)$$

donde As es la absorbancia de las muestras y AR es la absorbancia de la referencia.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. Caracterización del suelo

Las características físico-químicas de las muestras de suelo nativo, así como la vermicomposta se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Caracterización de suelo y vermicomposta

Parámetros físicoquímicos	pH	*CRA (g/g soil)	*CE (ds/m)	Carbono Total (g /kg)	Fósforo (mg/kg)	Nitrógeno total (g/kg)	C/N	*CEC (Cmol/ g)	Clasificación de suelo
*S	8.4 ± 0.11	530 ± 2.32	0.17 ± 0.002	6.07 ± 0.42	11.79 ± 0.47	0.9 ± 0.17	6.74	27.61 ± 0.42	Franco arenoso
*V	8.18 ± 0.07	920 ± 2	5.37 ± 0.37	163 ± 0.5	357.34 ± 0.78	11.4 ± 0.04	14.6	36.59 ± 5.65	*ND

*S= Suelo

*CRA= Capacidad de retención de agua

*CEC= Capacidad de intercambio catiónico

*V=Vermicomposta

*CE= Conductividad electrolítica

*ND= No determinado

El suelo tiene un pH de 8.4 y se clasifica como franco arenoso. El contenido de fósforo fue de 11.79 mg /kg y el contenido total de nitrógeno fue de 0.9 g/kg con una capacidad de retención de agua (CRA) de 530 y una conductividad electrolítica EC <1 dS/m. De acuerdo a la norma oficial mexicana de la secretaría del medio ambiente y recursos naturales (NOM-021-SEMARNAT-2000) indican que los suelos con esta conductividad electrolítica están libres de salinidad o se les considera suelos neutros. Por otro lado, un alto contenido de fósforo indica mayor metabolismo energético ya que este se encuentra relacionada con la fotosíntesis y respiración celular. Además, estos valores fueron similares a los resultados reportados por Ruiz-Valdiviezo et al. (2010) y Ruiz-Valdiviezo et al. (2013) en diferentes suelos agrícolas y marginales del estado de Chiapas. Consecuentemente, los resultados de este estudio indican que este tipo de suelo podrían utilizarse para el establecimiento de *Moringa oleifera*.

En este estudio la relación C/N de la vermicomposta fue mayor en comparación con la del suelo respectivamente. La relación C / N se considera uno de los factores más importantes debido a que está directamente relacionada con los nutrimentos necesarios para las actividades microbianas (Bernal et al., 2009; Sánchez-Monedero et al., 2010; Jiang et al., 2011; Zhang et al., 2016). Una relación C / N de menos de 20 indica un grado avanzado de estabilización de la materia orgánica y un grado satisfactorio de madurez de la vermicomposta. Esto es adecuado para la enmienda del suelo (Khwairakpam y Bhargava,

2009) y es necesario porque las plantas no pueden asimilar el nitrógeno a menos que la relación C / N sea inferior a 20. La relación C / N ha sido un indicador de fertilidad y productividad del suelo. Esta relación es mayor para los suelos que no han sido cultivados o arados. Los cambios en la relación C / N se atribuyen al cambio climático (Ostrowska y Porebska, 2015) debido a la nula interacción con los microorganismos. Sin embargo, los valores de relación inferiores a 10 para los suelos cultivables se asocian con una alta cantidad de nitrógeno, principalmente debido al uso excesivo de fertilizantes (Ostrowska y Porebska, 2015). La relación C / N de 10 indicó que posiblemente la biomasa microbiana en la materia orgánica del suelo (MOS) no fue suficiente para la mineralización del nitrógeno, lo que genera lixiviados que contaminan al suelo (Nave et al., 2010).

6.2. Variables morfológicas del cultivo de *Moringa oleifera* en invernadero

Los parámetros de crecimiento fueron evaluados a los 90 días. Las plantas enmendadas con vermicomposta a una tasa de fertilización de 300 kg N ha⁻¹ (V300) tenían una altura y un diámetro de 224.5 cm y 14.11 mm, respectivamente, en comparación con el control (S) que tenía 212 cm de altura y 12.54 de diámetro. Por otro lado, el peso de la hoja, el tallo, la raíz y el peso total no tuvieron una diferencia estadística significativa entre cada tratamiento (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de la enmienda orgánica y química en el crecimiento de *Moringa*

Tratamientos	Altura (cm)	Diámetro del tallo (cm)	Altura de la raíz (cm)	Peso total (g)	Proteína (mg/g)	Clorofila (unit SPAD)
Suelo (control)	212 ab	12.54 c	30.88 a	298.76 a	1.42 b	27.16 a
V500	219.44 ab	14.41 a	32.22 a	348.59 a	1.53 a	29.81 a
V300	224.56 a	14.11 ab	34.88 a	379.09 a	1.46 ab	28.16 a
U500	201.66 b	12.81 bc	31.23 a	283.747 a	1.50 ab	20.63 b
U300	210.55 ab	13.09 abc	32.55 a	363.59 a	1.46 ab	22.61 b
DMS	25.5	2.25	11.24	45.86	0.02	5.45

* Diferentes letras indican diferencia estadística significativa (p <0.05)

En este estudio, la enmienda del suelo con vermicomposta a 300 kg N ha⁻¹ aumentó significativamente la altura de *Moringa* con respecto a la fertilización química a una dosis de 500 kg N ha⁻¹. Este resultado puede deberse al aumento en el nivel de fertilidad del suelo cuando se adiciona vermicomposta, debido a que este tipo de sustrato orgánico posee un

mayor contenido de N₂ disponible como fue reportado por Roy et al. (2010), quienes demostraron una correlación positiva significativa de la mineralización del nitrógeno disponible con respecto al crecimiento de la planta cuando se adicionan diferentes sustratos orgánicos al suelo. Asimismo, Atiyeh et al. (2002) reportaron que la vermicomposta contiene ácidos húmicos y reguladores del crecimiento de las plantas tal como las auxinas, giberelinas y citoquininas (Singh et al., 2008), los cuales podrían estar influyendo en el incremento de la altura de *Moringa oleifera*. Por otro lado, también es conocido que la vermicomposta puede presentar un aumento en la actividad de las bacterias solubilizantes de fósforo y los hongos micorrízicos en el suelo, permitiendo un aumento del crecimiento y el rendimiento de diferentes cultivos (Attarde et al., 2012; Sarma y Gogoi, 2015).

6.3 Efecto del estrés hídrico sobre las características morfológicas, contenido de proteínas y clorofila en *Moringa oleifera*

El contenido de proteína y clorofila en hojas se evaluaron a los 90 días en todos los tratamientos. El mayor contenido de proteína se obtuvo con vermicomposta a una tasa de fertilización de 500 kg N ha⁻¹ en comparación con el control ($p < 0.05$) (Cuadro 2). El contenido de clorofila de las hojas en los diferentes tratamientos se muestra en el cuadro y se encontró que existe diferencia estadística significativa entre el tratamiento Suelo, V300 y V500 en comparación con la fertilización química (U300 y U500). En este estudio, el tratamiento que propició el mayor contenido de proteínas fue el tratamiento V500. Nuestros resultados indicaron que los efectos de la vermicomposta aumentaron el contenido de proteína en las hojas de *Moringa*, lo que puede deberse al contenido de nitrógeno adicionado al suelo. Además, los niveles adecuados de NO₃ que se encuentra en la vermicomposta derivados del alto contenido de nitrógeno (11.4 kg N ha⁻¹), las fertilizaciones nitrogenadas adecuadas aumentan la cantidad y la actividad de la enzima nitrato reductasa (NR), la cual está involucrada en el paso inicial del ciclo del nitrógeno, una acción que conduce a un aumento correspondiente en el potencial de reducción de NO₃ y proporciona una mayor capacidad para la síntesis de aminoácidos y proteínas, o la asimilación de N₂ (Friedman, 2004). Es por ello que los fertilizantes orgánicos como vermicomposta aumentan el contenido de elementos y nutrientes del suelo indispensables para los cultivos, aumentando la disponibilidad de estos elementos para la planta y, en última instancia, aumenta el contenido

de clorofila (Tadayyon et al., 2018). Nardi et al. (2002) reportaron que el uso de fertilizantes orgánicos como vermicomposta incrementó el contenido de clorofila y la fotosíntesis de las plantas debido a la presencia de cantidades abundantes de sustancias húmicas en este tipo de insumo orgánico: de la misma manera Zuo et al. (2018) demostraron que la aplicación de vermicomposta incrementó el contenido de macronutrientes que podrían activar las enzimas involucradas en la síntesis de clorofila y el crecimiento de las plantas. Este comportamiento fue similar al encontrado en este estudio, debido a que al adicionar la vermicomposta (11.4 g/kg N) al suelo (0.9 g/kg N) se incrementó el contenido de nitrógeno en el suelo enmendado (12.3 g/kg N), lo cual puede incrementar la actividad microbiana, aumentando los procesos de mineralización y asimilación de fuentes de nitrógeno disponible (NH_4^+ y NO_3^-) para la planta como ha sido reportado por Liu et al. 2020.

Los resultados mostraron que el déficit hídrico y el anegamiento (20% y 60% CRA) disminuyeron significativamente las características morfológicas en comparación con el control (Cuadro 3). Estos resultados mostraron que bajo condiciones de estrés por déficit hídrico (20%), los tratamientos con vermicomposta a 300 kg N ha⁻¹ y 500 kg N ha⁻¹ permiten un aumento significativo en la altura de la planta y el diámetro del tallo en comparación con el control y fertilización química (U300 y U 500). En condiciones sin estrés (40% CRA), vermicomposta a 300 kg N ha⁻¹ permite un aumento significativo del diámetro del tallo en comparación con la fertilización química (Cuadro 3). Mientras tanto, no hay una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en la altura de la raíz, el peso de la hoja, el tallo y la raíz en las diferentes condiciones de crecimiento. Sin embargo, el análisis de datos sobre la aplicación de vermicomposta al suelo en condiciones de déficit hídrico con respecto al peso total de la muestra a una tasa de fertilización de 500 kg N ha⁻¹ y 300 kg N ha⁻¹ aumentó el peso total de la planta en comparación con la fertilización química a una tasa de 500 kg N ha⁻¹ (U500) en comparación con las condiciones óptimas de cultivo y exceso de agua donde no existió diferencia estadísticamente significativa como se puede observar en el cuadro 3. Por otro lado, existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos con vermicomposta y el control para el contenido de proteínas. En la condición sin estrés, los tratamientos con vermicomposta (V500) mostraron un aumento en el contenido de proteína sobre el control y la fertilización química (U300 y U500). Bajo déficit hídrico y anegamiento, la tasa de fertilización con 500 kg N ha⁻¹ de vermicomposta mostró un aumento significativo

en el contenido de proteína sobre el control y la fertilización química (Cuadro 3). La característica importante de la enmienda suelo con vermicomposta es un aumento de algunas poblaciones microbianas del suelo, como estabilizadores de nitrógeno, actinomicetos, esporas de hongos y simbiosis micorrízicas con las raíces de las plantas (Hosseinzadeh et al., 2015) aunado a ello los heterociclos nitrogenados encontrados en vermicomposta pueden estimular la biosíntesis de proteínas, por lo que un aumento en el contenido de proteínas en las hojas está directamente relacionado con un aumento de la absorción de nitrógeno por parte de las plantas (Atik, 2013; Hosseinzadeh et al., 2016).

Por otro lado, el fósforo también juega un papel en el aumento de la eficiencia en el uso del agua, un factor crítico para la productividad de las plantas en climas más secos (Wittenmayer y Merbach, 2005), incrementa la expansión de las hojas, el crecimiento de las yemas axilares y el dosel de los brotes, mejorando la actividad fotosintética (Ahloowalia et al., 2004). En este estudio, al aplicar la vermicomposta (357.34 mg de P/kg) al suelo (11.79 mg/kg) se incrementó significativamente la concentración de fósforo en el suelo enmendado, esta alta concentración de P produce mayor contenido de proteínas en las plantas de *Moringa oleífera*.

Cuadro 3. Efectos del estrés hídrico sobre el crecimiento de *Moringa oleifera*

Tratamientos	Altura de la planta (cm)	Diámetro del tallo (cm)	Peso de hoja(g)	Peso de tallo (g)	Peso total (g)	Proteína (mg/g)
CRA 20 % (Déficit hídrico)						
Suelo (control)	167.33 ab	9.48 b	11.69 a	75.95 a	88.25 ab	1.42 b
V500	189.33 a	11.90 a	15.66 a	113.22 a	188.93 a	1.59 a
V300	185 a	10.93 ab	14.79 a	112.73 a	173.24 a	1.40 b
U500	143.33 b	9.69 b	14.69 a	64.75 a	64.75 b	1.40 b
U300	164.66 ab	10.61 ab	22.49 a	106.38 a	187 a	1.38 b
DMS	24.18	1.98	4.33	16.23	26.02	0.05
CRA 40 % (Control)						
Suelo (control)	252.66 a	15.4 ab	41.3 a	249.40 a	446.67 a	1.42 c
V500	239.33 a	15.92 ab	38.24 a	258 a	459.85 a	1.66 a
V300	252.33 a	16.84 a	55.32 a	305.49 a	555.55 a	1.45 c
U500	258 a	14.47 ab	31.86 a	250.2 a	493.34 a	1.44 c
U300	241.33 a	13.93 b	50.13 a	281.53 a	502.87 a	1.52 b
DMS	36.26	2.21	13.24	34.24	48.57	0.02
CRA 60 % (Anegamiento)						
Suelo (control)	216 ab	12.76 a	37.83 ab	194.98 a	361.97 a	1.54 ab
V500	229.66 ab	15.41 a	49.28 a	213.22 a	395.40 a	1.55 a
V300	236.33 a	14.56 a	37.23 ab	248.7 a	400.35 a	1.41 c
U500	203.66 b	14.27 a	26.94 b	160.42 a	293.23 a	1.48 b
U300	225.66 ab	14.73 a	36.8 ab	237.53 a	400.48 a	1.48 b
DMS	31.32	1.8	12.26	37.06	45.7	0.01

* Diferentes letras indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)

6.4 Contenido de clorofila en hojas de *Moringa oleifera* en condiciones de estrés hídrico

Los resultados mostraron que, en condiciones óptimas de cultivo (40% CRA), la tasa de fertilización de vermicomposta de 500 kg N ha⁻¹ dieron como resultado un aumento significativo en el contenido de clorofila a en comparación con la fertilización química (U500 y U300), pero bajo anegamiento hubo diferencia significativa entre el control y los tratamientos con vermicomposta y fertilización química (Cuadro 4). En condiciones de estrés por déficit, la adición de vermicomposta a la tasa de fertilización de 500 kg N ha⁻¹ resultó en un aumento significativo en el contenido de clorofila en comparación con la fertilización química (U300 y U500). Hosseinzadeh et al. (2018) informaron que el contenido de clorofila se conoce como el índice de tolerancia al estrés hídrico en las plantas. En este estudio, la adición de vermicomposta al suelo en condiciones de estrés por déficit de agua ha incrementado el contenido de clorofila con respecto a la fertilización inorgánica, esto puede deberse a que los macronutrientes que proporciona la vermicomposta podría activar las enzimas involucradas en la síntesis de clorofila y el crecimiento de las plantas tales como clorofila a-b, fotosistema II y rubisco (Zuo et al., 2018).

