

***Natrum muriaticum* atenúa el estrés por NaCl en *Capsicum annuum* L.
var. *glabriusculum***
***Natrum muriaticum* attenuates NaCl stress in *Capsicum annuum* L.
var. *glabriusculum***

**Margarito Rodríguez-Álvarez¹, Nehemías Morales-Roblero²,
Daulemys Batista-Sánchez¹  y José Manuel Mazón-Suástegui^{1,‡} **

¹ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. Av. I. P. N. No. 195, Colonia Playa Palo de Santa Rita Sur. 23096 La Paz, Baja California Sur, México.

[‡] Autor para correspondencia / Corresponding author (jmazon04@cibnor.mx)

² Universidad Tecnológica de la Selva. Entronque Toniná km 0.5 Carretera Ocosingo-Altamirano. 29950 Ocosingo, Chiapas, México.

RESUMEN

La salinidad del suelo es un problema que incrementa año con año en las regiones áridas y semiáridas del mundo, incluido México, donde la distribución y extensión de suelos salinizados reduce la productividad y provoca daños severos en diferentes especies cultivadas. La medicina homeopática es ecológica y orgánica y puede atenuar el estrés salino mejorando la relación de la planta con el suelo, incluso en la agricultura tradicional. El chile chiltepin (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) es una especie de alto valor comercial en el norte de México y es afectado por la salinidad del suelo. El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad del medicamento homeopático de uso humano *Natrum muriaticum* (NaM) para mitigar el estrés por NaCl en chile chiltepin establecido en un sistema hidropónico y sometido a diferentes concentraciones de NaCl. Se aplicó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial (2A × 3B) y cuatro repeticiones de nueve plantas cada una. Las plantas fueron tratadas con dos concentraciones (0 y 200 mM) de NaCl, dos dinamizaciones centesimales (7CH y 13CH) de NaM (NaM-7CH y NaM-13CH) y un tratamiento control sin NaM. Se evaluó longitud, peso fresco y seco de parte aérea y de raíz, área foliar, clorofila a, b y total, contenido relativo de agua y potencial hídrico. En general, las plantas tratadas con NaM-13CH mostraron los valores mayores para la mayoría de las variables

SUMMARY

Soil salinity is a global problem that increases year by year in arid and semi-arid regions, including Mexico where the distribution and extension of salinized soils reduces productivity and causes severe damage to different cultivated species. Homeopathic medicine is compatible with traditional, ecologic, and organic agriculture, and it can increase tolerance to salinity stress conditions and improve soil-plant ratio. Chiltepin chili (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) is a species of high commercial value in northern Mexico affected by soil salinity. Thus, the objective of this study was to assess the efficiency of *Natrum muriaticum* (NaM) homeopathic medicine for human use, to mitigate NaCl stress in chiltepin chili established in a hydroponic system and subjected to different NaCl concentrations. A completely randomized design (2A × 3B) with factorial arrangement was used with four replicates of nine plants each. The plants were subjected to two NaCl (0 and 200 mM) concentrations, two centesimal NaM (7CH and 13CH) of NaM (NaM-7CH and NaM-13CH) dynamizations and a control treatment without NaM. The variables evaluated were length, aerial and root part fresh and dry weight, leaf area, chlorophyll A, B, total relative water content, and water potential. In general, the plants treated with NaM-13CH showed the highest values for the majority of the morphometric and physiological variables, including

Cita recomendada / Recommended citation:

Rodríguez-Álvarez, M., N. Morales-Roblero, D. Batista-Sánchez y J. M. Mazón-Suástegui. 2020. *Natrum muriaticum* atenúa el estrés por NaCl en *Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*. Terra Latinoamericana Número Especial 38-1: 83-102.

DOI: <https://doi.org/10.28940/terra.v38i1.677>

Recibido / Received: noviembre / November 04, 2019.

Aceptado / Accepted: febrero / February 19, 2020.

Publicado en / Published in Terra Latinoamericana 38: 83-102.

morfométricas y fisiológicas evaluadas, incluso las plantas sometidas a elevado estrés salino (200 mM) por adición de NaCl. Estos resultados confirman que NaM atenúa el estrés por NaCl en plantas de chile chiltepin (*C. annuum* L. var. *glabriusculum*) y que la homeopatía agrícola tiene potencial para incrementar productividad y rendimientos en el cultivo hidropónico de la especie.

Palabras clave: *chile chiltepin, homeopatía agrícola, salinidad.*

INTRODUCCIÓN

El estrés salino causa grandes pérdidas económicas a nivel mundial que afectan a un 20% de las tierras de cultivo (Finkel, 2009; Khaliq *et al.*, 2014). En la agricultura actual cada día es más complicado lograr altos rendimientos, debido al crecimiento acelerado de factores estresantes bióticos y abióticos, tales como la salinización de los suelos (Sarwat *et al.*, 2016). La salinidad del agua y los suelos está considerada como una limitante ambiental en el crecimiento y productividad de las plantas. Los efectos negativos que causa la salinidad se observan en varios niveles, incluyendo reducción en la productividad agrícola y pueden llegar a causar la muerte de la planta a consecuencia de la toxicidad (Parida *et al.*, 2004; Nieto-Garibay *et al.*, 2010; Ojeda-Silvera *et al.*, 2015). Las regiones áridas y semiáridas de México constituyen más del 50% de su territorio (Ferreles y Soriano, 2007). Una de las causas principales que afecta el crecimiento y desarrollo de las plántulas en condiciones salinas es la inhibición de procesos metabólicos debido al exceso de iones salinos en las células (Hessini *et al.*, 2015; Abbas *et al.*, 2015). La homeopatía es una terapia médica fundada por Samuel Hahnemann (1755-1843), médico alemán que estableció el “Principio de los Semejantes” según el cual, una sustancia que genera una sintomatología patológica en dosis masiva, puede igualmente curarla en dosis mínimas derivadas de un proceso de dilución y agitación serial (Meneses, 2009; Mazón-Suástegui *et al.*, 2017). Es particularmente interesante y novedoso el efecto que tienen algunos medicamentos homeopáticos de uso humano cuando se aplican en plantas y esto se ha comprobado experimentalmente en diversas especies y variedades agrícolas de interés comercial (Mazón-Suástegui *et al.*, 2019). El medicamento homeopático *Carbo vegetabilis*, de uso en humanos, se ha utilizado con éxito en la germinación y crecimiento inicial de

the plants subjected to high salinity stress by adding NaCl (200 mM). These results confirmed that NaM attenuated NaCl stress in chiltepin chili (*C. annuum* L. var. *glabriusculum*) plants and that agricultural homeopathy has the potential to increase productivity and yield in hydroponic cultivation of the species.

Index words: *chiltepin chili, agricultural homeopathy, salinity.*

INTRODUCTION

Salinity stress causes great economic losses at world level, affecting 20% of cultivation land (Finkel, 2009; Khaliq *et al.*, 2014). Achieving high yields in agriculture is now more complicated due to accelerated biotic and abiotic stressing factors, such as soil salinity (Sarwat *et al.*, 2016). Water and soil salinities are considered environmental limitations in plant growth and productivity. The negative effects that salinity causes are observed at different levels, including reduction of agricultural productivity and could even cause plant death as a consequence of toxicity (Parida *et al.*, 2004; Nieto-Garibay *et al.*, 2010; Ojeda-Silvera *et al.*, 2015). The arid and semi-arid regions of Mexico constitute more than 50% of its territory (Ferreles and Soriano, 2007). One of the main causes that affect seedling growth and development in salinity conditions is inhibition of the metabolic processes due to the excess of salt ions in cells (Hessini *et al.*, 2015; Abbas *et al.*, 2015). Homeopathy is a medical therapy founded by the German physician Samuel Hahnemann (1755-1843), who established the “Law of Similars” (“*Similia Similibus Curentur*”) according to which, a substance that generates a pathological symptomatology in massive doses may equally cure in minimum doses derived from a serial dilution/succussion process (Meneses, 2009; Mazón-Suástegui *et al.*, 2017). Particularly interesting and novel is the effect that some homeopathic medicines for human use have when they are applied in plants, which has been proven experimentally in several agricultural species and varieties of commercial interest (Mazón-Suástegui *et al.*, 2019). The homeopathic medicine *Carbo vegetabilis*, for humans, has been used successfully in initial germination and growth of the plant commonly called mangabeira

la Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Pinto *et al.*, 2014). Mediante la aplicación del medicamento homeopático *Natrum muriaticum* se ha incrementado la resistencia al estrés por salinidad en el tomate, *Solanum lycopersicum* L. (Giardini-Bonfim *et al.*, 2012). Mazón-Suástegui *et al.* (2018) reportaron un aumento en todas las variables de respuesta evaluadas en plantas de albahaca *Ocimum basilicum* L., tratadas con NaM-7CH, incrementando su tolerancia a condiciones de estrés salino y su productividad biológica. A la fecha no existen estudios relativos a la aplicación de medicamentos homeopáticos, altamente diluidos y por lo tanto inocuos, en plantas de chile chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Considerando lo reportado para otras especies vegetales, éste es un tema de investigación novedoso que ha surgido a partir de la necesidad de buscar alternativas eco amigables que coadyuven a reducir los daños causados por la creciente salinización de los suelos agrícolas. Por lo antes expuesto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del medicamento homeopático NaM como agente mitigador de los efectos del estrés por NaCl en plantas de chile chiltepín (*C. annuum* L. var. *glabriusculum*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de Estudio

La investigación se realizó en el Campo Agrícola Experimental del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), en una estructura metálica totalmente cubierta con malla antiáfidos, modelo 1.610 PME CR, de 16×10 hilos cm^{-2} con orificios de 0.4×0.8 mm, color cristal, con 40% de sombra, cuyo material de fabricación es monofilamento estabilizado de polietileno. El sitio se localiza en terrenos costeros de El Comitán, en la porción meridional de la península de Baja California Sur, a $24^\circ 08' \text{ N}$ y $110^\circ 24' \text{ O}$, a 7 m de altitud y 17 km al oeste del puerto de La Paz, capital del estado de Baja California Sur, México. El sitio experimental tiene un clima del tipo Bw (h') hw (e) considerado como semiárido, con vegetación xerófila (García, 2004).