Cuadro 4. Efectos del estrés hídrico sobre el contenido de clorofila en hojas de *Moringa oleifera*

Tratamientos	Clorofila (Unidades SPAD)
CRA 40 % (Control)	
Suelo (control)	25.42 ab
V500	32.37 a
V300	29.37 ab
U500	22.27 b
U300	20.57 b
DMS	6,04
CRA 60 % (Anegamiento)	
Suelo (control)	35.08 a
V500	30.23 b
V300	28.08 b
U500	23.46 c
U300	23.86 c
DMS	6,92
CRA 20 % (Déficit hídrico)	
Suelo (control)	24.08 a
V500	26.83 a
V300	25.83 a
U500	16.17 b
U300	17.10 b
DMS	7.06

* Diferentes letras indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)

En este estudio se encontró que en condiciones de déficit hídrico la aplicación de un exceso de fertilizante químico nitrogenado a concentraciones mayores de 300 kg de N/ha pueden disminuir la capacidad de eliminar especies reactivas de oxígeno causando cambios metabólicos que alteraron el metabolismo del N, y la biosíntesis de clorofila tal como fue reportado por Kong et al. (2017), quienes reportaron que a concentraciones altas de nitrógeno inorgánico (urea) aumentó la concentración de especies reactivas de oxígeno provocando oxidación de las proteínas e influyendo en la concentración de clorofila, peroxidación de lípidos y provocando cambios metabólicos que alteran el metabolismo del N, esto se debe a la capacidad que tiene la urea de poseer una mayor disponibilidad de nitrógeno (46%), la cual no es afectada a diferencia de la aplicación de fertilizante orgánica donde la mineralización del nitrógeno es lenta (Ni et al. 2010) y depende de procesos de inmovilización y mineralización de nitrógeno por parte de los microorganismos de suelo para su posterior asimilación en las plantas (Joshi et al. 2015).

6.5 Actividad enzimática de la peroxidasa (POD) en hojas de *Moringa* en condiciones de estrés hídrico

La actividad de la enzima peroxidasa (POD) en extractos de hojas de *Moringa oleifera* fue afectada significativamente por las condiciones de estrés del cultivo. La actividad de POD se incrementó a 76.66 unidades de actividad enzimática (UEA / mg de proteína) en condiciones de anegamiento (60% CRA) en comparación con el control (40% CRA) como se muestra en el cuadro 5. Sin embargo, en condiciones de déficit de agua (20% CRA) no hay diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en comparación con el control. El aumento de la actividad enzimática podría deberse a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Vurukonda et al., 2016) el cual es otro factor importante que perjudica el crecimiento de las plantas bajo déficit de agua y anegamiento (Wei et al., 2015). Shi et al. (2007) reportaron que las plantas emplean numerosos sistemas de defensa para combatir los efectos destructivos de la sequía y la inundación, incluido el desarrollo de antioxidantes y enzimas, el cual es un mecanismo importante que permite a las plantas controlar las especies reactivas de oxígeno (Shahid et al., 2014; Borella et al., 2017). Por lo tanto, se han reportado correlaciones positivas entre las actividades de las enzimas antioxidantes con resistencia de los cultivos al estrés (Caverzan et al., 2016). En este estudio, los anegamientos estimularon progresivamente la activación de enzimas antioxidantes, de modo que se incrementaron las actividades de POD, lo cual ha sido poco reportado en plantas sometidas a este tipo de estrés. Estos hallazgos, por lo tanto, muestran que la activación de las enzimas antioxidantes (POD) es un elemento importante de la respuesta de la *Moringa oleifera* en condiciones de estrés hídrico y puede activar la síntesis de compuestos fenólicos y por ende la actividad antioxidante de los mismos.

Cuadro 5. Actividad enzimática de peroxidasa en hojas de *Moringa* bajo estrés hídrico

CRA	Actividad de peroxidasa (UEA/mg de proteína)
CRA 60 % (Anegamiento)	76.76 a
CRA 40 % (Control)	56.60 b
CRA 20 % (Déficit hídrico)	59.15 b
DMS	7.77

* Diferentes letras indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)

6.6 Análisis proteómico de hojas de *Moringa oleifera* cultivadas con diferentes dosis de vermicomposta en condiciones de estrés hídrico.

La extracción de proteínas ha sido el proceso más importante cuando se realiza un análisis proteómico basado en geles en poliacrilamida (Lee et al., 2020). Existen una gran diversidad de protocolos para la extracción de proteínas de plantas reportados en literatura, sin embargo, no existe un método específico para la extracción de proteínas en todo tipo de planta, ya que esto dependerá de las concentraciones de los compuestos que puedan interferir en la extracción y la resolución de los patrones electroforéticos obtenidos durante el establecimiento y optimización de los protocolos de extracción de proteínas (Gómez-Vidal et al., 2008).

En el caso de *Moringa* se sabe que esta planta contiene altas concentraciones de compuestos que pueden interferir con la extracción de proteínas y resolución de los patrones electroforéticos SDS-PAGE. Sus hojas contienen pigmentos, fenoles, polifenoles y alcaloides (Reyes et al.,2006), los cuales deben eliminarse para obtener un patrón electroforético homogéneo. Es por ello, que primeramente se establecieron diferentes métodos de extracción de proteínas en hojas de *Moringa oleifera* para aumentar la separación y resolución de los patrones electroforéticos para su futuro empleo en el análisis de espectrometría de masas (Figura 3).

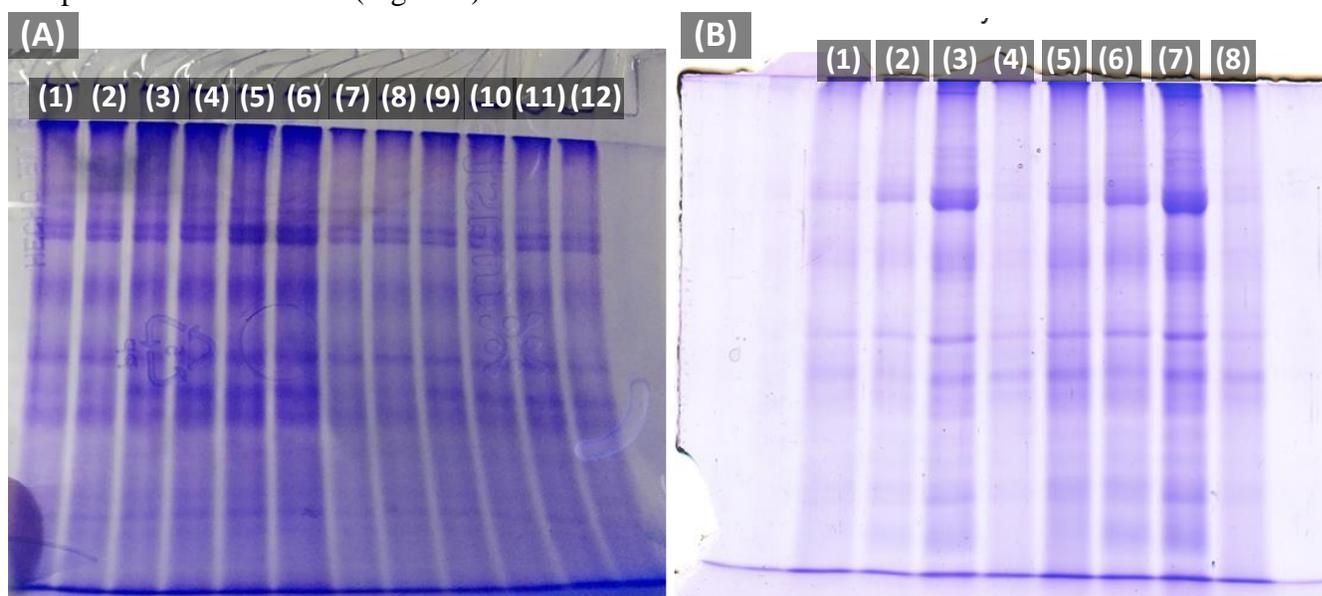


Figura 3. Establecimiento del método de extracción de proteínas en hojas de *Moringa oleifera*: (A) carril 1 y 2-Tris-HCl (10 μ g), carril 3 y 4-Urea (10 μ g), carril 5 y 6-Fenol (10 μ g), carril 7 y 8-Tris-HCl (10 μ g), carril 9 y 10-Urea (10 μ g). (B) Carril 1 y 2-Tris-HCl (10 μ g), 3 y 4-Urea (10 μ g), carril 5, 6 y 7-Fenol (10 μ g) y carril 8-SDS (10 μ g).

En la figura 3A se pudo observar una acumulación y barrido de las proteínas en cada uno de los carriles, lo cual no es aceptable para la electroforesis bidimensional y análisis de espectrometría de masas. Por ello, se realizó un pretratamiento de las muestras, el cual consistió en realizar lavados del tejido vegetal con metanol, etanol, acetona y tris-HCl para la eliminación de compuestos de interferencia, los resultados del pretratamiento se observan en el patrón electroforético SDS-PAGE de la figura 3B, donde se encontró una correcta separación de las proteínas y una clara desaparición del barrido electroforético. Después del análisis del patrón electroforético se seleccionó el método de fenol (carril 5 y 6) debido a que presentó una mayor separación y resolución de las proteínas con una concentración de 10 μ g indispensable para el análisis por cromatografía líquida acoplada a masas (LC-MS/MS) de las muestras obtenidas a los 90 días después de la emergencia.

6.7 Identificación de proteínas expresadas por hojas de *Moringa oleifera* en respuesta al estrés hídrico

Para este análisis se aplicó la teoría de conjuntos (diagramas de Venn), en donde se compararon a las proteínas expresadas diferencialmente en condiciones normales de cultivo (40 % CRA) vs condiciones de déficit hídrico (20% CRA) (Figura 4), esto nos permitió identificar 157 proteínas totales de las cuales, 46 estuvieron presentes en el tratamiento con vermicomposta a una dosis de 300 kg N ha⁻¹ en condiciones normales de cultivo, mientras que a la misma dosis de fertilización orgánica pero en condiciones de déficit hídrico únicamente se expresaron 40 proteínas. Por otro lado, cuando el suelo no fue enmendado con vermicomposta y sometida a estrés hídrico se expresaron 33 proteínas a diferencia de las condiciones normales en donde únicamente se expresaron 38 proteínas. Finalmente 13 proteínas se expresaron y compartieron en todos los tratamientos en las diferentes condiciones de cultivo (Figura 4), mientras 2 proteínas se compartieron en el tratamiento suelo sin enmendar en condiciones normales de cultivo vs una dosis de fertilización de 300 kg N ha⁻¹ en condiciones de estrés hídrico.

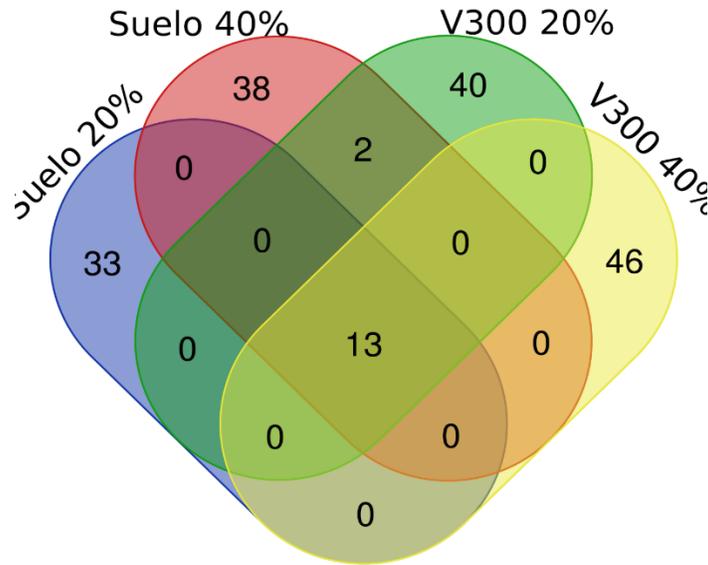


Figura 4. Diagrama de Venn de las proteínas expresadas en diferentes condiciones de cultivo

Dentro de las proteínas diferenciales expresadas en el tratamiento con vermicomposta a una tasa de fertilización de 300 kg N ha⁻¹ bajo condiciones de estrés hídrico están estrechamente relacionadas con la tasa fotosintética, las cuales fueron las siguientes: ATP sintasa subunidad alfa y beta de cloroplasto, clorofila a-b, Fotosistema I, citocromo b559, rubisco, fructosa-bifosfato aldolasa, putative glutamato, citocromo f, fotosistema II y algunas proteínas no caracterizadas. Hura et al. (2018) reportaron que el complejo citocromo b559, la ATP sintasa, así como también la enzima rubisco están involucradas en el control del flujo fotosintético como un mecanismo de defensa cuando las plantas se encuentran en condiciones de sequía. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las proteínas diferenciales del tipo fotosintético de *M. oleifera* podrían estar asociadas a mecanismos de defensa para mitigar los efectos de esta condición de estrés abiótico.