Material Genético

Se utilizaron plántulas de chile chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*), obtenidas a partir de

(*Hancornia speciosa* Gomes) (Pinto *et al.*, 2014) or mangaba for its fruit. By applying the homeopathic medicine *Natrum muriaticum* resistance to salinity stress has increased in tomato *Solanum lycopersicum* L. (Giardini-Bonfim *et al.*, 2012). Mazón-Suástegui *et al.* (2018) reported an increase in all the response variables assessed in basil *Ocimum basilicum* L. plants treated with NaM-7CH, increasing their tolerance to salinity stress conditions and biological productivity. To our knowledge, no studies have been available to date on the application of homeopathic medicines highly diluted, and thus innocuous, in chile chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) plants. Considering that reported for other vegetable species, this is a novel research that has emerged from the need of searching eco-friendly alternatives that contribute to reduce damage caused by growing salinity in agricultural soils. Therefore, based on the previous information, the objective of this study was to assess NaM homeopathic medicine as a mitigating agent of stress effects due to NaCl in chiltepín chili (*C. annuum* L. var. *glabriusculum*) plants.

MATERIALS AND METHODS

Study Site

Research was performed in the Experimental Agricultural Field of Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) within a metallic structure totally covered with a stabilized antiaphid polyethylene monofilament mesh, model 1.610 PME CR, thread $16 \times 10 \text{ cm}^{-2}$ and opening 0.4×0.8 mm, crystal color with 40% shade. The site is located at $24^\circ 08' \text{ N}$ and $110^\circ 24' \text{ W}$, 7 m altitude in EL Comitan, Baja California Sur (BCS), Mexico on coastal land in the southern portion of the Baja California Peninsula and 17 km westward from the port of La Paz, capital of the State. The experimental site has a climate type Bw (h') hw (e) considered as semiarid with xerophilous vegetation (García, 2004).

Genetic Material

Chiltepín chili (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) seedlings were obtained from germinated seeds from the germplasm bank of CIBNOR

la germinación de semillas del banco de germoplasma del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del CIBNOR, utilizando para ello bandejas de plástico con sustrato comercial (Sunshine[®], Canada). Estas semillas se obtuvieron de una segunda generación de plantas que se cultivaron a partir de semilla de frutos silvestres colectados en la sierra de San Antonio Baja California Sur, México.

Tratamientos Homeopáticos

Los medicamentos homeopáticos son producidos bajo supervisión gubernamental en laboratorios autorizados. Este procedimiento consiste en la dilución/agitación serial de una solución concentrada o tintura madre (TM) que contiene lo que en la medicina convencional (Alopatía), se conoce como el “principio activo”. El proceso de dilución/agitación [decimal (D), centesimal (C), millesimal (M)], se conoce como potenciación o dinamización y por eso es común que el producto resultante se identifique como “potencia” o “dinamización” homeopática y se agregue una letra H en honor al Dr. Hahnemann (DH, CH, MH). Para el desarrollo del estudio se utilizaron dos dinamizaciones homeopáticas centesimales (7CH y 13CH) del medicamento NaM de Laboratorios Similia[®], autorizado para uso en humanos y con registro en la Secretaría de Salud de México (SSA, 2015). La TM de NaM es una solución concentrada de sal de mar cuya composición es principalmente NaCl, pero incluye cantidades traza de todos los minerales contenidos en el agua de mar, incluyendo magnesio-biodisponible, cloruro potásico, hierro y calcio, entre otros (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018). Las dinamizaciones stock NaM-6CH y NaM-12CH en dilución alcohólica (Etanol 87°) se adquirieron en la Farmacia Homeopática Nacional (CDMX, México). Las dinamizaciones experimentales NaM-7CH y NaM-13CH (tratamientos), se prepararon en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del CIBNOR mediante dilución en agua destilada (para evitar efectos colaterales del etanol) y agitación en vórtex durante dos minutos (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018; 2019).

Diseño Experimental

Se aplicó un diseño experimental completamente al azar, con arreglo factorial (2A × 3B) y cuatro repeticiones de nueve plantas cada una. Como factor A

Plant Biotechnology Laboratory, which came from a second generation of plants cultivated from seeds of wild fruit collected in Sierra San Antonio, BCS, Mexico. The seedlings were placed in plastic trays with commercial (Sunshine[®], Canada), substrate for the homeopathic treatments.

Homeopathic Treatments

The homeopathic medicines are produced under governmental supervision in authorized laboratories. This procedure consists of serial dilution/succussion of a concentrated solution or mother tincture [(TM), All the acronyms are in Spanish] that contains what is known as the “active principle” in conventional medicine (allopathy). The dilution/succussion [decimal (D), centesimal (C), millesimal (M)] process is known as “potentiation” or “dynamization”, which is why it is common to identify the resulting product by adding a letter H in honor of Dr. Hahnemann (DH, CH, MH). For the development of this study, two centesimal homeopathic dynamizations (7CH and 13CH) were used from the medicine NaM of the Laboratorios Similia[®] (CDMX, MX), authorized for human use and registered in the Health Ministry of Mexico (SSA, 2015). The TM of NaM is a concentrated sea salt solution, whose composition is mainly NaCl, but it includes trace amounts of the minerals known in seawater, which include bioavailable magnesium, potassium chloride, iron, and calcium, among others (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018). The stock NaM-6CH and NaM-12CH dynamizations in alcoholic dilution (ethanol 87°) were acquired in Farmacia Homeopática Nacional (CDMX, MX). The experimental dynamizations NaM-7CH and NaM-13CH (treatments) were prepared at CIBNOR Plant Biotechnology Laboratory by diluting them in distilled water (to avoid collateral effects of ethanol) and agitating in vortex for two minutes (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018; 2019).

Experimental Design

A completely randomized design with factorial arrangement (2A × 3B) was performed with four replicates of nine plants each, using as factor A two concentrations of NaCl (0 and 200 mM) and as factor

se aplicaron dos concentraciones de NaCl (0 y 200 mM) y como factor B, dos dinamizaciones del medicamento homeopático (NaM-7CH y NaM-13CH), además de un tratamiento control sin medicamento (agua destilada) que para fines prácticos será referido como NaM-0, debido a que no incluyó ninguna medicación homeopática.

Manejo del Experimento

Las plántulas de dos meses de edad se trasplantaron individualmente en canastillas hidropónicas, colocando una pieza de esponja sintética de forma circular en su interior para dar sostén al sistema radicular de cada planta. Después del trasplante, las macetas se colocaron en un sistema hidropónico experimental consistente en cajas de plástico para contener el medio nutritivo, así como placas de poliestireno como soporte flotante de las canastillas hidropónicas. Se utilizaron cajas de plástico cerradas modelo Mérida, de color verde y 50 L de capacidad, aforadas a 30 L con agua sin sales y placas de poliestireno de alta densidad de 2.54 cm de grosor (Foamular® 250; Mod. CAN24P3/0E, México) con orificios *ad-hoc* para insertar (alrededor de $\frac{1}{4}$ de su altura total) nueve canastillas hidropónicas por caja. El arreglo anterior se realizó para garantizar que las raíces de cada planta tuvieran contacto con el agua, inicialmente con ayuda de la esponja de soporte y posteriormente por inmersión directa en el agua. El agua utilizada se obtuvo de una planta desalinizadora ubicada en el campo experimental del CIBNOR, con una conductividad eléctrica de 0.22 dS m^{-1} . Como fórmula nutriente se aplicó una solución adaptada para chile chiltepín (Samperio, 1997), añadiendo 666 mL a cada 100 L de agua con un pH en rango óptimo (6.0 ± 0.4). Para tener una mejor dilución de cada uno de los componentes, esta solución nutritiva se concentró en 6 L para obtener una solución nutritiva de trabajo. El medio de cultivo hidropónico se preparó agregando 200 mL de la solución de trabajo en cada una de las cajas del sistema hidropónico experimental, conteniendo 30 L de agua. El pH del medio de cultivo hidropónico se midió cada tercer día y cuando fue necesario, se ajustó con hidróxido de potasio (KOH) o ácido sulfúrico (H_2SO_4) según el requerimiento, para mantener un pH de 6.0 ± 0.4 . Con igual frecuencia, se midió la conductividad eléctrica, sólidos totales disueltos, salinidad y temperatura del

B two dynamizations of the homeopathic medicine (NaM-7CH and NaM-13CH); a control treatment without medicine (distilled water) shall be referred in this study as NaM-0 for practical purposes because no homeopathic medicine was included.

Management of the Experiment

Two-month seedlings were transplanted individually in hydroponic baskets, placing a circular piece of synthetic sponge inside to support the radicle system of each plant. After transplanting, the pots were placed in an experimental hydroponic system, which consisted of plastic boxes containing nutritive medium, as well as polystyrene as floating support of the hydroponic baskets. The covered plastic boxes used were Merida green color model and 50 L capacity gauged at 30 L with water without salts and high density polystyrene 2.54-cm thick plates (Foamular® 250; Mod. CAN24P3/0E, México) with openings *ad hoc* to insert (approximately $\frac{1}{4}$ of its total height) nine hydroponic baskets per box. The previous arrangement was performed to guarantee that each plant root could have contact with water, initially with the help of the support sponge and subsequently by direct water immersion. The water used was obtained from a desalination plant located at CIBNOR experimental field with an electrical conductivity of 0.22 dS m^{-1} . As nutrient formula, a solution adapted for chiltepín chili (Samperio, 1997) was applied, adding 666 mL to each 100 L of water with a pH in optimum (6.0 ± 0.4) range. To have a better dilution of each of one of the components, this nutrient solution was concentrated in 6 L of working nutrient solution. The medium of the hydroponic cultivation was prepared adding 200 mL of the working solution in each one of the boxes of the experimental hydroponic system, containing 30 L of water. The hydroponic cultivation pH was measured every other day, and when necessary, it was adjusted with potassium hydroxide (KOH) or sulfuric acid (H_2SO_4) according to that required to maintain a pH of 6.0 ± 0.4 , and with equal frequency, electrical conductivity, total dissolved solids, salinity, and temperature of the hydroponic cultivation medium, using multiparametric equipment (Thermo Scientific®, USA).

medio de cultivo hidropónico, utilizando equipos multiparamétricos (Thermo Scientific®, USA).

Ocho días después del trasplante (periodo de adaptación), las plántulas se podaron a una altura de 10 cm. Los tratamientos homeopáticos NaM-7CH y NaM-13CH y el control (agua destilada) y los tratamientos salinos (0 y 200 mM de NaCl) se aplicaron una vez que las plantas se adaptaron al sistema hidropónico (18 días después del trasplante) y presentaron brotes nuevos como resultado de la poda inicial. Antes de aplicar los tratamientos se realizó un cambio total del medio de cultivo en todas las cajas del sistema hidropónico experimental, ajustando el pH a (6.0 ± 0.4) y determinando conductividad eléctrica (CE), sólidos totales disueltos (STD). La aplicación de los tratamientos homeopáticos se hizo de manera profiláctica, iniciando así una etapa de pre-acondicionamiento de las plantas, cinco días antes de la aplicación de los tratamientos salinos. A fin de evitar un shock osmótico, los tratamientos salinos basados en adición de NaCl se aplicaron de forma gradual, iniciando con 25 mM de NaCl hasta llegar a una concentración final de 200 mM (Murillo-Amador *et al.*, 2007).