A partir de este análisis se construyó una red de interacción (*'Network'*) proteína-proteína con las proteínas que están relacionadas con la fotosíntesis con la finalidad de explicar y representar los sitios activos de las proteínas y si éstas se encuentran activas o funcionales, así como también comprender los mecanismos a nivel proteómico en condiciones de estrés hídrico (Olalde-Protugal et al., 2020).

En este estudio en la figura 5 se observa la construcción de la red de interacción para la proteína ATP sintasa en condiciones de cultivo de *Moringa* sin estrés hídrico, donde el análisis de red reveló que la proteína atpB Subunidad beta de la ATP sintasa, cloroplástico; produce ATP a partir de ADP en presencia de un gradiente de protones a través de la membrana y que sus sitios catalíticos están alojados principalmente por las subunidades beta; que pertenece a la familia de cadenas alfa / beta ATPasa (498 aa).

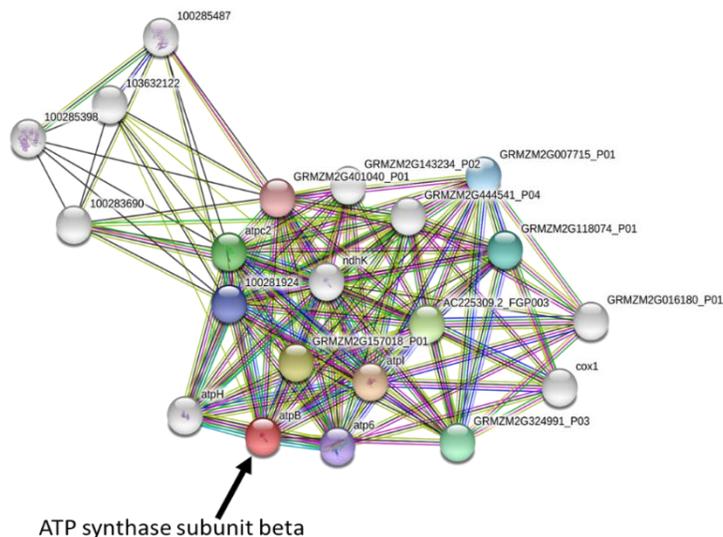


Figura 5. Red de interacción de ATP sintasa de hojas de *Moringa oleifera* en condiciones sin estrés

Por otro lado, a pesar de mantener sus propios genomas, los cloroplastos poseen relativamente pocos de los genes responsables de su propia biosíntesis, mientras que numerosos genes nucleares (~ 2,000–3,000) codifican proteínas localizadas en el cloroplasto involucradas en el desarrollo del cloroplasto (Sakamoto et al., 2008). Algunos de estos genes se han identificado mediante la detección de colorantes anormales o mutantes deficientes en la fotosíntesis en plantas que incluyen arroz, maíz, trigo, cebada y *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones de estrés. Se han hecho grandes avances hacia la comprensión de los complejos mecanismos reguladores para la biogénesis y el desarrollo de cloroplastos de plantas. El cloroplasto F1F0-ATP sintasa (cpATPasa) es un importante complejo proteico asociado a la membrana tilacoide que participa en las reacciones de la fotosíntesis dependiente de la luz (Lyska et al., 2013). Este complejo utiliza la fuerza motriz protónica (pmf) a través de la membrana tilacoide para impulsar la biosíntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Nelson et al., 2013). Sin embargo, en cultivos de *Moringa oleifera* no existe información

con respecto a esto, por ello este estudio brinda información sobre que proteínas se encuentran bajo estas condiciones de cultivo.

En nuestro estudio la interacción proteína-proteína de la network para la proteína Clorofila a-b se observa en la figura 6, el cual es un complejo luminoso del fotosistema II subunidad 6; el complejo de captación de luz (LHC) funciona como un receptor de luz, captura y entrega energía de excitación a los fotosistemas con los que están estrechamente asociados (258 aa).

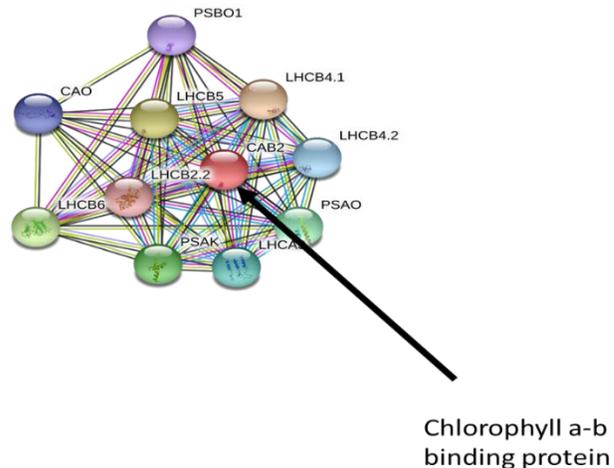


Figura 6. Red de interacción para la Clorofila a-b en condiciones de estrés por déficit hídrico

Estos pigmentos (clorofila a y b) están dispuestos por su andamio proteico, de modo que sus funciones principales, es la absorción de fotones y la transferencia de la energía absorbida hacia los centros de reacción fotosintética provocando un aumento significativo. Un ejemplo paradigmático de este diseño optimizado es el complejo de captación de luz II (LHCII) de plantas superiores, el complejo Chl a / b principal del sistema de antena del fotosistema II (PSII). La presencia de Chl a y Chl b con sus propiedades de absorción ligeramente diferentes, mejora el rendimiento de esta antena, pero para ello requiere que cada sitio de enlace esté ocupado específicamente por Chl a o Chl b ya que estas podrían regular la expresión de clorofila/proteínas aglutinantes para mantener la función del fotosistema II durante el estrés de la sequía (Hobe et al., 2003; Mirkovic et al., 2017).

Finalmente, la construcción de la red de interacciones para la proteína rubisCO en condiciones de estrés por déficit hídrico se observa en la figura 7, está enzimas cataliza dos reacciones: la carboxilación de D-ribulosa 1,5-bisfosfato, el evento principal en la fijación

de dióxido de carbono, así como la fragmentación oxidativa del sustrato de pentosa en el proceso de fotorrespiración. Ambas reacciones ocurren simultáneamente y en competencia en el mismo sitio activo.

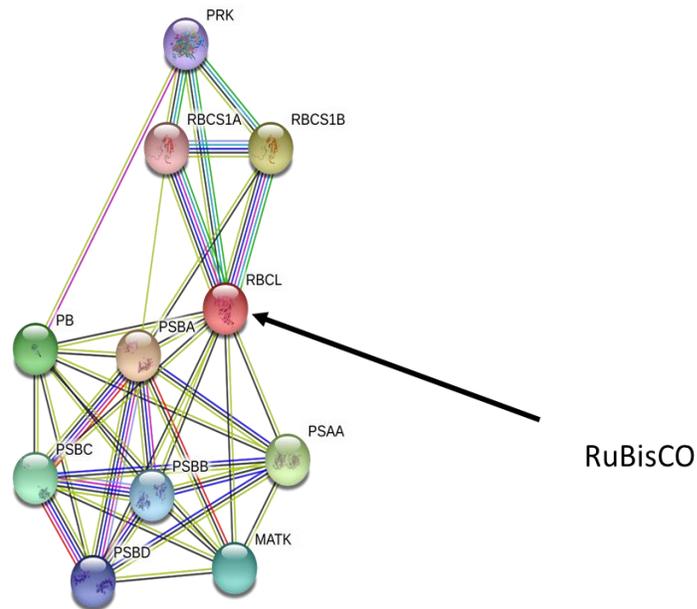


Figura 7. Red de interacción de rubisco en condiciones de estrés por déficit hídrico

Por otro lado, resultados similares por Atkin y Macherel (2009) demostraron que el cierre estomático inducido por estrés por déficit hídrico en las plantas aumentó la relación O_2 / CO_2 en el sitio de carboxilación de rubisco, lo que inevitablemente conduce a un aumento en la fotorrespiración. Siendo la fotorrespiración un componente importante de los procesos fisiológicos que se superponen en el metabolismo de C y N en las plantas sometidas a estrés hídrico (Peterhansel y Maurino, 2011). Incluso bajo condiciones de estrés por sequía en etapas tempranas, esta proteína se mantiene relativamente estable en forma de holoenzima (Webber et al., 1994).

6.8 Análisis del contenido de compuestos fenólicos y potencial antioxidante de hojas de *Moringa oleifera* en condiciones de estrés hídrico.

En este estudio los contenidos totales de compuestos fenólicos y flavonoides en hojas de *Moringa oleifera* bajo condiciones de estrés hídrico se muestra en el cuadro 6. Los compuestos fenólicos se encuentran como metabolitos secundarios en todas las especies de plantas y generalmente se caracterizan por un anillo de benceno y un grupo hidroxilo (Antolovich et al., 2000; Kefeli et al., 2003). Estos fenólicos se dividen en varios grupos principales e incluyen flavonoides y antocianinas. Se sabe que los flavonoides y las antocianinas se sintetizan en tejidos específicos en momentos definidos en respuesta a diversos factores ambientales, como estrés nutricional, plagas y enfermedades, luz, irradiación UV, temperatura y heridas (Dixon y Pavia, 1995).

Cuadro 6. Contenido de compuestos fenólicos y porcentaje de captación de radicales libres en hojas de *Moringa oleifera* bajo condiciones de estrés hídrico

Tratamiento	Fenoles (mg AG/g)	Flavonoides (mg QE/g)	DPPH (%)
Suelo	95.38 b	9.33 bc	26.64 ab
Vermi 300	148.83 a	12.33 a	29.57 a
Vermi 500	150.13 a	11.15 ab	29.60 a
Urea 300	99.05 b	9.45 bc	26.38 ab
Urea 500	93.57 b	8.08 c	25.12 c
DMS	5.59	0.44	1

Los compuestos fenólicos se expresaron como equivalentes de ácido gálico (mg AGg⁻¹) y el contenido de flavonoides en mg de quercetina (mg QE g⁻¹), el mayor contenido de fenoles (148.83 mg AGg⁻¹), flavonoides (12.33 mg QEG⁻¹) y el porcentaje de captación de radicales libres (29.57%), se encontró cuando el suelo fue enmendado con vermicomposta a una tasa de fertilización de 300 kg de N ha⁻¹ presentando diferencia estadística significativa con el tratamiento control (suelo) y la fertilización química con urea a una tasa de fertilización de 300 y 500 kg de N ha⁻¹. Sin embargo, el valor de estos compuestos dependerá de las condiciones en las que se cultivan las plantas. La evidencia de esta investigación ha demostrado que las concentraciones de compuestos fenólicos de las plantas cultivadas en

condiciones orgánicas son más altas que las que se cultivan en condiciones de fertilización química.

El efecto del estrés hídrico sobre el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y porcentaje de captación de radicales libres en hojas de *Moringa oleifera* se observa en el cuadro 7, donde se encontró que existe un mayor contenido de fenoles (154.62 mg AG g⁻¹), flavonoides (11.05 mg QE g⁻¹) y porcentaje de captación de radicales libres (30.48 %) cuando el cultivo de *Moringa* se encontraba en condiciones de exceso de agua (60 % CRA), los cuales presentaron diferencia estadística significativa con respecto a las condiciones de déficit hídrico. Los metabolitos secundarios juegan un papel importante en los procesos fisiológicos y en la adaptación de las variables bióticas y abióticas. En nuestro estudio bajo anegamiento, la aplicación de nitrógeno de vermicomposta a las dosis de 300 y 500 kg de N/ha aumentó el contenido de compuestos fenólicos, lo cual puede deberse pueden ser inmovilizados directamente por los microorganismos, propiciando una mayor disponibilidad de nitrógeno por la planta lo que con lleva a un aumento de enzimas que participan en la síntesis de compuestos fenólicos que participan como mecanismos de defensa bajo estas condiciones de cultivo (Vildova et al., 2006).

Alinian et al., 2016, realizaron un estudio realizado en comino (*Cuminum cyminum*) donde reportaron que bajo condiciones de estrés hídrico aumenta la concentración de compuestos fenólicos y flavonoides en las hojas, indicando un equilibrio por los ácidos fenólicos en el mecanismo de resistencia no enzimática en plantas expuestas a los factores de estrés abiótico, los resultados obtenidos a este estudio presentaron el mismo comportamiento como se puede observar en el cuadro 7. En este estudio bajo condiciones de estrés por anegamiento existió un aumento en la actividad de la peroxidasa y compuestos fenólicos como mecanismos de defensa bajo estas condiciones de cultivo. Por otro lado, el uso de insumos orgánicos para aumentar la biosíntesis de flavonoides y compuestos fenólicos en las plantas ha sido eficaz, por ello el uso de vermicomposta ha tenido un papel importante al respecto (Yusof et al., 2018). En otros estudios se ha encontrado con éxito una mayor producción de flavonoides en manzanilla (*Matricaria recutita* L.) (Vildova et al., 2006), así como mayores cantidades de

kaempferol y quercetina, entre flavonoides, en tomate cultivado cuando fueron enmendados con insumos orgánicos (Mitchell et al., 2007).

Por otro lado, el porcentaje de captación de radicales libres (% DPPH) no aumentó con respecto al incremento de la concentración de fenoles, esto puede deberse a que la polaridad de los compuestos fenólicos es determinante en cuanto la captura de radicales libres, es decir, los compuestos fenólicos que poseen mayor cantidad de sustituyentes hidroxilados tienen una mayor polaridad que otros fenoles y por ende mayor captación de radicales libres (Caillet et al., 2006).

Cuadro 7. Efecto del estrés hídrico sobre el contenido de compuestos fenólicos y porcentaje de captación de radicales libres en hojas de *Moringa oleifera*.

Tratamiento	Fenoles (mg AG/g)	Flavonoides (mg QE/g)	%DPPH
CRA 20 %	96.84 c	9.28 b	22.31 b
CRA 40 %	131.91 b	10.75 a	29.59 a
CRA 60 %	154.62 a	11.05 a	30.48 a
DMS	4.33	0.34	0.78

Algunos otros investigadores también informaron la influencia positiva de la vermicomposta en la mejora de la síntesis de flavonoides en las plantas (Kheiry et al, 2016). En un estudio de Anari Anaraki et al. (2016), se demostró que el uso de ácido húmico presente en la vermicomposta provocó la síntesis de compuestos fenólicos y flavonoides como PAL en las frutas de granada (*Punica granatum*). Esto podría deberse a los cambios hormonales y la mayor actividad de las enzimas involucradas en la síntesis de compuestos fenólicos. También, en este estudio se pudo encontrar una correlación positiva entre las cantidades de compuestos fenólicos y el poder antioxidante de la planta. También, en un estudio similar se observó que la aplicación del ácido húmico aumentó la actividad fenólica y antioxidante total del extracto de *Calendula officinalis* (Allahvirdizadeh y Nazari Deljou, 2014).

7. CONCLUSIONES

La enmienda orgánica con vermicomposta mitigó el efecto del estrés hídrico debido a que posee la capacidad de modificar la estructura del suelo, demostrando que a una dosis de 300 y 500 kg N ha⁻¹ se presentó diferencia significativa en el crecimiento, el contenido de compuestos fenólicos, capacidad de captación de radicales libres y el contenido de proteínas en condiciones de estrés hídrico.

La aplicación de vermicomposta aumentó significativamente los parámetros fotosintéticos y fisiológicos sin estrés (40% de CRA) y déficit de agua (20% de CRA) en comparación con la fertilización química.

El análisis proteómico diferencial demostró las proteínas relacionadas con la tasa fotosintética como son: ATP sintetasa, RuBisCO, clorofila a-b, citocromo b-6, fructosa-bifosfato aldolasa, putative glutamato, citocromo f, fotosistema II y algunas proteínas no caracterizadas están asociadas a mecanismos de defensa para mitigar los efectos de déficit hídrico.

Por otro lado, el estrés hídrico por anegamiento estimuló de la enzima peroxidasa, la cual permitió identificar los mecanismos o respuestas de defensa de *Moringa oleifera* bajo diferentes condiciones de estrés hídrico y dosis de fertilización con vermicomposta.

8. PERSPECTIVAS Y SUGERENCIAS

1. Cuantificar los compuestos fenólicos en cada condición de cultivo de *Moringa oleifera* mediante un análisis metabolómico no dirigido.
2. Analizar la expresión génica de los genes involucrados en la biosíntesis de compuestos fenólicos de plantas de *Moringa oleifera* enmendadas con vermicomposta en condiciones de estrés hídrico.
3. Cuantificar la concentración de ácidos húmicos y fúlvicos presente en la vermicomposta en los diferentes tratamientos y etapas del cultivo.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abreu, I. N., y Mazzafera, P. (2005). Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(3), 241-248.

Anari Anaraki, B., Ghasem-Nejad, M., y Meyghani, H., (2016). The effect of soil and foliar nutrition of humic acid on quantitative and qualitative characteristics of *Punica granatum* var. 'Malas Saveh'. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production* 26 (3), 143–153.

Anjum, S. A., Xie, X. Y., Wang, L. C., Saleem, M. F., Man, C., y Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African journal of agricultural research*, 6(9), 2026-2032.

Alam, S. M. (1999). Nutrient uptake by plants under stress conditions. *Handbook of plant and crop stress*, 2, 285-313.

Alinian, S., Razmjoo, J., y Zeinali, H. (2016). Flavonoids, anthocynins, phenolics and essential oil produced in cumin (*Cuminum cyminum* L.) accessions under different irrigation regimes. *Industrial Crops and Products*, 81, 49-55.

Al Juhaimi, F., Ghafoor, K., Babiker, E. E., Matthäus, B., y Özcan, M. M. (2017). The biochemical composition of the leaves and seeds meals of moringa species as non-conventional sources of nutrients. *Journal of Food Biochemistry*, 41(1), e12322.

Allahvirdizadeh, N., y Nazari Deljou, M.J., (2014). Effect of humic acid on morpho-physiological traits, nutrients uptake and postharvest vase life of pot marigold cut flower (*Calendula officinalis* cv. *Crysantha*) in hydroponic system. *Ejcgst* 5 (2), 133–143.

Allen, D. J., y Ort, D. R. (2001). Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in plant science*, 6(1), 36-42.

Al_husnan, L. A., y Alkahtani, M. D. (2016). Impact of Moringa aqueous extract on pathogenic bacteria and fungi in vitro. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(2), 247-250.

Ahloowalia, B. S., Maluszynski, M., y Nichterlein, K. (2004). Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica*, 135(2), 187-204.

Akula, R., y Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1720-1731.

Al-Owaisi, M., Al-Hadiwi, N., y Khan, S. A. (2014). GC-MS analysis, determination of total phenolics, flavonoid content and free radical scavenging activities of various crude extracts of Moringa peregrina (Forssk.) Fiori leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(12), 964-970.

Anjula, P., Pradheep, K., Rita, G., Nayar, E. R., y Bhandari, D. C. (2011). 'Drumstick tree'(Moringa oleifera Lam.): a multipurpose potential species in India. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58(3), 453-460.

Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., y Ryan, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125(5), 989-1009.

Anwar, F. M. Ashraf y M. Bhangar. (2007). Interprovenance variation in the composition on Moringa oleifera oilseeds from Pakistan. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 82:45-51.

Anudeep, S., Prasanna, V. K., Adya, S. M., y Radha, C. (2016). Characterization of soluble dietary fiber from Moringa oleifera seeds and its immunomodulatory effects. *International journal of biological macromolecules*, 91, 656-662.

Amaglo, N. K., Bennett, R. N., Curto, R. B. L., Rosa, E. A., Turco, V. L., Giuffrida, A. y Timpo, G. M. (2010). Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of

the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. *Food Chemistry*, 122(4), 1047-1054.

Ashraf, M. A., Iqbal, M., Rasheed, R., Hussain, I., Riaz, M., y Arif, M. S. (2018). Environmental stress and secondary metabolites in plants: an overview. In *Plant metabolites and regulation under environmental stress* (pp. 153-167). Academic Press.

Attarde, S. B., Narkhede, S. D., Patil, R. P., y Ingle, S. T. (2012). Effect of organic and inorganic fertilizers on the growth and nutrient content of *Abelmoschus esculentus* (okra crop). *International Journal of Current Research*, 4(10), 137-140.

Atik, A. (2013). Effects of planting density and treatment with vermicompost on the morphological characteristics of oriental beech (*Fagus orientalis* Lipsky.). *Compost Science & Utilization*, 21(2), 87-98.

Atkin, O. K., y Macherel, D. (2009). The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Annals of botany*, 103(4), 581-597.

Atiyeh, R. M., Lee, S., Edwards, C. A., Arancon, N. Q., y Metzger, J. D. (2002). The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Bioresource technology*, 84(1), 7-14.

Ayaz, F. A., Kadioglu, A., y Turgut, R. (1999). Water stress effects on the content of low molecular weight carbohydrates and phenolic acids in *Ctenanthe setosa* (Rosc.) Eichler. *Canadian Journal of Plant Science*, 80, 373–378.

Azam, S., Jakaria, M., Kim, I. S., Kim, J., Haque, M., y Choi, D. K. (2019). Regulation of toll-like receptor (TLR) signaling pathway by polyphenols in the treatment of age-linked neurodegenerative diseases: focus on TLR4 signaling. *Frontiers in immunology*, 10, 1000.

Bhattacharya, S. S., y Chattopadhyay, G. N. (2006). Effect of vermicomposting on the transformation of some trace elements in fly ash. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 75(1-3), 223-231.

Baginsky, S. (2009). Plant proteomics: concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. *Mass Spectrometry Reviews*, 28(1), 93-120.

Bailey-Serres, J., Fukao, T., Ronald, P., Ismail, A., Heuer, S., y Mackill, D. (2010). Submergence tolerant rice: SUB1's journey from landrace to modern cultivar. *Rice*, 3(2), 138-147.

Balamurugan, V., y Balakrishnan, V. (2013). Evaluation of phytochemical, Pharmacognostical and antimicrobial activity from the bark of *Moringa concanensis* Nimmo. *International Journal Curr Microbiology*, 2013a, 2, 117-25.

Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., y Pantoja, O. (2013). Progress and challenges for abiotic stress proteomics of crop plants. *Proteomics*, 13(12-13), 1801-1815.

Bernal, M. P., Albuquerque, J. A., y Moral, R. (2009). Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource technology*, 100(22), 5444-5453.

Bhattacharya, S. S., y Chattopadhyay, G. N. (2006). Effect of vermicomposting on the transformation of some trace elements in fly ash. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 75(1-3), 223-231.

Bichi, M. H. (2013). A review of the applications of *Moringa oleifera* seeds extract in water treatment. *Civil and Environmental Research*, 3(8), 1-10.

Bidabadi, S. S., Dehghanipoodeh, S., y Wright, G. C. (2017). Vermicompost leachate reduces some negative effects of salt stress in pomegranate. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 6(3), 255-263.

Bijina, B., Chellappan, S., Basheer, S. M., Elyas, K. K., Bahkali, A. H., y Chandrasekaran, M. (2011). Protease inhibitor from *Moringa oleifera* leaves: Isolation, purification, and characterization. *Process Biochemistry*, 46(12), 2291-2300.

Bino, R. J., Hall, R. D., Fiehn, O., Kopka, J., Saito, K., Draper, J., y Trethewey, R. N. (2004). Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends in plant science*, 9(9), 418-425.

Bojórquez-Velázquez, E., Velarde-Salcedo, A. J., De León-Rodríguez, A., Jimenez-Islas, H., Pérez-Torres, J. L., Herrera-Estrella, A. y de la Rosa, A. P. (2018). Morphological, proximal composition, and bioactive compounds characterization of wild and cultivated amaranth (*Amaranthus* spp.) species. *Journal of Cereal Science*, 83, 222-228.

Borella, J., Becker, R., Lima, M. C., Oliveira, D. D. S. C. D., Braga, E. J. B., Oliveira, A. C. B. D., y Amarante, L. D. (2019). Nitrogen source influences the antioxidative system of soybean plants under hypoxia and re-oxygenation. *Scientia Agricola*, 76(1), 51-62.

Boyer, J. S., y Younis, H. M. (1983). Molecular aspects of photosynthesis at low leaf water potentials. In *Effects of stress on photosynthesis* (pp. 29-33). Springer, Dordrecht.

Bowden, C. L., Evanylo, G. K., Zhang, X., Ervin, E. H., y Seiler, J. R. (2010). Soil carbon and physiological responses of corn and soybean to organic amendments. *Compost Science y Utilization*, 18(3), 162-173.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Bremner, J.M., (1996). Nitrogen-Total. In: Sparks, D.L. (Ed.), *Methods of Soil Analysis: Chemical Methods Part 3*. Soil Science Society of America Inc., American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin, USA, pp. 1085–1122.

Burton, C. R., Meredith, J. E., Barten, D. M., Goldstein, M. E., Krause, C. M., Kieras, C. J., y Lin, X. A. (2008). The amyloid- β rise and γ -secretase inhibitor potency depend on the level of substrate expression. *Journal of Biological Chemistry*, 283(34), 22992-23003.

Catling D. (1992). *Rice in deep water*. London: MacMillan Press.

Canellas, L. P., Olivares, F. L., Okorokova-Façanha, A. L., y Façanha, A. R. (2002). Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant physiology*, 130(4), 1951-1957.

Caverzan, A., Casassola, A., y Brammer, S. P. (2016). Antioxidant responses of wheat plants under stress. *Genetics and molecular biology*, 3

Castro-López, C., Ventura-Sobrevilla, J. M., González-Hernández, M. D., Rojas, R., Ascacio-Valdés, J. A., Aguilar, C. N., y Martínez-Ávila, G. C. (2017). Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. *Food Chemistry*, 237, 1139-1148.

Caillet, S., Salmiéri, S., y Lacroix, M. (2006). Evaluation of free radical-scavenging properties of commercial grape phenol extracts by a fast colorimetric method. *Food Chemistry*, 95(1), 1-8.

Chaves, M. M., Maroco, J. P., y Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Functional plant biology*, 30(3), 239-264.

Chen K., Wu H., Chen J.F., Cheng X.F., Jing X. y Wang X.Y. (2012). Somatic embryogenesis and mass spectrometric identification of proteins related to somatic embryogenesis in *Eruca sativa*. *Plant Biotechnology Reports*. 6, 113-122.

Cornic, G., y Massacci, A. (1996). Leaf photosynthesis under drought stress. In *Photosynthesis and the Environment* (pp. 347-366). Springer, Dordrecht.

Coste S., Baraloto C., Leroy C., Marcon E., Renaud A., Richardson A.D., Roggy J.C., Schimann H. y Hérault U.B. (2010). Assessing foliar chlorophyll contents with the SPAD-502 chlorophyll meter: a calibration test with thirteen tree species of tropical rainforest in French Guiana. *Annals of forest science* 67: 607.

Chandran, H., Meena, M., Barupal, T., y Sharma, K. (2020). Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology Reports*, e00450.

Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., y Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).

Crafts-Brandner, S. J., y Salvucci, M. E. (2000). Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), 13430-13435.

Craufurd, P.Q. y Peacock, J. M. (1993). Effect of Heat and Drought Stress on *Sorghum* (*Sorghum Bicolor*). II. Grain Yield. *Experimental Agriculture*, 29 (1). pp. 77-86.

Chumark, P., Khunawat, P., Sanvarinda, Y., Phornchirasilp, S., Morales, N. P., Phivthong-ngam, L., y Klai-upsorn, S. P. (2008). The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Journal of ethnopharmacology*, 116(3), 439-446.

Dehshahri, S. H., Wink, M., Afsharypuor, S., Asghari, G., y Mohagheghzadeh, A. (2012). Antioxidant activity of methanolic leaf extract of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori. *Research in pharmaceutical sciences*, 7(2), 111.

Dudley, E., Yousef, M., Wang, Y., y Griffiths, W. J. (2010). Targeted metabolomics and mass spectrometry. In *Advances in protein chemistry and structural biology* (Vol. 80, pp. 45-83). Academic Press.

Devisetti, R., Sreerama, Y. N., y Bhattacharya, S. (2016). Processing effects on bioactive components and functional properties of *Moringa leaves*: Development of a snack and quality evaluation. *Journal of Food Science and Technology*, 53 (1), 647–657.

Dixon, R. A., y Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenyl propanoid metabolism. *The plant cell*, 7(7), 1085.

Fahey, J. W. (2005). *Moringa oleifera*: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. *Trees for life Journal*, 1(5), 1-15.