Variables Morfométricas Evaluadas

Una semana después de iniciada la aplicación de los tratamientos salinos al 100% de su concentración (200 mM), se realizó un primer muestreo, seleccionando al azar dos plantas por repetición, para un total de ocho unidades experimentales por tratamiento. Las plantas muestreadas se colocaron en bolsas de plástico transparentes etiquetadas y se trasladaron al Laboratorio de Fisiotecnia Vegetal del CIBNOR, donde se separaron en parte aérea (tallos y hojas) y raíz para cuantificar biomasa fresca y seca (g) y longitud (cm) de ambas partes. Posteriormente, se midió el área foliar (cm^2) utilizando un equipo integrador (Li-Cor®, modelo-LI-3000A, serie PAM 1701). Para obtener la biomasa seca de la parte aérea y raíz de cada planta, se colocó el material correspondiente en bolsas de papel, y éstas, en un horno de secado (Shel-Lab®, modelo FX-5, serie-1000203) a 70°C de temperatura, hasta su total deshidratación completa (72 h). El peso de la biomasa fresca y seca se determinó en balanza analítica (Mettler® Toledo, modelo AG204). Una semana después, se realizó un segundo muestreo siguiendo la misma metodología.

Eight days after transplanting (adaptation period), the seedlings were cut at a height of 10 cm. The homeopathic treatments NaM-7CH and NaM-13CH, the control (distilled water) group, and salinity treatments (0 and 200 mM of NaCl) were applied once the plants were adapted to the hydroponic system (18 days after transplant), showing new buds as a result of the initial cutting. Before applying the treatments, a total change of cultivation medium was performed in all the boxes of the experimental hydroponic system, adjusting the pH (6.0 ± 0.4) and determining electrical conductivity (CE), total dissolved solids (STD). The application of the homeopathic treatments was made prophylactically, and thus a pre-conditioning stage of the plants started five days before applying the salinity treatments. With the purpose of avoiding an osmotic shock, the salinity treatments based on the addition of NaCl were applied gradually, starting with 25 mM of NaCl until a final concentration of 200 mM was reached (Murillo-Amador *et al.*, 2007).

Morphometric Variables Assessed

A week after the salinity treatments were applied at 100% (200 mM) of their concentration, the first sampling was performed randomly selecting two plants per replicate for a total of eight experimental units per treatment. The plants sampled were placed in labeled transparent plastic bags and transferred to CIBNOR Plant Physiology-technology Laboratory where the aerial part (stem and leaves) and root were separated to quantify fresh and dry weight (g) and length (cm) of both parts. Subsequently, leaf area was measured (cm^2) using an integrator (Li-Cor®, model-LI-3000A, series PAM 1701, USA) equipment. To obtain dry biomass of the aerial part and root of each plant, the corresponding material was placed in paper bags and then in a drying oven (Shel-Lab®, model FX-5, series-1000203, USA) at 70°C , until total dehydration was completed (72 h). Fresh and dry biomass was determined in an analytical balance (Mettler® Toledo, model AG204, USA). A week later, a second sampling was performed following the same methodology.

Physiological Variables Assessed

Relative water content (CRA) was determined following the method of Yamasaki and Dillenburg

Variables Fisiológicas Evaluadas

Se determinó el contenido relativo de agua (CRA) mediante el método de Yamasaki y Dillenburg (1999), eligiendo al azar una planta por cada repetición, cuatro por tratamiento. Se tomaron hojas de la sección media para minimizar el efecto de la edad que podría incrementar la variabilidad de los resultados. Se extrajeron discos de las hojas con un sacabocado de 1.3 cm de diámetro, se obtuvo su peso fresco (PF) y se colocaron en agua destilada en cajas Petri cerradas. 24 h después, los discos se secaron superficialmente y sin presionar, con papel absorbente y se obtuvo su peso turgente (PT). Enseguida, los discos se pusieron en sobres de papel que se colocaron en un horno de secado a 70 °C y después de 72 h se determinó su peso seco (PS). Todos los valores de peso del material vegetal se obtuvieron utilizando una balanza analítica con precisión de 0.0001 g. El CRA se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{CRA} = (\text{PF} - \text{PS}) / (\text{PT} - \text{PS}) \times 100$$

Análisis Estadístico

Se realizaron análisis de varianza y de comparación múltiple de medias (Tukey HSD, $P = 0.05$). Para todas las variables, los valores promedio se consideraron significativamente diferentes cuando $P \leq 0.05$. Para peso fresco y seco de parte aérea, y peso fresco de raíz, los datos se normalizaron con la ecuación: $N = \sqrt{x}$, para peso fresco y $N = \sqrt{x+1}$ para peso seco, siendo “x” el valor de la variable medida para cada repetición. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statistica versión 10.0 para Windows (StatSoft Inc., 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Peso Fresco de Parte Aérea (PFPA)

Las plantas de Chile chiltepin sometidas a estrés por NaCl disminuyeron el PFPA (Figura 1a). Esto indica que una concentración alta de NaCl provoca una disminución en su capacidad para absorción de nutrientes, lo cual se refleja en un desbalance nutricional que afecta el desarrollo y crecimiento de la planta (Batista-Sánchez *et al.*, 2019). Estos resultados son similares a los obtenidos por Mazón-Suástegui

(1999), randomly selecting one plant per replicate, four per treatment. Leaves were taken from the middle section to minimize the effect that age could increase variability in the results. Leaf disks (1.3 cm) in diameter were extracted with a hole puncher obtaining their fresh weight (PF) and placing them in distilled water in closed Petri boxes; 24 h later, the leaf disks were dried superficially and without pressure with absorbing paper to obtain their turgid weight (PT). Subsequently, the leaf disks were placed in paper envelopes in the drying oven at 70 °C to determine their dry weight (PS) after 72 h. All the weight values of the vegetal material were obtained using a 0.0001 g precision analytical balance. The CRA was calculated by the following formula:

$$\text{CRA} = (\text{PF} - \text{PS}) / (\text{PT} - \text{PS}) \times 100$$

Statistical Analyses

Analyses of variance (ANOVA) and Tukey’s honestly significant difference (HSD, $P = 0.05$) multiple comparison of means were performed. For all the variables, the average values were considered significantly different when $P \leq 0.05$. For fresh and dry weight of the aerial part and root fresh weight data were normalized with the equation: $N = \sqrt{x}$ for fresh weight and $N = \sqrt{x+1}$ for dry weight where “x” was the value of the variable measure of each replicate. The statistical analyses were performed using Statistica model version 10.0 for Windows (StatSoft Inc., 2011).

RESULTS AND DISCUSSION

Aerial Part Fresh Weight (PFPA)

The chiltepin chili plants subjected to NaCl stress decreased the aerial part fresh weight PFPA (Figure 1a), which indicated that a high NaCl concentration caused a decrease in their nutrient absorption capability, reflected in a nutritional imbalance that affected plant development and growth (Batista-Sánchez *et al.*, 2019). These results were similar to those obtained by Mazón-Suástegui *et al.* (2018), who reported a decrease in fresh biomass of the seedling aerial part of two basil varieties (Napolitano and Emily), as NaCl concentrations increased. The results obtained

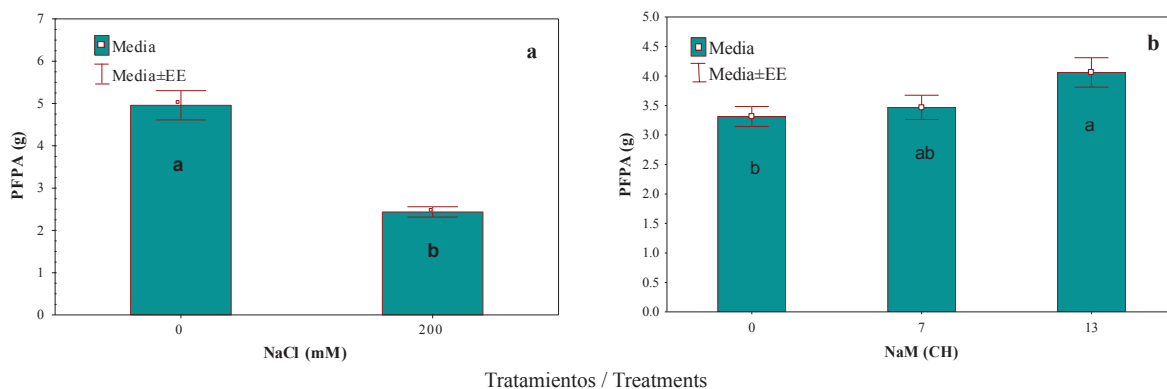


Figura 1. Efecto del agente estresor NaCl (a) y del medicamento homeopático NaM (b) en el peso fresco de la parte aérea (PFPA) de plantas de chiltepin (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Barras con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey HSD $P < 0.05$).

Figure 1. Effect of the NaCl stress agent (a) and the homeopathic medicine NaM (b) on the fresh weight of the aerial part (PFPA) of chiltepin chili plants (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Bars with equal letters do not differ statistically (Tukey HSD $P < 0.05$).

et al. (2018), quienes reportaron una disminución en la biomasa fresca de parte aérea en plántulas de dos variedades de albahaca (Napoletano y Emily), conforme aumentaron las concentraciones de NaCl. Los resultados obtenidos en las plantas de chiltepin tratadas con NaM evidenciaron que el PFPA fue mayor para el tratamiento NaM-13CH, aun cuando fueron sometidas a 200 mM de NaCl (Figura 1b).

De acuerdo con el análisis de la interacción entre factores (NaCl \times NaM), las plantas tratadas con NaM-13CH y no sometidas a estrés salino, mostraron mayor valor en la variable PFPA, lo que indica mayor productividad biológica (biomasa). El mayor valor de esta misma variable fue también registrado en las plantas tratadas con la más alta dilución centesimal de *Natrum muriaticum* (NaM-13CH), incluso en las que fueron sometidas a un alto grado de estrés salino (200 mM de NaCl), aunque con menor grado de significancia comparado con las plantas no estresadas con NaCl (Figura 2). Esto indica un efecto benéfico *per-se* del medicamento homeopático más diluido (NaM-13CH) en las plantas de *C. annuum* L. var. *glabriusculum*. Esto es un resultado interesante, ya que la presencia de nanopartículas del principio activo de la sal de mar (Sodio, Magnesio, Manganeso y otros), debe ser menor en la 13^a dilución centesimal (NaM-13CH) que en la séptima dilución centesimal del mismo medicamento (NaM-7CH). Por otro lado, el grado de dilución serial que tiene NaM-13CH sobrepasa el límite (1×10^{-23}) establecido por la Teoría de Avogadro,

in the chiltepin plants treated with NaM made evident that PFPA was greater for the NaM-13CH treatment even when they were subjected to 200 mM of NaCl (Figure 1b).

According to the analysis of factor interaction (NaCl \times NaM), the plants treated with NaM-13CH and not subjected to salinity stress showed a greater value in the PFPA variable, which indicated greater biological (biomass) productivity. The greatest value of this same variable was also recorded in plants treated with *Natrum muriaticum* in the highest centesimal dilution (NaM-13CH), including in those that were subjected to a high salinity stress degree (200 mM of NaCl) although in a lesser degree of significance compared with those not stressed with NaCl (Figure 2). These results indicated a beneficial effect *per-se* on *C. annuum* L. var. *glabriusculum* plants of the most diluted homeopathic medicine (NaM-13CH). It was interesting because the nanoparticle presence of sea salt active principle (sodium, magnesium, manganese, and others) should be less in the 13th centesimal dilution (NaM-13CH) than in the 7th serial dilution of the same medicine (NaM-7CH). On the other hand, the serial dilution degree of NaM-13CH goes beyond the limits (1×10^{-23}) established by Avogadro's Number since it is equivalent to one 26th decimal dilution (1×10^{-26}), and at this dilution level, supposedly no molecule of the initial concentrated solution or "Mother Tincture (MT) exists. Nonetheless, several physical-chemical studies of homeopathic medicines

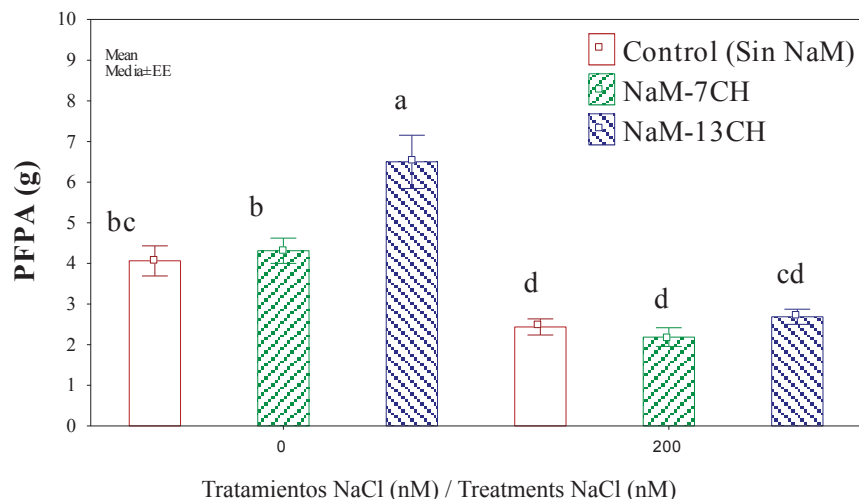


Figura 2. Efecto de la interacción NaCl × NaM en el peso fresco de la parte aérea (PFPA) de plantas de Chile chiltepin (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Barras con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey HSD $P < 0.05$).

Figure 2. Effect of the NaCl × NaM interaction on the fresh weight of the aerial part (PFPA) of chiltepin chili plants (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Bars with equal letters do not differ statistically (Tukey HSD $P < 0.05$).

ya que es equivalente a una 26^a dilución decimal (1×10^{-26}), y a este nivel de dilución se supone que ya no existen moléculas de la solución concentrada inicial o “Tintura Madre” (TM). Sin embargo, diversos estudios fisicoquímicos de medicamentos homeopáticos en alta dilución han establecido inequívocamente la presencia de nanopartículas del “principio activo” contenido en la TM, incluso en diluciones centesimales muy altas, como 30-CH y 200-CH (Chikramane *et al.*, 2010). Con base en lo anterior, se puede asumir que NaM-13CH aun contiene moléculas o nanopartículas de la TM respectiva, incluyendo magnesio. El magnesio es esencial para la formación de clorofila, una molécula de gran importancia para la fotosíntesis, que es el proceso de mayor relevancia en la producción de biomasa vegetal. Además, el Mg tiene una importante participación en actividades enzimáticas asociadas al metabolismo vegetal (Xiao *et al.*, 2014).

En un estudio reciente con albahaca (*Ocimum basilicum* L.) sometida a estrés por NaCl y tratada con NaM-7CH y NaM-13CH, también se observaron mayores valores de biomasa fresca (PFPA) pero los mejores resultados se obtuvieron al aplicar NaM-7CH (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018). En cambio, para Chile chiltepin se evidenciaron mayores valores en la variable PFPA al aplicar la 13^a dilución de NaM. Esto puede deberse a que ambas especies tienen diferentes

in high dilution have established unequivocally the presence of the “active principle” nanoparticles contained in MT, including in very high centesimal dilutions, such as 30-CH and 200-CH (Chikramane *et al.*, 2010). Based on the previous, NaM-13CH should still contain molecules or nanoparticles of the respective MT, including magnesium, which is essential in forming chlorophyll, a molecule of great importance for photosynthesis, the most relevant process in plant biomass production. Additionally, Mg has an important participation in enzymatic activities associated to plant metabolism (Xiao *et al.*, 2014).

In a recent study with basil (*Ocimum basilicum* L.) subjected to NaCl stress and treated with NaM-7CH and NaM-13CH, Mazón-Suástegui *et al.* (2018) also observed greater fresh biomass (PFPA) values, but the best results were obtained when NaM-7CH was applied. On the one hand, greater values in the PFPA variable were evident for chiltepin chili when NaM-13CH was applied. This result could be explained because both species have different tolerance and requirements, which could also show among the varieties of the same species that react differently to stimuli caused by biotic or abiotic factors. On the other hand, the results obtained in both species confirm the validity of the homeopathic Law of Similars (“*Similia Similibus Curentur*”) because

tolerancias y requerimientos. Esas diferencias pueden incluso presentarse entre diferentes variedades de la misma especie, que reaccionan de manera distinta a estímulos provocados por factores bióticos y abióticos. Por otro lado, los resultados obtenidos en ambas especies confirman la validez del principio homeopático de los similares (“*Similia Similibus Curentur*”), porque NaM es una dilución homeopatizada de sal de mar, compuesta mayoritariamente por NaCl que fue el agente químico utilizado como agente estresor por salinidad. Adicionalmente, la sal de mar contiene también una proporción menor de sales de magnesio, de manganeso y muchos otros compuestos más, que tienen un rol importante en diversas reacciones y procesos fisiológicos de las plantas.

Peso Fresco de Raíz (PFR)

Los resultados mostraron diferencias significativas en la concentración de NaCl (Figura 3a). El PFR fue menor en las plantas sometidas a estrés salino. Esto pudo ser debido a un efecto inhibitor del NaCl en alta concentración (200 mM), que afectó procesos de división celular, causando diversos trastornos metabólicos por la toxicidad del sodio y por el desbalance nutricional asociado *per-se*, al estrés osmótico (Batista-Sánchez *et al.*, 2019). Al analizar el factor NaM con sus dos dinamizaciones (7 y 13 CH) y el tratamiento control (agua destilada) sin

NaM is a homeopathic dilution of sea salt composed greatly by NaCl, which was the chemical agent used as salinity stressor. Moreover, sea salt contains a lesser proportion of salts of magnesium, manganese and many other compounds that have an important role in different plant physiological processes and reactions.

Fresh Root Weight (PFR)

The results showed significant differences in NaCl concentration (Figure 3a). Fresh root weight (PFR) was lower in plants subjected to salinity stress, which could have been due to NaCl inhibitor in high concentration (200 mM) that affected cellular division processes causing different metabolic problems by sodium toxicity and nutritional imbalance associated *per-se* to osmotic stress (Batista-Sánchez *et al.*, 2019). When the factor NaM was analyzed with its two dynamizations (7 and 13CH) and the control treatment (distilled water) without homeopathic medicine, the PFR values were greater in plants treated with NaM-13CH including those highly stressed with 200 mM of NaCl (Figure 3b).

The analysis of factor interaction showed a greater value in the PFR variable when the plants were treated with NaM-13CH even though they were subjected to NaCl stress conditions (Figure 4). The result can be explained in function of a compensatory increase

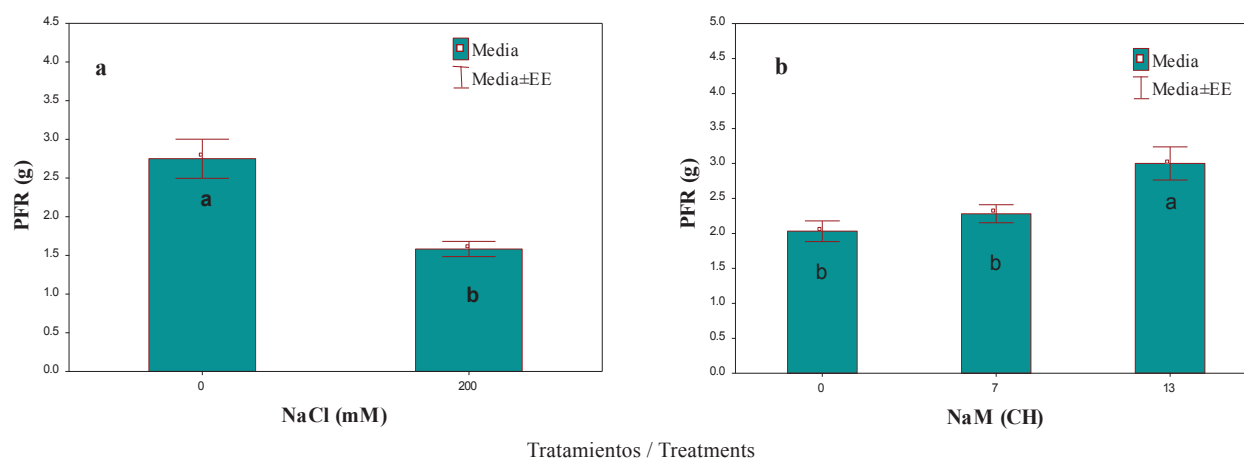


Figura 3. Efecto del agente estresor NaCl (a) y del medicamento homeopático NaM (b) en el peso fresco de raíz (PFR) de plantas de chiltepin (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Barras con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey HSD $P < 0.05$).