Farooq, M., Wahid, A., Lee, D. J., Ito, O., y Siddique, K. H. (2009). Advances in drought resistance of rice. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 28(4), 199-217.

Fernandez-Bayo, J. D., Nogales, R., y Romero, E. (2009). Effect of vermicomposts from wastes of the wine and alcohol industries in the persistence and distribution of imidacloprid and diuron on agricultural soils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(12), 5435-5442.

Fernie, A. R. (2003). Metabolome characterization in plant system analysis. *Functional Plant Biology*, 30(1), 111-120.

Fernie, A. R., Trethewey, R. N., Krotzky, A. J., y Willmitzer, L. (2004). Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nature reviews molecular cell biology*, 5(9), 763-769.

Fiehn O. (2001). Combining genomics, metabolome analysis and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and Functional Genomics* 2:155-168.

Fiehn, O. (2002). Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. In *Functional genomics* (pp. 155-171). Springer, Dordrecht.

Flexas, J., y Medrano, H. (2002). Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of botany*, 89(2), 183-189.

Francis, J. K. (1991). Naturalized exotic tree species in Puerto Rico (Vol. 82). US Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station.

Friedman, M. (2004). Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(3), 385-406.

Frottin, F., Espagne, C., Traverso, J. A., Mauve, C., Valot, B., Lelarge-Trouverie, C. y Giglione, C. (2009). Cotranslational proteolysis dominates glutathione homeostasis to support proper growth and development. *The Plant Cell*, 21(10), 3296-3314.

Garg, B. K. (2003). Nutrient uptake and management under drought: nutrient-moisture interaction. *Current Agriculture Research Journal*, 27(1/2), 1-8.

Gee G.W. y Bauder, J.W. (1986). Particle size analysis. In: Klute, A. (Ed.), *Methods of Soil Analysis*. Vol. I Physical and Mineralogical Methods. American Society of Agronomy, Madison, WI, pp. 383–411.

Gil C. (2003). La metodología proteómica, una herramienta para la búsqueda de función. *Actualidad SEM* (35): 12-20.

Gill, S. S., y Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.

Gopalakrishnan, L., Doriya, K., y Kumar, D. S. (2016). *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food science and human wellness*, 5(2), 49-56.

Gómez-Vidal, S., Tena, M., Lopez-Llorca, L. V., y Salinas, J. (2008). Protein extraction from *Phoenix dactylifera* L. leaves, a recalcitrant material, for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 29(2), 448-456.

Godínez-Oviedo, A., Guemes-Vera, N., y Acevedo-Sandoval, O. A. (2010). Nutritional and phytochemical composition of *Moringa oleifera* Lam. and its potential use as nutraceutical plant: A review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 15, 397–405.

González-Garza, N. G., Chuc-Koyoc, J. A., Torres-Castillo, J. A., García-Zambrano, E. A., Betancur-Ancona, D., Chel-Guerrero, L., y Sinagawa-García, S. R. (2017). Biofunctional properties of bioactive peptide fractions from protein isolates of Moringa seed (*Moringa oleifera*). *Journal of Food Science and Technology*, 54(13), 4268–4276.

Gutiérrez-Miceli, F. A., Santiago-Borraz, J., Molina, J. A. M., Nafate, C. C., Abud-Archila, M., Llaven, M. A. O., y Dendooven, L. (2007). Vermicompost as a soil supplement to improve growth, yield and fruit quality of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Bioresource Technology*, 98(15), 2781-2786.

Gutiérrez-Miceli, F. A., Moguel-Zamudio, B., Abud-Archila, M., Gutiérrez-Oliva, V. F., y Dendooven, L. (2008). Sheep manure vermicompost supplemented with a native diazotrophic bacteria and mycorrhizas for maize cultivation. *Bioresource technology*, 99(15), 7020-7026.

Gutbrodt, B., Mody, K., y Dorn, S. (2011). Drought changes plant chemistry and causes contrasting responses in lepidopteran herbivores. *Oikos*, 120(11), 1732-1740.

Guidi, L., Loreface, G., Pardossi, A., Malorgio, F., Tognoni, F., y Soldatini, G. F. (1997). Growth and photosynthesis of *Lycopersicon esculentum* (L.) plants as affected by nitrogen deficiency. *Biologia Plantarum*, 40(2), 235.

Greenway H. y Setter T.L. 1996. Is there anaerobic metabolism in submerged rice plants? a view point. In: Singh VP et al (ed) Physiology of stress tolerance in rice: Proceedings of the international conference on stress physiology of rice, 11–30. IRRI.

Guzmán-Albores, J. M., Ramírez-Merchant, M. L., Interiano-Santos, E. C., Manzano-Gómez, L. A., Castañón-González, J. H., Winkler, R., Abud-Archila, M., Montes-Molina, J.A., Gutiérrez- Miceli, F.A., y Ruíz-Valdiviezo, V. M. (2019). Metabolomic and proteomic analysis of *Moringa oleifera* cultivated with vermicompost and phosphate rock under water stress conditions. *International Journal of Agriculture and Biology*, 21(4), 786-794.

Hale B.K., Herms D.A., Hansen R.C., Clausen T.P. y Arnold D. (2005). Effects of drought stress and nutrient availability on dry matter allocation, phenolic glycosides, and rapid induced resistance of poplar to two lymantriid defoliators. *Journal of Chemical Ecology*, 31:2601-2620.

Hall, R. D. (2006). Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New phytologist*, 169(3), 453-468.

Haldimann P. y Feller U. (2004). Inhibition of photosynthesis by high temperature in oak (*Quercus pubescens* L.) leaves grown under natural conditions closely correlates with a reversible heat-dependent reduction of the activation state of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Cell Environ* 27: 1169–1183.

Hanaa R.M.F., Abdou Z.A., Salama D.A., Ibrahim A.R. y Srour H.A.M. (2011). Effect of neem and willow aqueous extracts on *Fusarium* wilt disease in tomato seedlings: Induction of antioxidant defesive enzymes. *Annals of Agricultural science* 56:1-7.

Hashiguchi, A., Ahsan, N., y Komatsu, S. (2010). Proteomics application of crops in the context of climatic changes. *Food Research International*, 43(7), 1803-1813.

Havaux M., (1993). Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperatures. *Plant Cell Environ*, 16, 461–467.

Havaux, M., Canaani, O., y Malkin, S. (1986). Photosynthetic responses of leaves to water stress, expressed by photo acoustics and related methods: I. Probing the photoacoustic method as an indicator for water stress in vivo. *Plant physiology*, 82(3), 827-833.

Havaux, M., Erne, M., y Lannoye, R. (1988). Correlation between heat tolerance and drought tolerance in cereals demonstrated by rapid chlorophyll fluorescence tests. *Journal of Plant Physiology*, 133(5), 555-560.

He, T. X., An, L. Z., Lin, H. H., y Liang, H. G. (1999). Evidence for transcriptional and post transcriptional control of protein synthesis in water-stressed wheat leaves: a quantitative analysis of messenger and ribosomal RNA. *Journal of plant physiology*, 155(1), 63-69.

He, H., y Li, J. (2008). Proteomic analysis of phosphoproteins regulated by abscisic acid in rice leaves. *Biochemical and biophysical research communications*, 371(4), 883-888.

Hernández A. Reyes F., Yolanda G., Marlen N., Iglesias J.M., D. Hernández, Mirtha C., Fernández E. y Eva Ru. 2003. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos, Ministerio de la Agricultura, La Habana. 64 p.

Hernandez, O. L., Calderín, A., Huelva, R., Martínez-Balmori, D., Guridi, F., Aguiar, N. O., y Canellas, L. P. (2015). Humic substances from vermicompost enhance urban lettuce production. *Agronomy for sustainable development*, 35(1), 225-232.

Hobe, S., Fey, H., Rogl, H., y Paulsen, H. (2003). Determination of relative chlorophyll binding affinities in the major light-harvesting chlorophyll a/b complex. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 5912-5919.

HopkinS, W., y Hüner, N. (2009). Introduction to Plant Physiology. Wiley y Sons. Inc. Hoboken, NJ, USA.

Horner, J. D. (1990). Nonlinear effects of water deficits on foliar tannin concentration. *Biochemical Systematics and Ecology*, 18(4), 211-213.

Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A., y Armand, R. (2015). The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: a review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine*, 6(09), 635.

Hosseinzadeh, S. R., Amiri, H., y Ismaili, A. (2016). Effect of vermicompost fertilizer on photosynthetic characteristics of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under drought stress. *Photosynthetica*, 54(1), 87-92.

Hosseinzadeh, A., Najafpoor, A. A., Jafari, A. J., Jazani, R. K., Baziar, M., Bargozin, H., y Piranloo, F. G. (2018). Application of response surface methodology and artificial neural network modeling to assess non-thermal plasma efficiency in simultaneous removal of BTEX from waste gases: Effect of operating parameters and prediction performance. *Process Safety and Environmental Protection*, 119, 261-270.

Hussain, M., Malik, M. A., Farooq, M., Ashraf, M. Y., y Cheema, M. A. (2008). Improving drought tolerance by exogenous application of glycinebetaine and salicylic acid in sunflower. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(3), 193-199.

Huberty A.F. y Denno, R.F. 2004. Plant water stress and its consequences for herbivorous insects: A new synthesis. *Ecology* 85: 1383-1398.

Hura, T., Hura, K., y Grzesiak, S. (2008). Contents of total phenolics and ferulic acid, and PAL activity during water potential changes in leaves of maize single-cross hybrids of different drought tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(2), 104-112.

Jack, A. L., y Thies, J. E. (2006). Compost and vermicompost as amendments promoting soil health. *Biological approaches to sustainable soil systems*, 453-466.

Jackson, M. B., y Ram., P. C. (2003). Physiological and molecular basis of susceptibility and tolerance of rice plants to complete submergence. *Annals of botany*, 91(2), 227-241.

Jain, V., Pal, M., Lakkineni, K. C., y Abrol, Y. P. (1999). Photosynthetic characteristics in two wheat genotypes as affected by nitrogen nutrition. *Biologia plantarum*, 42(2), 217.

James P. 1997. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Quarterly review of biophysics*; 30:279-331.

Jayawardana, B. C., Liyanage, R., Lalantha, N., Iddamalgoda, S., Weththasinghe, P. (2015). Antioxidant and antimicrobial activity of drumstick (*Moringa oleifera*) leaves in herbal chicken sausages. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1204-1208.

Jiang Y. y Huang B. 2011. Effects of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool-season grasses. *Journal of experimental botany*, 52 (355) 341-349.

Jiang, H., Ma, H., Qian, W., Gao, M., Li, Y. (2017). An automatic detection system of lung nodule based on multigroup patch-based deep learning network. *IEEE journal of biomedical and health informatics*, 22(4), 1227-1237.

Johnová, P., Skalák, J., Saiz-Fernández, I., y Brzobohatý, B. (2016). Plant responses to ambient temperature fluctuations and water-limiting conditions: a proteome-wide perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1864(8), 916-931.

Joshi R, Singh J, Vig AP (2015). Vermicompost as an effective organic fertilizer and biocontrol agent: effect on growth, yield and quality of plants. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 14:137– 159.

Johnston, A. E., Poulton, P. R., y Coleman, K. (2009). Soil organic matter: its importance in sustainable agriculture and carbon dioxide fluxes. *Advances in agronomy*, 101, 1-57.

Juhaimi, F. A., Ghafoor, K., Ahmed, I. M., Babiker, E. E., y Özcan, M. M. (2017). Comparative study of mineral and oxidative status of *Sonchus oleraceus*, *Moringa oleifera* and *Moringa peregrina* leaves. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(4), 1745-1751.

Kopka, J., Fernie, A., Weckwerth, W., Gibon, Y., y Stitt, M. (2004). Metabolite profiling in plant biology: platforms and destinations. *Genome biology*, 5(6), 109.

Kopka, J. (2006). Current challenges and developments in GC–MS based metabolite profiling technology. *Journal of biotechnology*, 124(1), 312-322.

Khan, Z. H., Patel, R., Mehrotra, S., y Mehrotra, R. (2019). In-silico analysis of seed storage protein gene promoters reveals differential occurrence of 7 cis-regulatory elements in monocot and 14 in dicot plants. *Gene Reports*, 17, 100520.

Khatun, S., Absar, N., y Ashraduzzaman, M. (2001). Effect of Physico-Chemical Agents on Stability of Phenoloxidase from Sajna (*Moringa oleifera* L.) Leaves at Mature Stage. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4(9), 1129-1132.

Khatun, S. H. A. H. A. N. A. Z., Absar, N. U. R. U. L., y Ashraduzzaman, M. (2003). Changes in physico-chemical compositions and activities of some hydrolytic and oxidative enzymes in the two types of sajna (*Moringa oleifera* Lam.) leaves at different maturity levels. *Indian Journal of Plant Physiology*, 8(1), 6-11.

Khatun, S., Ashraduzzaman, M., Karim, M. R., Pervin, F., Absar, N., y Rosma, A. (2012). Purification and characterization of peroxidase from *Moringa oleifera* L. leaves. *BioResources*, 7(3), 3237-3251.

Khwairakpam, M., y Bhargava, R. (2009). Vermitechnology for sewage sludge recycling. *Journal of hazardous materials*, 161(2-3), 948-954.

Kefeli, V. I., Kalevitch, M. V., y Borsari, B. (2003). Phenolic cycle in plants and environment. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2(1), 13-18.

Kheiry, A., Arghavani, M., y Khastoo, M. (2016). Effects of organic fertilizers application on morphophysiological characteristics of calendula (*Calendula officinalis* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 31(6).

Kong, L., Xie, Y., Hu, L., Si, J., y Wang, Z. (2017). Excessive nitrogen application dampens antioxidant capacity and grain filling in wheat as revealed by metabolic and physiological analyses. *Scientific Reports*, 7, 43363.

Koricheva J, Larsson S., Haukioja E. (1998). Insect performance on experimentally stressed woody plants: a meta-analysis. *Annual Review of Entomology*, 43:195-216.

Kopka J. (2006). Current challenges and developments in GC-MS based metabolite profiling technology. *Journal of Biotechnology*, 124:312-322.

Kopka J., Fernie A., Weckwerth W., Gibon Y. y Stitt M. (2004). Metabolite profiling in plant biology: Platforms and destinations. *Genome Biology*, 5:109.

Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I. T., y Renaut, J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress—contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of proteomics*, 74(8), 1301-1322.

Kosová, K., Vítámvás, P., Urban, M. O., Klíma, M., Roy, A., y Prášil, I. T. (2015). Biological networks underlying abiotic stress tolerance in temperate crops—a proteomic perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 20913-20942.

Krogmann, U., Boyles, L. S., Martel, C. J., y McComas, K. A. (1997). Biosolids and sludge management. *Water Environment Research*, 69(4), 534-550.

Lawlor D.W. (2002). Limitation to photosynthesis in water stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany*, 89: 871–885.

Lawlor D.W. y Cornic G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment*, 25: 275-294.

Lawlor D.W. y Uprety D.C. (1993). Effects of water stress on photosynthesis of crops and the biochemical mechanism. In: Abiol Y.P., Mohanty P., Govinjee, eds. Photosynthesis: Photoreactions to plant productivity. New Dehli: Oxford and IBH publishing CO. PVT.Ltd.

Liu, H., Sultan, M. A. R. F., li Liu, X., Zhang, J., Yu, F., y xian Zhao, H. (2015). Physiological and comparative proteomic analysis reveals different drought responses in roots and leaves of drought-tolerant wild wheat (*Triticum boeoticum*). *PLoS One*, 10(4), e0121852.

Liu, M., Zhu, C., y Wang, C. (2020). Vermicompost assisted arbuscular mycorrhizal fungi to transfer ¹⁵N from crop residues to lettuce. *Plant and Soil*, 456(1), 175-187.

Lyska, D., Meierhoff, K., y Westhoff, P. (2013). How to build functional thylakoid membranes: from plastid transcription to protein complex assembly. *Planta*, 237(2), 413-428.

Loka D.A y Oosterhuis D.M. (2014). Water-deficit stress effects on pistil biochemistry and leaf physiology in cotton (*Gossypium hirsutum*, L.). *South African Journal of Botany* 93, 131–136.

Lee, P. Y., Saraygord-Afshari, N., y Low, T. Y. (2020). The evolution of two-dimensional gel electrophoresis-from proteomics to emerging alternative applications. *Journal of Chromatography A*, 1615, 460763.

Leone A., Spada A., Battezzati A., Schiraldi A., Aristil J. y Bertoly S. (2015). Cultivation, Genetic, Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of *Moringa oleifera* Leaves: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 12791-12835; doi:10.3390/ijms160612791.

Leser, S. (2013). The 2013 FAO report on dietary protein quality evaluation in human nutrition: Recommendations and implications. *Nutrition Bulletin*, 38(4), 421-428.

Lewis, N. G. (2017). Plant phenolics. In *Antioxidants in higher plants* (pp. 135-169). CRC press.

Liu Z., Yan H., Wang K., Kuang T., Zhang J., Gui L., y An X., Chang W. (2004). Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature*, 428:287–292

Makkar, H. P. S., y Becker, K. (1997). Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. *The Journal of Agricultural Science*, 128(3), 311-322.

Makkar H.P.S, Becker K. (1996). Nutritional value and anti-nutritional components of whole and extracted *Moringa oleifera* leaves. *Animal Feeds Science and Technology*, 63: 211- 228.

Makita, C., Chimuka, L., Cukrowska, E., Steenkamp, P. A., Kandawa-Schutz, M., Ndhala, A. R., y Madala, N. E. (2017). UPLC-qTOF-MS profiling of pharmacologically important chlorogenic acids and associated glycosides in *Moringa ovalifolia* leaf extracts. *South African Journal of Botany*, 108, 193-199.

Makita, C., Chimuka, L., Steenkamp, P., Cukrowska, E., y Madala, E. (2016). Comparative analyses of flavonoid content in *Moringa oleifera* and *Moringa ovalifolia* with the aid of UHPLC-qTOF-MS fingerprinting. *South African Journal of Botany*, 105, 116-122.

Manaois, R. V., Morales, A. V., y Abilgos-Ramos, R. G. (2013). Acceptability, shelf life and nutritional quality of moringa-supplemented rice crackers. *Philippine Journal of Crop Science*, 38(2), 1-8.

Mamedov M., Hayashi H. y Murata N. (1993). Effects of glycerinebetaine and unsaturation of membrane lipids on heat stability of photosynthetic electron transport and phosphorylation reactions in *Synechocystis* PCC6803. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1142(1-2), 1-5.

Mansurah, A. A., Chioma, N. T., Ismaila, M., Abdulmalik, S. A., Williams, C., y Wudil, A. M. (2015). Partial-purification and characterization of angiotensin converting enzyme inhibitory proteins from the leaves and seeds of *Moringa oleifera*. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 5(1), 39-48.

Marwah, R. G., Fatope, M. O., Al Mahrooqi, R., Varma, G. B., Al Abadi, H., y Al-Burtamani, S. K. S. (2007). Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food chemistry*, 101(2), 465-470.

Medrano H., Parry M.A., Socias X. y Lawlor D.W. (1997). Long termn water stress inactivates rubisco in subterranean clover. *Annals of Applied Biology*, 131:491-501.

Michel, T., Khlif, I., Kanakis, P., Termentzi, A., Allouche, N., Halabalaki, M., y Skaltsounis, A. L. (2015). UHPLC-DAD-FLD and UHPLC-HRMS/MS based metabolic profiling and characterization of different *Olea europaea* organs of Koroneiki and Chetoui varieties. *Phytochemistry Letters*, 11, 424-439.

Mirkovic, T., Ostroumov, E. E., Anna, J. M., Van Grondelle, R., y Scholes, G. D. (2017). Light absorption and energy transfer in the antenna complexes of photosynthetic organisms. *Chemical Reviews*, 117(2), 249-293.

Mitchell, A. E., Hong, Y. J., Koh, E., Barrett, D. M., Bryant, D. E., Denison, R. F., y Kaffka, S. (2007). Ten-year comparison of the influence of organic and conventional crop

management practices on the content of flavonoids in tomatoes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(15), 6154-6159.

Mordhorst, A. P., y Lörz, H. (1993). Embryogenesis and development of isolated barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores are influenced by the amount and composition of nitrogen sources in culture media. *Journal of Plant Physiology*, 142(4), 485-492.

Moyo, B., Masika, P. J., Hugo, A., y Muchenje, V. (2011). Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *African Journal of Biotechnology*, 10(60), 12925-12933.

Nadkarni, K. M. (1976). Indian Materia Medica, popular Prakashan, Bombay. *Niemegeer CJE*, 674.

Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., y Vianello, A. (2002). Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(11), 1527-1536.

Nash, D., Miyao, M., & Murata, N. (1985). Heat inactivation of oxygen evolution in photosystem II particles and its acceleration by chloride depletion and exogenous manganese. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 807(2), 127-133.

Navari-Izzo, F., y Rascio, N. (1999). Plant response to water-deficit conditions. *Handbook of plant and crop stress*, 231-270.

Nave, L. E., Vance, E. D., Swanston, C. W., y Curtis, P. S. (2010). Harvest impacts on soil carbon storage in temperate forests. *Forest Ecology and Management*, 259(5), 857-866.

Ndegwa P.M. y Thompson S.A. (2001). Integrating composting and vermicomposting in the treatment and bioconversion of biosolids. *Bioresource Technology* 76: 107-112.

Ndegwa P.M., Thompson S. A., y Das K. C. (2000). Effects of stocking density and feeding rate on vermicomposting of biosolids. *Bioresource Technology* 71: 5–12.

Nelson, J. W., Sudarsan, N., Furukawa, K., Weinberg, Z., Wang, J. X., y Breaker, R. R. (2013). Riboswitches in eubacteria sense the second messenger c-di-AMP. *Nature chemical biology*, 9(12), 834.

Nguyen, H. P., Chakravarthy, S., Velásquez, A. C., McLane, H. L., Zeng, L., Nakayashiki, H. y Martin, G. B. (2010). Methods to study PAMP-triggered immunity using tomato and *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(8), 991-999.

Nicholson, J. K., Connelly, J., Lindon, J. C., y Holmes, E. (2002). Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nature reviews Drug discovery*, 1(2), 153-161.

Ni B, Liu M, Lü S, Xie L, Wang Y (2010). Multifunctional slow-release organic-inorganic compound fertilizer. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 58:12373–12378.

Nkukwana, T. T., Muchenje, V., Masika, P. J., Hoffman, L. C., y Dzama, K. (2014). The effect of *Moringa oleifera* leaf meal supplementation on tibia strength, morphology and inorganic content of broiler chickens. *South African Journal of Animal Science*, 44(3), 228-239.

Nordström, A., Want, E., Northen, T., Lehtiö, J., y Siuzdak, G. (2008). Multiple ionization mass spectrometry strategy used to reveal the complexity of metabolomics. *Analytical chemistry*, 80(2), 421-429.

Norma oficial mexicana, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos (NOM-021-SEMARNAT-2000).

Nkukwana, T. T., Muchenje, T. T., Masika, V., Hoffman, P. J., Dzama, L. C. K., y Descalzo, A. M. (2014). Fatty acid composition and oxidative stability of breast meat from broiler chickens supplemented with *Moringa oleifera* leaf meal over a period of refrigeration. *Food Chemistry*, 142, 255–261.

Nouman, W., Anwar, F., Gull, T., Newton, A., Rosa, E., y Domínguez-Perles, R. (2016). Profiling of polyphenolics, nutrients and antioxidant potential of germplasm's leaves from seven cultivars of *Moringa oleifera* Lam. *Industrial Crops and Products*, 83, 166-176.

Ogunsina, B. S., Radha, C., y Indrani, D. (2011). Quality characteristics of bread and cookies enriched with debittered *Moringa oleifera* seed flour. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(2), 185-194.

Olalde-Portugal, V., Cabrera-Ponce, J. L., Gastelum-Arellanez, A., Guerrero-Rangel, A., Winkler, R., y Valdés-Rodríguez, S. 2020. Proteomic analysis and interactions network in leaves of mycorrhizal and nonmycorrhizal *Sorghum* plants under water deficit. *PeerJ*, 8, e8991.

Oliver S.G., Winson M.K., Kell D.B., Baganz F. 1998. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnology*, 16:373±378.

Orozco, F. H., Cegarra, J., Trujillo, L. M., y Roig, A. (1996). Vermicomposting of coffee pulp using the earthworm *Eisenia fetida*: effects on C and N contents and the availability of nutrients. *Biology and fertility of soils*, 22(1-2), 162-166.

Ogunsina, B. S., Radha, C., y Indrani, D. (2011). Quality characteristics of bread and cookies enriched with debittered *Moringa oleifera* seed flour. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62 (2), 185 –194.

Ostrowska, A., y Porębska, G. (2015). Assessment of the C/N ratio as an indicator of the decomposability of organic matter in forest soils. *Ecological Indicators*, 49, 104-109.

Oyeyinka, A. T., y Oyeyinka, S. A. 2018. *Moringa oleifera* as a food fortificant: Recent trends and prospects. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(2), 127-136.

Patel, S., Thakur, A. S., Chandy, A., y Manigauha, A. (2010). *Moringa oleifera*: a review of there medicinal and economical importance to the health and nation. *Drug invention today*, 2(7).

Pandey, A., y Negi, P. S. 2016. Traditional uses, phytochemistry and pharmacolog- ical properties of Neolamarckia cadamba: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 181, 118–135.

Palada, M. C., y Chang, L. C. (2003). Suggested Cultural Practices for *Moringa*, international corporation guide, AVRDC pub# 03-545. *Shanhua, Taiwan*.

Panagos, P., Borrelli, P., Poesen, J., Ballabio, C., Lugato, E., Meusburger, K. y Alewell, C. (2015). The new assessment of soil loss by water erosion in Europe. *Environmental science y policy*, 54, 438-447.

Paritsis J. y Veblen T.T. 2011. Dendro ecological analysis of defoliator outbreaks on *Nothofagus pumilio* and their relation to climate variability in the Patagonian Andes. *Global Change Biology* 17: 239-253.

Pastenes C. y Horton P. (1996). Effect of high temperature on photosynthesis in beans. 1. Oxygen evolution and chlorophyll fluorescence. *Plant Physiology*, 112, 1245–1251.

Patti, G. J., Yanes, O., y Siuzdak, G. (2013). Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(4), 263-269.

Pereira, M. L., David de Oliveira, H., Tadeu Abreu de Oliveira, J., Menezes Gifoni, J., de Oliveira Rocha, R., de Oliveira Bezerra de Sousa, D., y Vasconcelos, I. M. (2011). Purification of a chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds with potential to relieve pain and inflammation. *Protein and peptide letters*, 18(11), 1078–1085.

Peterhansel, C., y Maurino, V. G. (2011). Photorespiration redesigned. *Plant physiology*, 155(1), 49-55.

Petridis, A., Therios, I., Samouris, G., Koundouras, S., y Giannakoula, A. (2012). Effect of water deficit on leaf phenolic composition, gas exchange, oxidative damage and antioxidant activity of four Greek olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 60, 1-11.

Pinto, C. E., Farias, D. F., Carvalho, A. F., Oliveira, J. T., Pereira, M. L., Grangeiro, T. B. y Vasconcelos, I. M. (2015). Food safety assessment of an antifungal protein from *Moringa oleifera* seeds in an agricultural biotechnology perspective. *Food and Chemical Toxicology*, 83, 1-9.

Pontual, E. V., Carvalho, B. E., Bezerra, R. S., Coelho, L. C., Napoleão, T. H., y Paiva, P. M. (2012). Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. *Food Chemistry*, 135(3), 1848-1854.

Pramanik, P., Bhattacharya, S., Bhattacharyya, P., y Banik, P. (2009). Phosphorous solubilization from rock phosphate in presence of vermicomposts in Aqualfs. *Geoderma*, 152(1-2), 16-22.

Radha, C., Ogunsina, B. S., y Hebina-Babu, K. T. (2015). Some quality and micro-structural characteristics of soup enriched with debittered *Moringa oleifera* sedes flour. *American Journal of Food Science and Technology*, 3 (5), 145–149.

Rhoades, J. D., Manteghi, N. A., Shouse, P. J., y Alves, W. J. (1989). Estimating soil salinity from saturated soil-paste electrical conductivity. *Soil Science Society of America Journal*, 53(2), 428-433.