Figure 3. Effect of the NaCl stressor (a) and the homeopathic medicine NaM (b) on the fresh root weight (PFR) of chiltepin chili plants (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Bars with equal letters do not differ statistically (Tukey HSD $P < 0.05$).

medicamento homeopático, los valores de PFR fueron mayores en las plantas tratadas con NaM-13CH incluyendo a las plantas altamente estresadas con 200 mM de NaCl (Figura 3b).

El análisis de la interacción de factores mostró un mayor valor en la variable PFR cuando las plantas fueron tratadas con NaM-13CH, aun cuando fueron sometidas a condiciones de estrés por NaCl (Figura 4). El resultado puede explicarse en función de un incremento compensatorio asociado a la longitud de la raíz mayor, en respuesta al estrés por NaCl y a la interacción con oligoelementos originales del principio activo de NaM, ya que a mayor división y elongación de las células del sistema radicular, es posible una mayor biomasa de este órgano (Mazón Suástegui *et al.*, 2018).

Longitud de Parte Aérea (LPA)

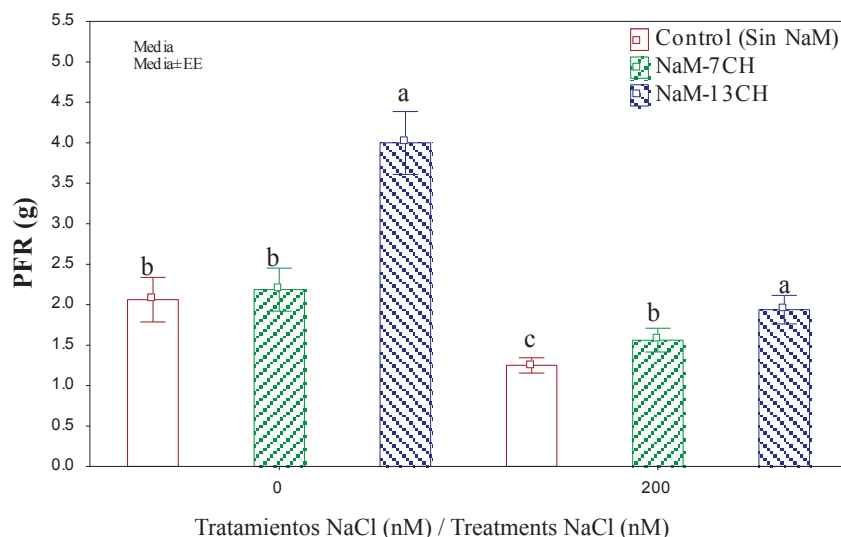
El análisis de varianza mostró diferencias significativas en LPA para las concentraciones de NaCl, evidenciándose una reducción del 80% en las plantas sometidas a 200 mM de NaCl (Figura 5). La altura de la planta es resultado de la asimilación de nutrientes y de sus procesos de división y elongación celular.

associated to greater root length in response to NaCl stress and the interaction with original oligo-elements of NaM active principle since at greater cell division and elongation of the radicle system, a greater biomass of this organ is possible (Mazón Suástegui *et al.*, 2018).

Aerial Part Length (LPA)

The analysis of variance (ANOVA) showed significant differences in the aerial part length (LPA) for NaCl concentrations, which made a reduction of 80% evident in plants subjected to 200 mM of NaCl (Figure 5). Plant height is the result of nutrient assimilation and its cell division and elongation processes. A favorable response by salinity stress shows plant tolerance facing an interference in mineral, ionic toxicity, and in its photosynthetic process (Paellob, 2010).

The results obtained suggested that NaCl caused generalized nutritional disequilibrium and disorder in chiltepin chili plants, affecting physiological functions mainly due to the general imbalance derived from plant exposure to a high and stressful concentration of NaCl (200 Mm) in the nutritive medium.



**Figura 4. Efecto de la interacción NaCl × NaM en el peso fresco de raíz (PFR) de plantas de Chile chiltepin (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) sometidas a estrés por NaCl. Barras con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey HSD $P < 0.05$).
Figure 4. Effect of NaCl × NaM interaction on fresh root weight (PFR) of chiltepin chili plants (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) subjected to NaCl stress. Bars with equal letters do not differ statistically (Tukey HSD $P < 0.05$).**

Una respuesta favorable en condiciones de estrés por salinidad demuestra tolerancia de la planta ante una interferencia en la nutrición mineral, toxicidad iónica, y daños en su aparato fotosintético (Paellob, 2010).

Los resultados obtenidos sugieren que el NaCl causó desequilibrio y desorden nutricional generalizado en las plantas de chile chiltepín, afectando su funcionamiento fisiológico debido principalmente al desbalance general derivado de la exposición de las plantas a una alta y estresante concentración de NaCl (200 mM) en el medio nutritivo.

Longitud Radicular (LR)

En ambos muestreos, al realizar el análisis de varianza de manera independiente, esta variable presentó diferencias significativas para los tratamientos de NaCl (Figura 6a). Este resultado se atribuye a la afectación directa que provoca los iones de Cl y Na a nivel celular disminuyendo el agua disponible e incrementado la fitotoxicidad y por consiguiente afectando los procesos de división y elongación celular (Batista-Sánchez *et al.*, 2017). Para los tratamientos con NaM se observó que las plantas que recibieron las diluciones 7 CH y 13 CH no mostraron diferencias (Figura 6b), pero si con respecto al control (agua, 0 NaM); esta respuesta

Radicle Length (LR)

In both samplings, when the analysis of variance was performed independently, the radicle length variable showed significant differences for the NaCl treatments (Figure 6a). This result could be attributed to the direct affectation caused by Cl and Na ions at cellular level decreasing available water and increasing phytotoxicity, and consequently affecting cell division and elongation processes (Batista-Sánchez *et al.*, 2017). For the NaM treatments, the plants that received the dilutions 7 CH and 13 CH did not show differences (Figure 6b), but they did with respect to control (water, 0 NaM); this response may be caused by the oligo-elements contained in NaM active ingredients, which act favorably so the plants can develop physiological processes (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018).

Leaf Area (AF)

The leaf area showed significant differences among NaCl concentration with the lowest average AF values in the plants subjected to 200 mM of NaCl (Figure 7). One of the deleterious effects of salinity stress is the decrease in water absorption capacity, which affects

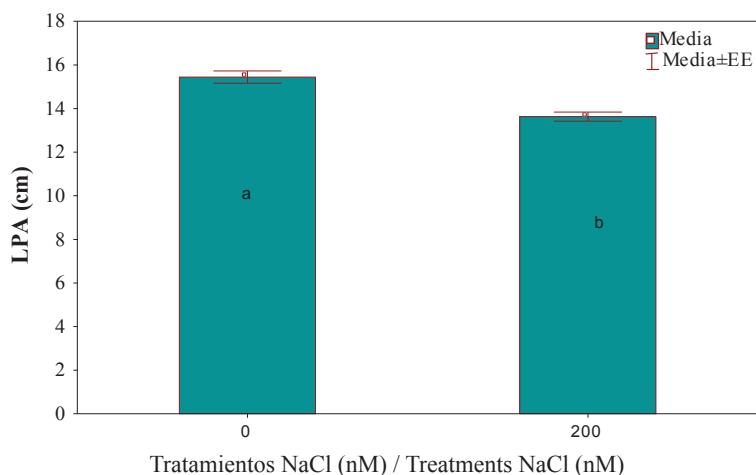


Figura 5. Efecto de NaCl en la variable longitud de parte aérea (LPA) de plantas de chile chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) sometidas a estrés salino. Barras con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey HSD $P < 0.05$).

Figure 5. Effect of NaCl on the variable length of the aerial part (LPA) of chiltepín chili plants (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) subjected to saline stress. Bars with equal letters do not differ statistically (Tukey HSD $P < 0.05$).

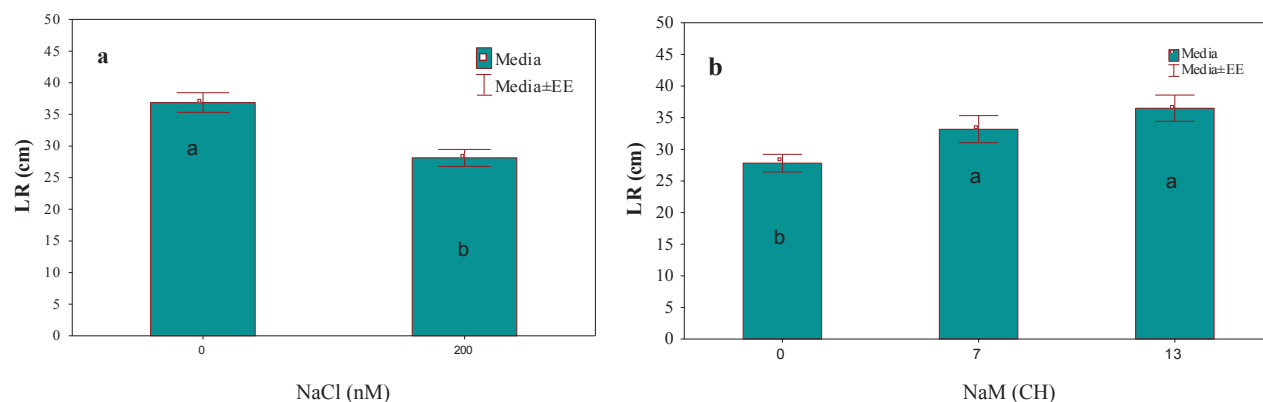


Figura 6. Efecto del agente estresor NaCl (a) y del medicamento homeopático NaM (b) en la longitud de la raíz (LR) de plantas de chile chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Barras con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey HSD $P < 0.05$).

Figure 6. Effect of the NaCl stressor (a) and the homeopathic medicine NaM (b) on the root length (LR) of chiltepin chili plants (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Bars with equal letters do not differ statistically (Tukey HSD $P < 0.05$).

puede ser posible por los oligoelementos contenidos en el ingrediente activo de NaM, los cuales actúan de forma favorable para que las plantas puedan desarrollar sus procesos fisiológicos (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018).