Ramachandran, C., Peter, K. V., y Gopalakrishnan, P. K. (1980). Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. *Economic botany*, 276-283.

Ramírez-Merchant, M.L., (2015). Establecimiento de protocolo para la extracción y separación de proteínas por SDS-PAGE de diferentes tipos de tejidos vegetales. *Tesis de Licenciatura*. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México

Rasche, F., y Cadisch, G. (2013). The molecular microbial perspective of organic matter turnover and nutrient cycling in tropical agroecosystems-What do we know?. *Biology and fertility of soils*, 49(3), 251-262.

Reeves, D. W. (1997). The role of soil organic matter in maintaining soil quality in continuous cropping systems. *Soil and Tillage Research*, 43(1-2), 131-167.

Reyes Sanchez, N.; Spornly, E., y Ledin, I., (2006). Effect of feeding different levels of foliage of *Moringa oleifera* to creole dairy cows on intake, digestibility, milk production and composition. *Livest. Sci.*, 101 (1/3): 24-31

Romero, E., Salido, A., Cifuentes, C., Fernández, J. D., y Nogales, R. (2006). Effect of vermicomposting process on pesticide sorption capability using agro-industrial wastes. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 86(3-4), 289-297.

Roy, S., Arunachalam, K., Dutta, B. K., y Arunachalam, A. (2010). Effect of organic amendments of soil on growth and productivity of three common crops viz. *Zea mays*, *Phaseolus vulgaris* and *Abelmoschus esculentus*. *Applied Soil Ecology*, 45(2), 78-84.

Ruíz-Valdiviezo, V. M., Luna-Guido, M., Galzy, A., Gutiérrez-Miceli, F. A., y Dendooven, L. (2010). Greenhouse gas emissions and C and N mineralization in soils of Chiapas (México) amended with leaves of *Jatropha curcas* L. *Applied Soil Ecology*, 46(1), 17-25.

Ruíz-Valdiviezo, V. M., Mendoza-Urbina, L. D., Luna-Guido, M., Gutiérrez-Miceli, F. A., Cárdenas-Aquino, M. R., Montes-Molina, J. A., y Dendooven, L. (2013). Emission of CO₂, CH₄ and N₂O and dynamics of mineral N in soils amended with castor bean (*Ricinus*

communis L.) and piñón (*Jatropha curcas* L.) seed cake. *Plant, Soil and Environment*, 59(2), 51-56.

Sakamoto, W., Miyagishima, S. Y., y Jarvis, P. (2008). Chloroplast biogenesis: control of plastid development, protein import, division and inheritance. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 6.

Santos, A. F., Luz, L. A., Argolo, A. C., Teixeira, J. A., Paiva, P. M., y Coelho, L. C. (2009). Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. *Process biochemistry*, 44(4), 504-508.

Sánchez, N. R., Spörndly, E., y Ledin, I. (2006). Effect of feeding different levels of foliage of *Moringa oleifera* to creole dairy cows on intake, digestibility, milk production and composition. *Livestock Science*, 101(1-3), 24-31.

Sánchez-Monedero, M. A., Serramiá, N., Civantos, C. G. O., Fernández-Hernández, A., y Roig, A. (2010). Greenhouse gas emissions during composting of two-phase olive mill wastes with different agroindustrial by-products. *Chemosphere*, 81(1), 18-25.

Sarma, B., y Gogoi, N. (2015). Germination and seedling growth of Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) as influenced by organic amendments. *Cogent Food & Agriculture*, 1(1), 1030906.

Satish, A., Sairam, S., Ahmed, F., y Urooj, A. (2012). *Moringa oleifera* Lam.: Protease activity against blood coagulation cascade. *Pharmacognosy Research*, 4(1), 44.

Saucedo-Pompa, S., Torres-Castillo, J.A., Castro-Lopez, C., Sánchez-Alejo, E.J., Ngangyo, M. y Martínez-Ávila. 2018. *Moringaplants*: Bioactive compounds and promising applications in food products. *Food research international*, 111, 438-450.

Saito, K., y Matsuda, F. (2010). Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology. *Annual review of Plant Biology*, 61, 463-489.

Salaheldeen, M., Aroua, M. K., Mariod, A. A., Cheng, S. F., Abdelrahman, M. A., y Atabani, A. E. (2015). Physicochemical characterization and thermal behavior of biodiesel and biodiesel–diesel blends derived from crude *Moringa peregrina* seed oil. *Energy Conversion and Management*, 92, 535-542.

Salaheldeen, M., Aroua, M. K., Mariod, A. A., Cheng, S. F., y Abdelrahman, M. A. (2014). An evaluation of *Moringa peregrina* seeds as a source for bio-fuel. *Industrial Crops and Products*, 61, 49-61.

Sánchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., Núñez-Gastélum, J. A., Mora-López, G. S., López-Hernández, J. y Paseiro-Losada, P. 2015. Effect of the refining process on *Moringa oleifera* seed oil quality. *Food Chemistry*, 187, 53–57.

Salvucci, M. E., Osteryoung, K. W., Crafts-Brandner, S. J., y Vierling, E. (2001). Exceptional sensitivity of Rubisco activase to thermal denaturation *in vitro* and *in vivo*. *Plant physiology*, 127(3), 1053-1064.

Salvucci, M. E., y Crafts-Brandner, S. J. (2004). Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *Physiologia plantarum*, 120(2), 179-186.

Shah, M. A., Bosco, S. J. D., y Mir, S. A. (2015). Effect of *Moringa oleifera* leaf extract on the physicochemical properties of modified atmosphere packaged raw beef. *Food Packaging and Shelf Life*, 3, 31-38.

Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M., y Pinelli, E. (2014). Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 232* (pp. 1-44). Springer, Cham.

Shank, L. P., Riyathong, T., Lee, V. S., y Dheeranupattana, S. (2013). Peroxidase activity in native and callus culture of *Moringa oleifera* Lam. *Journal of Medical and Bioengineering*, 2(3).

Singh, R., Sharma, R. R., Kumar, S., Gupta, R. K., y Patil, R. T. (2008). Vermicompost substitution influences growth, physiological disorders, fruit yield and quality of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Bioresource Technology*, 99(17), 8507-8511.

Sayed, O. H., Earnshaw, M. J., y Emes, M. J. (1994). Characterization of the heat-induced stimulation of Photosystem-I-mediated electron transport. *Acta botanica neerlandica*, 43(2), 137-143.

Serrano, R. (1993). Structure, function and regulation of plasma membrane H⁺-ATPase. *FEBS letters*, 325(1-2), 108-111.

Siddhuraju, P., y Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(8), 2144-2155

Shin, S. Y., Kim, I. S., Kim, Y. S., Lee, H., & Yoon, H. S. (2013). Ectopic expression of *Brassica rapa* L. MDHAR increased tolerance to freezing stress by enhancing antioxidant systems of host plants. *South African Journal of Botany*, 88, 388-400.

Shah, M. A., Bosco, S. J. D., y Mir, S. A. (2015). Effect of *Moringa oleifera* leaf extract on the physicochemical properties of modified atmosphere packaged raw beef. *Food Packaging and Shelf Life*, 3, 31-38.

Shi, Q., Ding, F., Wang, X., y Wei, M. (2007). Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(8), 542-550.

Sinha, R. K., Valani, D., Chauhan, K., y Agarwal, S. (2010). Embarking on a second green revolution for sustainable agriculture by vermiculture biotechnology using earthworms: reviving the dreams of Sir Charles Darwin. *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development*, 2(7), 113-128.

Singh, R., Sharma, R. R., Kumar, S., Gupta, R. K., y Patil, R. T. (2008). Vermicompost substitution influences growth, physiological disorders, fruit yield and quality of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Bioresource Technology*, 99(17), 8507-8511.

Sinsawat, V., Leipner, J., Stamp, P., y Fracheboud, Y. (2004). Effect of heat stress on the photosynthetic apparatus in maize (*Zea mays* L.) grown at control or high temperature. *Environmental and Experimental Botany*, 52(2), 123-129.

Stewart-Wade y S. M. (2020). Efficacy of organic amendments used in containerized plant production: Part 1—Compost-based amendments. *Scientia Horticulturae*, 266, 108856.

Tadayyon, A., Naeimi, M. M., y Pessarakli, M. (2018). Effects of vermicompost and vermiwash biofertilizers on fenugreek (*Trigonella foenum*) plant. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 49(19), 2396-2405.

Tsaknis J. y Lalas S. (2002). Estabilidad durante la fritura de *Moringa oleífera* semilla variedad de aceite "Periyakulam 1" *International Journal of Molecular Sciences*; 15: 79-102.

Tezara, W. M. V. J., Mitchell, V. J., Driscoll, S. D., y Lawlor, D. W. (1999). Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, 401(6756), 914-917.

Tesfay, S. Z., y Magwaza, L. S. (2017). Evaluating the efficacy of moringa leaf extract, chitosan and carboxymethyl cellulose as edible coatings for enhancing quality and extending

postharvest life of avocado (*Persea americana* Mill.) fruit. *Food Packaging and Shelf Life*, 11, 40-48.

Thomas, G. W. (1996). Soil pH and soil acidity. *Methods of soil analysis: part 3 chemical methods*, 5, 475-490.

Torres-Castillo, J. A., Sinagawa-García, S. R., Martínez-Ávila, G. C. G., López-Flores, A. B., Sánchez-González, E. I., Aguirre-Arzola, V. E., y Gutiérrez-Díez, A. (2013). *Moringa oleifera*: phytochemical detection, antioxidants, enzymes and antifungal properties. *International Journal of Experimental Botany*, 82, 193-202.

Valladares, F., Gianoli, E., y Gómez, J. M. (2007). Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New phytologist*, 176(4), 749-763.

Vaknin, Y., y Mishal, A. (2017). The potential of the tropical “miracle tree” *Moringa oleifera* and its desert relative *Moringa peregrina* as edible seed-oil and protein crops under Mediterranean conditions. *Scientia horticulturae*, 225, 431-437.

Vázquez-León, L. A., Páramo-Calderón, D. E., Robles-Olvera, V. J., Valdés-Rodríguez, O. A., Pérez-Vázquez, A., García-Alvarado, M. A., y Rodríguez-Jimenes, G. C. (2017). Variation in bioactive compounds and antiradical activity of *Moringa oleifera* leaves: influence of climatic factors, tree age, and soil parameters. *European Food Research and Technology*, 243(9), 1593-1608.

Vildova, A., y Stolcova, N. (2006). Cultivation technology of chamomile (*Matricaria recutita* L.) in organic agriculture. Book of abstracts of I. In *International Symposium on Chamomile Research, Development and Production, Presov University in Presov, Slovak Republic* (p. 98).

Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., y SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological research*, 184, 13-24.

Venkataramanaiah, V., Sudhir, P., y Murthy, S. D. S. (2003). Effect of high temperature on photosynthetic electron transport activities of the *Cyanobacterium Spirulina platensis*. *Photosynthetica*, 41(3), 331-334.

Yan, W., y Chen, S. S. (2005). Mass spectrometry-based quantitative proteomic profiling. *Briefings in Functional Genomics*, 4(1), 27-38.

Yordanov, I., Dilova, S., Petkova, R., Pangelova, T., Goltsev, V., y Kuss, K. H. (1986). Mechanisms of the temperature damage and acclimation of the photosynthetic apparatus. *Photobiochemistry and Photobiophysics*.

Yuan, S., Liu, W. J., Zhang, N. H., Wang, M. B., Liang, H. G., y Hui Lin, H. (2005). Effects of water stress on major photosystem II gene expression and protein metabolism in barley leaves. *Physiologia Plantarum*, 125(4), 464-473.

Yusof, Z., Ramasamy, S., Mahmood, N. Z., y Yaacob, J. S. (2018). Vermicompost supplementation improves the stability of bioactive anthocyanin and phenolic compounds in *Clinacanthus nutans* Lindau. *Molecules*, 23(6), 1345.

Zhang, X., Sarmah, A. K., Bolan, N. S., He, L., Lin, X., Che, L. y Wang, H. (2016). Effect of aging process on adsorption of diethyl phthalate in soils amended with bamboo biochar. *Chemosphere*, 142, 28-34.

Zuo, Y., Zhang, J., Zhao, R., Dai, H., y Zhang, Z. (2018). Application of vermicompost improves strawberry growth and quality through increased photosynthesis rate, free radical scavenging and soil enzymatic activity. *Scientia Horticulturae*, 233, 132-140.

Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., y Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and experimental botany*, 61(3), 199-223.

Wang, X. J., Zhang, J. Y., Shahid, S., Guan, E. H., Wu, Y. X., Gao, J., y He, R. M. (2016). Adaptation to climate change impacts on water demand. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 21(1), 81-99.

Wei, L., Wang, L., Yang, Y., Wang, P., Guo, T. Kang, G., (2015). Abscisic acid enhances tolerance of wheat seedlings to drought and regulates transcript levels of genes encoding ascorbate-glutathione biosynthesis. *Frontiers in plant science*, 6, 458.

Webber, A. N., Nie, G. Y., y Long, S. P. (1994). Acclimation of photosynthetic proteins to rising atmospheric CO₂. *Photosynthesis Research*, 39(3), 413-425.

Wittenmayer, L., y Merbach, W. (2005). Plant responses to drought and phosphorus deficiency: contribution of phytohormones in root-related processes. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168(4), 531-540.