Área Foliar (AF)

EL área foliar mostró diferencias significativas entre las concentraciones de NaCl con los valores promedio más bajos de AF en las plantas sometidas a 200 mM de NaCl (Figura 7). Uno de los efectos deletéreos del estrés por salinidad es la disminución en la capacidad de absorción de agua, que afecta directamente el metabolismo vegetal, reduce la expansión foliar y provoca pérdida de turgencia en tallos y hoja (Rosales-Nieblas, 2018¹). Este mismo autor trabajó con plantas de epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.) sometidas a estrés por NaCl en un sistema hidropónico y reportó que presentaron afectación en el área foliar a 100 mM de NaCl. En el presente estudio, las plantas de chile chiltepín mostraron una reducción en el número de hojas y algún grado de marchitez general de la planta, al ser sometidas a una concentración dos veces mayor (200 mM) de NaCl en el medio de cultivo hidropónico. Esto indica que *C. annuum* es una especie más tolerante a la salinidad que *Ch. ambrosioides* L.

the plant mechanism directly, reducing leaf expansion and causing turgidity loss in stem and leaf (Rosales-Nieblas, 2018¹). This same author worked with *Chenopodium ambrosioides* L., commonly known as “epazote” or wormseed plant subjected to NaCl stress in a hydroponic system and reported affection in the leaf area at 100 mM of NaCl. In this study, chiltepin chili plants showed a reduction in leaf number and a degree of general plant withering when subjected to a concentration twice greater (200 mM) of NaCl in the hydroponic cultivation. This result indicates that *C. annuum* is a more tolerant species to salinity than *Ch. ambrosioides* L.

The leaf area (AF) showed significant differences in NaCl × NaM interaction with average values significantly greater in plants that were not stressed with NaCl but were treated with NaM-13CH (Figure 8). On the contrary, the average value of AF in the plants subjected at 200 mM of NaCl was much lower than those of the plants not subjected to salinity stress. In the plants stressed with NaCl, no significant differences were recorded among treatments; however, the average value of AF was slightly greater in those treated with NaM-13CH with respect to NaM-7CH and the control group (Figure 8). These results suggested that NaM homeopathic medicine, developed by serial dilution/succussion of a sea salt MT, whose main component is

¹ Rosales Nieblas, A. C. 2018. Respuesta fisiológica y morfométrica del epazote (*Chenopodium Ambrosioides* L.) a concentraciones de cloruro de sodio en un medio hidropónico. Tesis de Licenciatura. Área de Conocimiento de Ciencias Agropecuarias, Departamento Académico de Agronomía, Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, Baja California Sur, México.

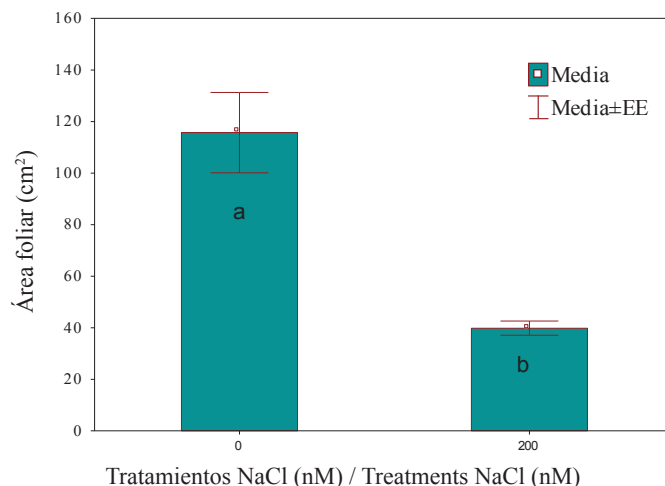


Figura 7. Efecto del cloruro de sodio (NaCl) en plantas de chile chiltepin (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Barras con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey HSD $P < 0.05$).

Figure 7. Effect of sodium chloride (NaCl) on the AF of chiltepin chili plants (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Bars with equal letters do not differ statistically (Tukey HSD $P < 0.05$).

El área foliar (AF) mostró diferencias significativas en la interacción NaCl \times NaM con valores medios de AF significativamente mayores en las plantas que no fueron estresadas con NaCl, pero sí fueron tratadas con NaM-13CH (Figura 8). En contraparte, el valor medio de AF en las plantas sometidas a 200 mM de NaCl fue mucho menor al de las plantas no sometidas a estrés salino. En las plantas estresadas con NaCl no se registraron diferencias significativas entre tratamientos; sin embargo, el valor medio de AF fue ligeramente mayor en las plantas tratadas con NaM-13CH con respecto a NaM-7CH y el control (Figura 8). Estos resultados sugieren que el medicamento homeopático NaM, desarrollado mediante la dilución/agitación serial de una TM de sal de mar cuyo componente principal es el NaCl, actúa precisamente como un atenuante del estrés salino (200 mM de NaCl) en plantas de chile chiltepin (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Esto corrobora y valida el principio homeopático de los similares (“*similia similibus curentur*”), base filosófica y conceptual de la medicina homeopática (Mazón-Suástegui *et al.*, 2019).

Peso Seco de Parte Aérea (PSPA)

Las plantas de chile chiltepin sometidas a concentraciones de 200 mM de NaCl registraron afectación en PSPA con un decremento del 90%, con

NaCl, acted precisely to attenuate salinity stress (200 mM of NaCl) in chiltepin chili (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) plants. These results corroborate and validate a philosophical and conceptual basis (“*similia similibus curentur*”), of homeopathic medicine (Mazón-Suástegui *et al.*, 2019).

Aerial Part Dry Weight (PSPA)

The chiltepin chili plants subjected to concentrations of 200 mM of NaCl recorded effects on aerial part dry weight (PSPA) with a decrease of 90% with respect to those that did not receive a salinity treatment by adding NaCl (Figure 9). These results agree with Pio *et al.* (2001), who asserted that dry matter decreased proportionally as salinity levels increased in five vine rootstocks. Taffouo *et al.* (2009) also studied the salinity effect on *Vigna unguiculata* L. Walp. plants and reported that dry weight reduced notably starting from 50 mM of NaCl, due to osmotic stress and that of the specific Cl^- and Na^+ ions that reduce the osmotic potential of the solution, and in consequence, water availability for the plant.

Root Dry Weight (PSR)

The root dry weight (PSR) showed significant differences among NaCl concentrations. This variable

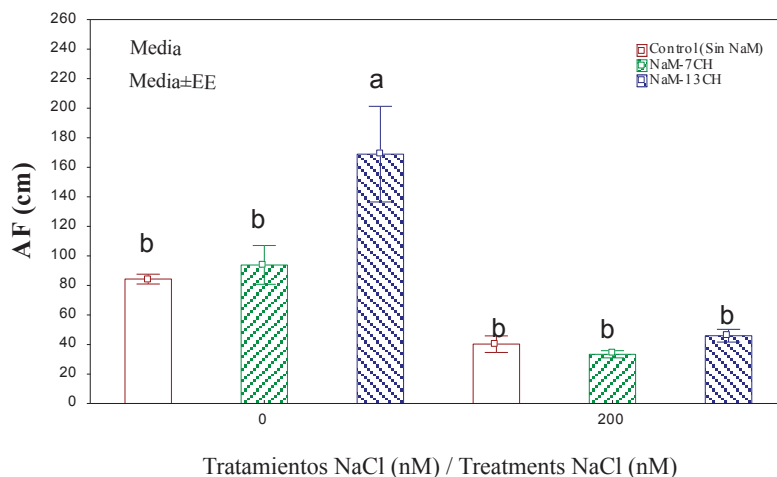


Figura 8. Efecto de la interacción NaCl × NaM en el área foliar (AF) de plantas de Chile chiltepin (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Barras con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey HSD $P < 0.05$).

Figure 8. Effect of NaCl × NaM interaction on the leaf area (AF) of chiltepin chili plants (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Bars with equal letters do not differ statistically (Tukey HSD $P < 0.05$).

respecto a las plantas que no recibieron un tratamiento salino con adición de NaCl (Figura 9). Estos resultados coinciden con Pio *et al.* (2001), quienes afirman que la materia seca disminuyó proporcionalmente conforme se incrementaron los niveles de salinidad, en cinco portainjertos de vid. Taffouo *et al.* (2009) también estudiaron el efecto de la salinidad en plantas de *Vigna unguiculata* L. Walp. y reportaron que el peso seco se redujo notablemente a partir de 50 mM de NaCl, debido al estrés osmótico y al efecto de los iones específicos Cl^- y Na^+ , que reducen el potencial osmótico de la solución y en consecuencia, la disponibilidad de agua para la planta.

Peso Seco de Raíz (PSR)

El PSR mostró diferencias significativas entre las concentraciones de NaCl. Esta variable se redujo en las plantas sometidas a 200 mM de NaCl, sin aplicación de medicamento homeopático NaM (Figura 10a). La disminución del PSR es atribuible a la presencia de NaCl en el medio nutritivo, ya que en concentraciones altas esta sal se vuelve tóxica para la planta, causando desbalance nutricional y desorden metabólico que reducen el crecimiento del tejido vegetal (Batista-Sánchez *et al.*, 2017). También se encontraron diferencias significativas entre las dinamizaciones

was reduced in plants subjected to 200 mM of NaCl without the application of homeopathic medicine NaM (Figure 10a). The decrease of PSR is attributed to the presence of NaCl in the nutritive medium since in high concentrations this salt is toxic for the plant, causing a nutritional imbalance and metabolic disorder that reduce plant tissue growth (Batista-Sánchez *et al.*, 2017). Additionally, significant differences were found between NaM dynamizations applied (Figure 10b), finding greater value in this variable in plants that received 13CH of NaM dilution. In the interaction NaCl × NaM analysis (Figure 11), the PSR was greater in plants treated with 13CH of NaM and without salinity stress; in those subjected to 200 mM of NaCl no significant differences were observed, but the best result corresponded to NaM-7CH (Figure 11). The results suggest that NaM-7CH and NaM-13CH has anti-salinity stress properties that favor growth and cellular elongation in chiltepin chili *C. annuum* L. var. *glabriusculum*, confirmed with that reported for other important commercial species, such as basil and bean (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018; 2019).