10. ANEXOS

Cuadro A1. Proteínas identificadas bajo condiciones de estrés hídrico en hojas de *Moringa oleifera*

Band ^a No.	Protein	Acc. No. ^b	Theor Mr ^c /PI	Masco t Score ^d	PM/SC ^e (%)	emPAI ^f	Peptides sequence
Suelo 20%	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	A0A05 9CBZ6	32105/6.3 1	179	2/24	0.23	K.YLGPFSGEPPSYLTGEFPGDYGWD TAGLSADPETFAK.N R.IAGGPLGEVTDPLYPGGSFDPLGL ADDPEAFAELK.V
	TRYP_PIG	TRYP_ PIG	24394/7.0	173	2/12	0.32	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I R.VATVSLPR.S
	Uncharacterized protein	I3S5Z3	17516/9.8 5	84	1/11	0.21	K.QGLPEQNGLTHFEAGDTR.A
	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit	A0A05 9BM21	24004/8.4 7	70	1/6	0.15	K.DAVGNDVIAAEWLK.N
	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	A0A02 3HN67	53624/5.2 1	56	1/3	0.07	R.IFNVLGEPVDNLGPVDTR.T

Cytochrome b559 subunit alpha (Fragment)	A0A07 5EJ42	8645/5.08	55	1/16	0.45	R.FDSLEQLDEFNR.S
DNA ligase	A0A2H 3XR81	156454	55	1/2	0.02	K.AVTLSPVR.N

Band^a No.	Protein	Acc. No.^b	Theor Mr^c/PI	Mascot Score^d	PM/SC^e (%)	emPAI^f	Peptides sequence
Suelo 40%	ATP synthase subunit beta (Fragment)	Q95FP1	51596/5.26	773	9/31	1.20	R.AVAMSATDGLMR.G R.GMEVIDMGAPLSVPVGGATLGR.I + Oxidation (M) R.IFNVLGEPVDNLGPVDTR.T K.ESGVINEQNLAESK.V K.VALVYGMNEPPGAR.M R.VGLTALTMAEYFR.D

ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	A0A19 1SDU4	55446/5.27	597	6/18	0.53	<p>R.DVNEQDVLLFIDNIFR.F</p> <p>R.IVGEEHYETAQR.V</p> <p>K.LILSGELDSLPEQAFYLVGNIDEATA K.A</p> <p>K.IVNTGTVLQVGDGIAR.I</p> <p>R.IAQIPVSEAYLGR.V</p> <p>R.VINALAKPIDGRGEISASESR.L</p> <p>R.RSVYEPLQTGLIAIDSMPIGR.G</p> <p>R.SVYEPLQTGLIAIDSMPIGR.G + Oxidation (M)</p> <p>K.TFTEEAEALVKEAIQEQLER.F</p>
Uncharacterized protein	A0A2N 9H1H6	113801/5.9 0	515	6/9	0.20	<p>K.LTYYPDYETKDTDILAAFR.V</p> <p>R.VTPQPGVPPEEAGAAVAESSTGTW TTVWTDGLTSLDR.Y</p> <p>K.TFQGPPHGIQVER.D</p> <p>R.AMHAVIDR.Q</p> <p>R.EGNEIIREASK.W</p> <p>K.NILVIGPVPQGK.Y</p>
			457	5/20	0.42	<p>K.LTYYPDYETKDTDILAAFR.V</p>

Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment)	B1PW6 2	481345/6.3 4				R.VTPQPGVPPEEAGAAVAAESSTGTW TTVWTDGLTSLDR.Y K.TFQGPPHGIQVER.D R.AMHAVLDR.Q R.EGNEIIREASK.-
Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	M5WT M0	28465/5.47	269	2/27	0.27	K.YLGPFSQTPSYLTGEFPGDYGWD AGLSADPETFAK.N R.VGGGPLGEGLDPLYGGAFDPLGLA DDPEAFAELK.V
TRYP_PIG	TRYP_ PIG	24394/7.0	252	3/16	0.51	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I K.LSSPATLNSR.V R.VATVSLPR.S
ATP synthase CF1 beta subunit, plastid	A0A2U 1PJY7	20520/4.67	233	3/21	0.63	R.VGLTALTMAEYFR.D R.DVNEQDVLLFIDNIFR.F R.VINTWADIINR.A
Photosystem I subunit D-2	A0A06 1DQS0	22570/9.52	219	3/17	0.56	R.EQIFEMPTGGAAIMR.Q K.DGVYPEKVNPR.G R.QGVGQNR.S
		73427/5.27	213	2/4	0.10	R.QAVVNPENTFFSVKR.F

Uncharacterized protein	A0A022Q5D0					R.IINEPTAASLAYGFEKK.S
Peptidase M41	A0A1R3HCX4	74863/6.35	197	2/6	0.10	R.AAEEVIFGEPEVTTGAAGDLQQITG LAK.Q R.AILSEFVEIPIENR.V
Fructose-bisphosphate aldolase	A0A1R3HVL5	44338/8.42	196	3/7	0.26	R.TAAYYQQGAR.F K.AAQDALLR.A R.AKANSLAQLGK.Y
Photosystem II reaction center protein	A0A023I2X5	7824/6.02	189	3/36	2.39	M.ATQTVEGSSR.S R.RTVVGDLLKPLNSEYGK.V R.TVVGDLLKPLNSEYGK.V
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A	A0A0B0PZ10	38471/9.07	188	2/10	0.19	K.YDSTLGIFEADV KPVGDNAISVDGK.V K.TFAEEVNAAFR.E
Malate dehydrogenase	A0A2N9J6T5	37639/7.57	185	2/8	0.20	K.VAVLGAAGGIGQPLALLMK.M R.IQNGGTEVVEAK.A
Cytochrome b559 subunit alpha	A0A075EJ42	8645/5.08	183	2/28	1.09	R.QGIPLITGRFDSLEQLDEFNR.S R.FDSLEQLDEFNR.S

Transketolase, chloroplastic	A0A0B 2RTP1	68784/5.86	180	2/7	0.10	R.TPGHPENFETPGIEVTTGPLGQGIAN AVGLALAEK.H K.ALPTYTPESPADATR.N
Photosystem II D2 protein	A0A0V 0IZL1	89491/5.84	146	2/4	0.08	R.AWMAAQDQPHENLIFPEEVLPR.G R.LGANVGSAQGPTGLGK.Y
Photosystem II protein D1	A0A19 1TFJ5	38783/5.30	140	2/6	0.19	R.VINTWADILNR.A R.ETTENESANEGYR.F
Phosphoribulokinase	A0A05 9C2Y2	42064/6.17	140	2/6	0.17	R.ANDFDLMYEQVK.A K.FYGEVTQQMLK.H
Heavy metal transport/detoxificatio n superfamily protein, putative	A0A06 1EJ41	27049/4.84	103	1/9	0.13	K.QTTVQATGVASSLVEIIQGAGFK.L
auxin-binding protein ABP20-like	A0A1U 8AID9	21612/6.38	100	1/11	0.36	K.AAVTPAFATQFPGVNLGISMAR.L
Putative ATP synthase gamma chain, chloroplastic	A0A0V 0I5J5	33289/5.74	95	1/5	0.35	R.MSAMSSATDNASELKK.N

RmlC-like cupin domain-containing protein	A0A118JWA4	13767/4.72	87	1/17	0.61	K.AAVTPAFTAQFPGVNLGISMAR.L
40S ribosomal protein S14	B6T281	16377/10.56	85	1/7	0.22	K.TPGPGAQSAIR.A
BnaA09g23090D protein	A0A078IFG6	25479/9.02	84	1/5	0.14	K.TILDPSLVAGFTIR.Y
Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit	A0A059BM21	24004	74	1/10	0.15	K.GAGGGTVAKDAVGNDVIAAEWLK.N
Oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplastic	A0A0B2RMZ6	24624/9.92	73	1/6	0.15	R.FFLQPLSPTEAAQR.A
Putative glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase, chloroplastic	A0A0V0IB26	37068/6.02	72	1/8	0.10	R.GMLEEGVYFAPSQFEAGFTSLAHTPEDIQR.T
Nucleoside diphosphate kinase	A0A022RIU5	16380/8.89	69	1/10	0.22	K.IIGATNPADSAPGTIR.G

Subunit IV of photosystem I (PSI-E) (Fragment)	A1IW0 5	5880/5.23	69	1/45	0.69	R.FNKVNYANVSTNNYALDEIQEVE.-
Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein	A0A06 1GG32	47355/8.24	66	1/5	0.07	R.FDLTPVKGLLTSVQDTASSVAK.T
Plastocyanin	A0A07 8J283	17159/5.65	63	1/14	0.21	K.NNAGFPHNVVFEDEDEIPSGVDASK.I
Glycerate dehydrogenase (Fragment)	A0A37 1FNP7	94653/8.92	61	1/3	0.04	K.YGVAIGNTPGVLTETTAELAASLSL AAAR.R
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	A0A2P 5APF4	32518/6.53	59	1/8	0.11	R.ADVSTVALGIAASTASVILGGGTK.G
Cytochrome f	A0A07 5E4N5	35754/9.36	58	1/3	0.10	K.NIIVIGPVPQK.Y

Photosystem II phosphoprotein (Fragment)	A0A076FHK8	7724/8.20	58	1/13	0.50	M.ATQTVESGSR.S
Calmodulin (Fragment)	A0A088N5A3	5521/57	57	1/74	0.74	R.SLGQNPTEAELQVMINEVDADGNGTIDFPEFLNLMAR.K + Oxidation (M)

Band ^a No.	Protein	Acc. No. ^b	Theor Mr ^c /PI	Masco t Score ^d	PM/SC ^e (%)	emPAI ^f	Peptides sequence
V3000 20%	ATP synthase subunit beta	A0A023I354	52953/5.0 7	488	6/18	0.47	K.TVLIMELINNIK.A R.VGLTALTMAEYFR.D R.DVNEQDVLLFIDNIFR.F R.YKELQDIIAILGLDELSEEDR.L K.ELQDIIAILGLDELSEEDR.L K.LILSGELDSLPEQAFYLVGNIDEATAK.A
	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	A0A0N7AV92	55494/5.1 5	402	4/18	0.28	R.GAMEYTIIVVAETADSPATLQYLAPYTGAALAEYFMFR.E + Oxidation (M) K.LKLELAQFAELEAFAQFASDLDK.A

						K.LELAQFAELEAFAQFASDLDK.A
						K.QSQSAPLTVEEQIMTIYGTNGYL DSLEIGQVR.K
ATP synthase CF1 alpha subunit	C3W0 W0	55491/5.8 1	258	3/4	0.20	K.LKLELAQMAELEAFAQFASDLDK. A + Oxidation (M)
						K.LKLELAQFAELEAFAQFASDLDK. A
						K.LELAQFAELEAFAQFASDLDK.A
Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	A0A2N 9J3S8	28029/5.2 9	239	3/43	0.43	K.YLGPFSGEPPSYLTGEFPGDYGWD TAGLSADPETFAK.N
						K.AGAQIFSEGGLDYLGNP SLIHAQSI LAIWATQVLLMGAVEGYR.I
						R.IAGGPLGEVTDPLYPGGSFDPLGL ADDPEAFAELK.V
Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	A0A06 8UCQ3	28261/5.6 7	164	2/27	0.27	K.YLGPFSGEPPSYLTGEFPGDYGWD TAGLSADPETFAK.N
						R.IAGGPLGEVTDPIYPGGSFDPLGLA DDPEAFAELK.V
Ribulose biphosphate	A0A02 3HNA3	52684/6.2 3	151	2/10	0.14	R.VTPQPGVPPEEAGAAVAESSTGT WTTVWTDGLTSLDR.Y

carboxylase large chain						R.EITLGFVDLLR.D
Uncharacterized protein	A0A341PJN8	8014/4.42	127	1/50	0.49	MNPLIADASVIAAGLAVGLASIGPGV GQGTAAGQAVEGIAR.E + Oxidation (M)
Glutamine synthetase	A0A314U9P6	47605/6.0 6	120	2/11	0.15	R.IIAEYIWIGGSGIDVR.S R.RPASNMDPYIVTSLLAETLLWEP TLEAEALAAQK.L
Uncharacterized protein	A0A151T6N6	33469/5.3 4	92	1/5	0.11	K.WILAYTSFAGLFPLLSR.G
Cytochrome b559 subunit beta	A0A023SXY5	4481/10.7 5	89	1/66	0.96	R.WLAVHGLAVPTVFFLGSISAMQFI QR.
Uncharacterized protein	A0A059AJT0	71426/5.4 4	87	1/4	0.05	R.VQDLLLLDVTPLSLGIETAGGVM VLIPR.N
ATPase, F1 complex, gamma subunit protein	A0A061GFT3	41400/5.5 7	85	1/9	0.09	R.TETADFSPILQFEQDPVQILDALLP LYLNSQILR.A

Ferredoxin--NADP reductase, chloroplastic	A4UTS5	40107/8.57	65	1/3	0.09	R.MAQYAQELWELLK.K
Elongation factor Tu	A0A059A509	62438/6.53	62	1/3	0.06	R.QTDLPELLAIEDVFSITGR.G
Chloroplast RNA binding	A0A061F3W4	42489/8.62	56	1/7	0.08	R.GVNWTSLRPVYIYGPLNYPVEEWFFHR.L
Uncharacterized protein	A0A059A7A9	48952/6.40	55	1/2	0.07	K.VPLILGIWGGK.G
Beta-form rubisco activase	A0A0A0KLW9	48293/8.19	55	1/2	0.07	K.VPLILGLWGGK.G
Chlorophyll a-b binding protein	A0A218W3L1	36870/5.90	55	1/11	0.10	K.APEWLDGSLVGDYGFDPFGLGKPAEYLQFDLDSLDQNLAK.N

ATP synthase epsilon chain, chloroplastic	A0A1I 9VV80	15264/5.4 6	54	1/11	0.24	R.LNNEWLTMALMGGFAR.I
Cytochrome b6-f complex subunit 4	A0A02 3HNC5	18219/6.5 6	53	1/14	0.20	K.LLGVLLMVSVPAGLLTVPFLENVN K.F
Uncharacterized protein	A0A16 4XX00	28598/6.2 2	53	1/9	0.12	K.INTEILGVSVDVFSHLAWVQTDR. K
CEBP-1 protein	Q39675	32426/52	52	1/11	0.11	K.LYVGNLPFDVDSEKLANMFDAAG VVEIAEVIYNR.E
Chlorophyll A-B binding family protein	A0A06 1FHB6	29080/8.8 0	52	1/6	0.12	R.LAQLGIAFSLIGEITGK.G
LHC-related protein	D8RQ3 4	27923/8.8 9	52	1/6	0.13	R.LAQLGIAFSIIGELITGK.G

BnaA06g14330D protein	A0A07 8 GXM7	54121/5.0 8	50	1/2	0.06	R.NIFQSLDLAWTLIR.I
Photosystem II PsbY	A0A1R 3GQH0	20404/9.1 0	47	1/14	0.18	R.GLALLLPIIPAIGWVLFNILQPALN QLNR.M