Relative Water Content (CRA)

Significant differences were found with respect to factor A, making a decrease in relative water content

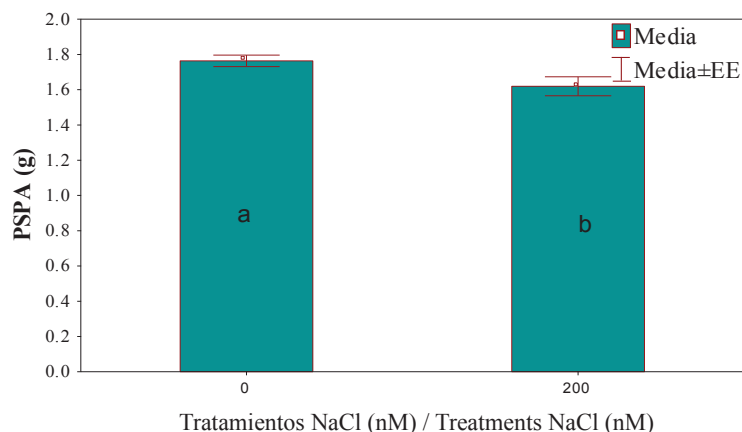


Figura 9. Efecto del cloruro de sodio (NaCl) en peso seco de la parte aérea (PSPA) de plantas de chile chiltepin (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Barras con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey HSD $P < 0.05$).

Figure 9. Effect of sodium chloride (NaCl) on dry weight of the aerial part (PSPA) of chiltepin chili plants (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Bars with equal letters do not differ statistically (Tukey HSD $P < 0.05$).

de NaM aplicadas (Figura 10b), los mayores valores de esta variable se observaron en las plantas que recibieron la dilución 13 CH de NaM. En el análisis de la interacción NaCl \times NaM (Figura 11), se observó que el PSR fue mayor en las plantas tratadas con 13 CH de NaM y sin estrés salino. En las plantas sometidas a 200 mM de NaCl no hubo diferencias

(CRA) evident in plants subjected to 200 mM of NaCl (Figure 12 a). Rosales-Nieblas (2018¹) mentioned that CRA reduced in wormseed plants developed under salinity stress conditions when the plants were subjected to 100 and 150 mM of NaCl. This results confirmed that water mobility decreased in salinity conditions and the plants were compromised to live in physiological

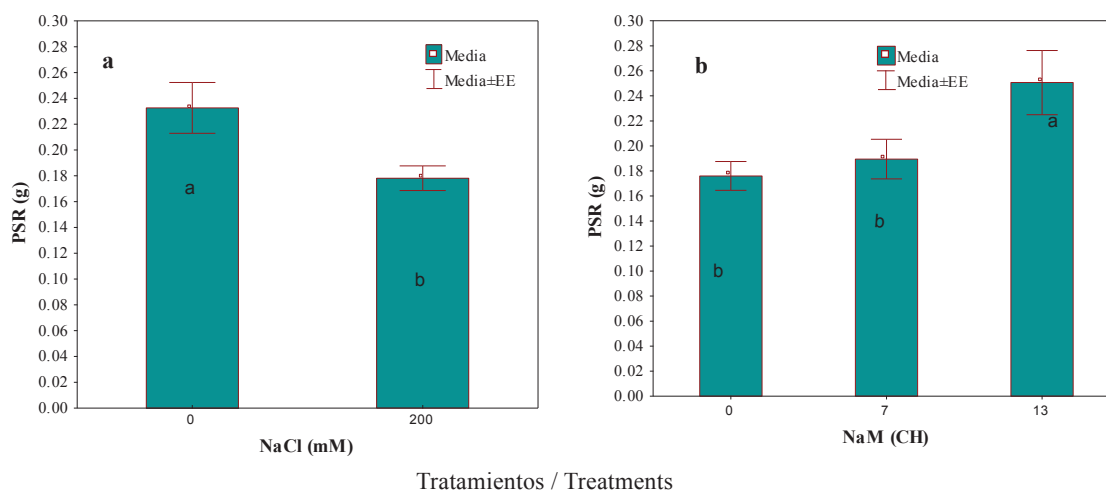


Figura 10. Efecto del agente estresor NaCl (a) y del medicamento homeopático NaM (b) en el peso seco de raíz (PSR) de plantas de chile chiltepin (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Barras con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey HSD $P < 0.05$).

Figure 10. Effect of the NaCl stressor (a) and the homeopathic medicine NaM (b) on the dry root weight (PSR) of chiltepin chili plants (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Bars with equal letters do not differ statistically (Tukey HSD $P < 0.05$).

significativas, pero el mejor resultado correspondió a NaM-7CH (Figura 11). Esto sugiere que el NaM-7CH y NaM-13CH posee propiedades anti-estrés salino que favorecen el crecimiento y la elongación celular en plantas de Chile chiltepín *C. annuum* L. var. *glabriusculum*, confirmándose esto con lo reportado para otras especies de importancia comercial, como albahaca y frijol (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018; 2019).

Contenido Relativo de Agua (CRA)

Se encontraron diferencias significativas con respecto al factor A, evidenciando una disminución del CRA en las plantas sometidas a 200 mM de NaCl (Figura 12a). Rosales-Nieblas (2018¹), menciona que el CRA en plantas de epazote desarrolladas bajo condiciones de estrés por salinidad, se redujo cuando las plantas fueron sometidas a 100 y 150 mM de NaCl. Estos resultados confirman que en condiciones de salinidad la movilidad de agua para las plantas disminuye y éstas se ven obligadas a vivir en condiciones de sequía fisiológica provocando incluso muerte del tejido vegetal. Al analizar el efecto de los tratamientos homeopáticos se pudo observar que el CRA incremento significativamente en las plantas tratadas con las diluciones 7 y 13 CH, siendo mayor para 7 CH (Figura 12b).

drought conditions, including death of plant tissue. When the effect of the homeopathic treatments was analyzed, the CRA increased significantly in plants treated with dilutions 7 and 13 CH, which was greater for 7CH (Figure 12 b).

The interaction analysis of CRA showed significant differences in factor B where plants treated with NaM-7CH had the highest values, including in stressful salinity (200 mM) conditions (Figure 13). The non-stressed plants with NaCl and treated with NaM-7CH showed greater CRA values, followed by those that received leaf application of NaM-13CH. The plants subjected to salinity stress and without homeopathic medicine showed lower values compared with the rest of the treatments. The results of this study in chiltepin chili plants suggested that NaM homeopathic medicine could have a positive effect in the plant favoring water retention in the plant tissue subjected to salinity conditions. These results are not sufficient to know the precise mechanism of action of these homeopathic medicines of human use in plant physiological functions. However, the evidence cause-effect derived from this research contributes to bases for new studies in depth to help understand the specific way of the possible metabolic routes involved with the action of NaM active ingredient in plants.

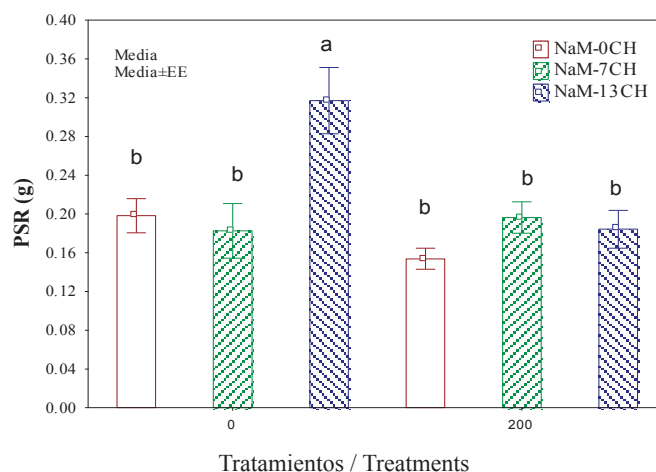


Figura 11. Efecto de la interacción NaCl × NaM en el peso seco de raíz (PSR) de plantas de Chile chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Barras con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey HSD $P < 0.05$).

Figure 11. Effect of NaCl × NaM interaction on dry root weight (PSR) of chiltepin chili plants (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Bars with equal letters do not differ statistically (Tukey HSD $P < 0.05$).

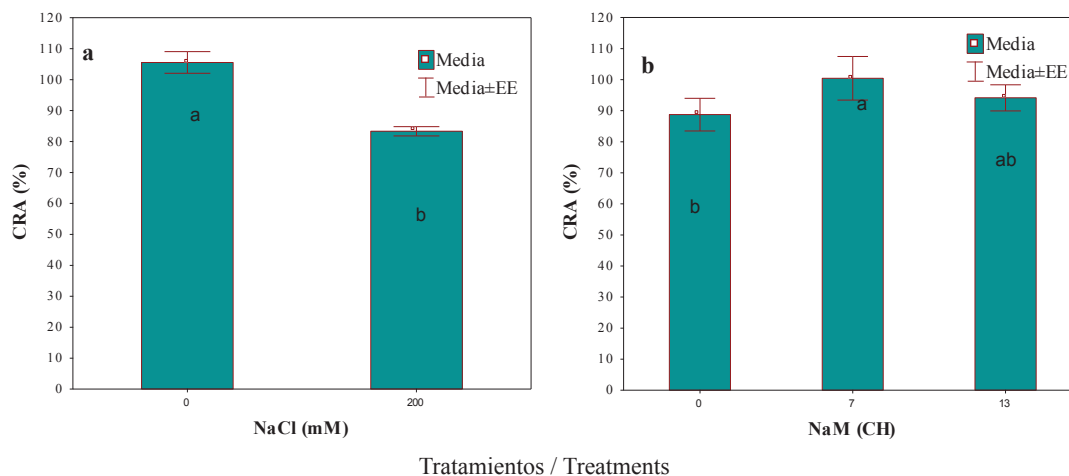


Figura 12. Efecto del agente estresor NaCl (a) y del medicamento homeopático NaM (b) en el contenido relativo de agua (CRA) de plantas de chile chiltepin (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Barras con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey HSD $P < 0.05$).

Figure 12. Effect of the NaCl stressor (a) and the homeopathic medicine NaM (b) on the relative water content (CRA) of chiltepin chili plants (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Bars with equal letters do not differ statistically (Tukey HSD $P < 0.05$).

En el análisis de las interacciones el CRA mostró diferencias significativas en el factor B, las plantas tratadas con NaM-7CH presentaron los valores más altos, incluso en condiciones estresantes (200 mM) de salinidad (Figura 13). Las plantas no estresadas con NaCl y tratadas con NaM-7CH

CONCLUSIONS

The chiltepin chili (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) plants gradually subjected to stress by NaCl showed signs of affectation at 200 mM of NaCl. *Natrum muriaticum* (NaM) homeopathic medicine for

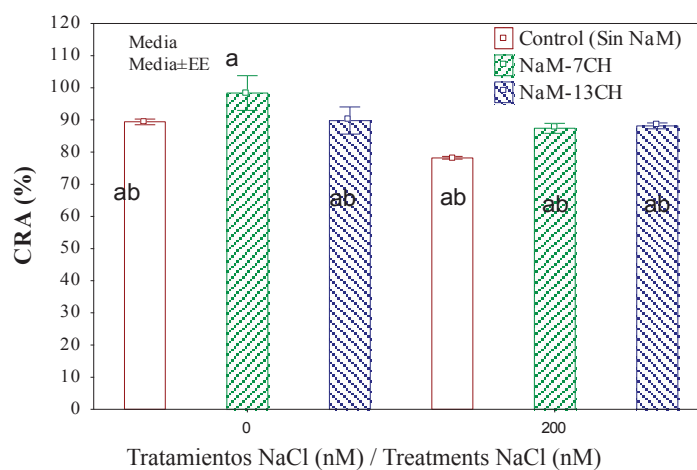


Figura 13. Efecto de la interacción NaCl \times NaM en el contenido relativo de agua (CRA) de plantas de chile chiltepin (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Barras con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey HSD $P < 0.05$).

Figure 13. Effect of the NaCl \times NaM interaction on the relative water content (CRA) of chiltepin chili plants (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). Bars with equal letters do not differ statistically (Tukey HSD $P < 0.05$).

presentaron los valores mayores de CRA, seguidas por las plantas que recibieron la aplicación foliar de NaM-13CH. Las plantas sometidas a estrés salino y sin tratamiento homeopático presentaron valores inferiores comparados con el resto de los tratamientos. Los resultados del presente estudio en plantas de Chile chiltepin sugieren que el medicamento homeopático NaM podría tener un efecto positivo en la planta al favorecer la retención de agua en el tejido vegetal sometido a condiciones salinas. Estos resultados no son suficientes para conocer el mecanismo preciso de acción de este medicamento homeopático de uso humano, en las funciones fisiológicas de una planta. Sin embargo, las evidencias causa-efecto derivadas de la presente investigación aportan bases para nuevos estudios de mayor profundidad, que ayudaría a comprender de manera específica las posibles rutas metabólicas involucradas con la acción del ingrediente activo de NaM en las plantas.

CONCLUSIONES

Las plantas de Chile chiltepin (*Capsicum annum* var *glabriusculum*) gradualmente sometidas a estrés por NaCl mostraron signos de afectación a 200 mM de NaCl. El medicamento homeopático para uso en humanos *Natrum muriaticum* (NaM) actuó como atenuante del estrés por NaCl en las plantas, incrementando área foliar, longitud radicular y longitud de parte aérea, peso fresco y peso seco de la parte radicular y aérea. Los mejores resultados, significativos para la mayoría de las variables evaluadas, se obtuvieron con la dilución más alta del medicamento (NaM-13CH), justo por arriba del límite propuesto en la Teoría de Avogadro, lo que indica que, a mayor dilución homeopática, la respuesta de las plantas (resistencia al estrés por NaCl) fue más evidente. Esta es la primera evidencia experimental sobre los efectos del medicamento homeopático (NaM) en Chile chiltepin *C. annum* var *glabriusculum*.

AGRADECIMIENTOS

El estudio fue financiado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación, proyecto Ciencia Básica SEP-CONACYT No. 258282 “Evaluación experimental de homeopatía y nuevos probióticos en el cultivo de moluscos, crustáceos y peces de interés comercial”, bajo la responsabilidad académica de

human use acted attenuating stress caused by NaCl in plants, increasing leaf area, radicle and aerial part length, radicle and aerial part fresh and dry weight. The best results, significant for the majority of the variables assessed, were obtained with the highest dilution of the homeopathic medicine (NaM-13CH), just above the limit proposed by Avogadro’s Number, which indicated that to a greater homeopathic dilution, plant response (resistance to NaCl stress) was more evident. This is the first experimental evidence on the effects of (NaM) homeopathic medicine in chiltepin Chile *C. annum* var *glabriusculum*.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed by the Fondo Sectorial de Investigación para la Educación, project Ciencia Básica SEP-CONACYT No. 258282 “Evaluación experimental de homeopatía y nuevos probióticos en el cultivo de moluscos, crustáceos y peces de interés comercial”, under the academic responsibility of JMMS. NMR received a technical training scholarship from the project PROINNOIVA-CONACYT/PEASA No 241777, under the academic responsibility of JMMS. The authors thank D. Fischer for translation services.

-End of english version-

JMMS. NMR recibió beca de entrenamiento técnico del proyecto PROINNOIVA-CONACYT/PEASA No 241777, bajo la responsabilidad académica de JMMS. Se agradece a Diana Fischer sus servicios de traducción del manuscrito en idioma inglés.

-Fin de la versión en español-

REFERENCIAS / REFERENCES

- Abbas, G., M. Saqib, A. Javaid, and M. Anwar ul Haq. 2015. Interactive effects of salinity and iron deficiency on different rice genotypes. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 178: 306-311. doi: 10.1002/jpln.201400358.

- Batista Sánchez, D., B. Murillo Amador, A. Nieto Garibay, L. Alcaraz Meléndez, E. Troyo Diéguez, L. Hernández Montiel y C. M. Ojeda Silvera. 2017. Mitigación de NaCl por efecto de un bioestimulante en la germinación de *Ocimum basilicum* L. *Terra Latinoamericana* 35: 309-320.
- Batista-Sánchez, D., B. Murillo-Amador, A. Nieto-Garibay, L. Alcaraz-Meléndez, E. Troyo-Diéguez, L. Hernández-Montiel, C. M. Ojeda-Silvera, J. M. Mazón-Suástegui y Y. M. Agüero-Fernández. 2019. Bioestimulante derivado de caña de azúcar mitiga los efectos del estrés por NaCl en *Ocimum basilicum* L. *Ecosist. Recur. Agropec.* 6: 297-306.
- Chikramane, P. S., A. K. Suresh, J. R. Bellare, and S. G. Kane. 2010. Extreme homeopathic dilutions retain starting materials: A nanoparticulate perspective. *Homeopathy* 99: 231-242. doi: 10.1016/j.homp.2010.05.006.
- Fereres, E. and M. A. Soriano. 2007. Deficit irrigation for reducing agricultural water use. *J. Exp. Bot.* 58: 147-159. doi: <https://doi.org/10.1093/jxb/erl165>.
- Finkel, E. 2009. With phenomics, plant scientists hope to shift breeding into overdrive. *Science* 325: 380-381. doi: 10.1126/science.325_380.
- García, E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía, UNAM. México, D. F., México.
- Giardini-Bonfim, F. P., V. W. Dias-Casali, and E. Ronie-Martins. 2012. Germinação e vigor de sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) peletizadas com preparados homeopáticos de *Natrum muriaticum*, submetidas a estresse salino. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer-Goiania* 8: 625-633.
- Hessini, K., S. Ferchichi, S. B. Youssef, K. H. Werner, C. Cruz, and M. Gandour. How does salinity duration affect growth and productivity of cultivated barley? *Agron. J.* 107: 174-180. doi: <https://doi.org/10.2134/agronj14.0281>.
- Khaliq, S., Z. Ullah Zafar, H. ur R. Athar, and R. Khaliq. 2014. Physiological and biochemical basis of salt tolerance in *Ocimum basilicum* L. *J. Med. Plants Stud.* 2: 18-27.
- Mazón-Suástegui, J. M., M. García-Bernal, P. E. Saucedo, A. Campa-Córdova, and F. Abasolo-Pacheco. 2017. Homeopathy outperforms antibiotics treatment in juvenile scallop *Argopecten ventricosus*: Effects on growth, survival, and immune response. *Homeopathy* 106: 18-26. doi: 10.1016/j.homp.2016.12.002.
- Mazón Suástegui, J. M., B. Murillo-Amador, D. Batista-Sánchez, Y. Agüero-Fernández, M. R. García-Bernal, and C. M. Ojeda Silvera. 2018. *Natrum muriaticum* as an attenuant of NaCl-salinity in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Nova Sci.* 10: 120-136. doi: 10.21640/ns.v10i21.1423.
- Mazón-Suástegui, J. M., C. M. Ojeda-Silvera, M. García-Bernal, M. A. Avilés-Quevedo, F. Abasolo-Pacheco, D. Batista-Sánchez, D. Tovar-Ramírez, F. Arcos-Ortega, B. Murillo-Amador, A. Nieto-Garibay, Y. Ferrer-Sánchez, R. M. Morelos-Castro, A. Alvarado-Mendoza, M. Díaz-Díaz, and B. Bonilla-Montalvan. 2019. Agricultural homeopathy: A new insights into organic's. *IntechOpen Books.* doi: 10.5772/intechopen.84482.
- Meneses-Moreno, N. 2009. Agrohomeopatía una opción para la agricultura. *Bol. Informativo Homeopatía Agríc.* 1: 1-25.
- Murillo-Amador, B., S. Yamada, T. Yamaguchi, E. Rueda-Puente, N. Ávila-Serrano, J. L. García-Hernández, R. López-Aguilar, E. Troyo-Diéguez, and A. Nieto-Garibay. 2007. Influence of calcium silicate on growth, physiological parameters and mineral nutrition in two legume species under salt stress. *J. Agron. Crop Sci.* 193: 413-421. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2007.00273.x>.
- Nieto-Garibay, A., B. Murillo-Amador, E. Troyo-Diéguez, J. L. García-Hernández, and F. H. Ruíz-Espinoza. 2010. Water stress in two capsicum species with different domestication grade. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 12: 353-360.
- Ojeda-Silvera, C. M., B. Murillo-Amador, A. Nieto-Garibay, E. Troyo-Diéguez, M. I. Reynaldo-Escobar, F. H. Ruíz-Espinoza y J. L. García-Hernández. 2015. Emergencia y crecimiento de plántulas de variedades de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) sometidas a estrés hídrico. *Ecosist. Recur. Agropec.* 2: 151-161.
- Paellob, F. 2010. Root length, ion uptake and relationship with salinity tolerance in wheat, rice and prewitt. *Plant Growth Regulat.* 1: 46-54.
- Parida, A. K., A. B. Das, Y. Sanada, and P. Mohanty. 2004. Effects of salinity on biochemical components of the mangrove, *Aegiceras corniculatum*. *Aquatic Bot.* 80: 77-87 doi: 10.1016/j.aquabot.2004.07.005.
- Pinto, R. J., N. C. Mapeli, C. Cremon, e E. Frazão da Silva 2014. Germinação e crescimento inicial de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) em função de preparados homeopáticos Carbo vegetabilis e dias após o despolpamento para sementeira. *Rev. Agrarian* 7: 244-250.
- Pio, V. A., C. Horst Bruckner, H. E. Prieto Martinez, C. A. Martinez y Huaman e P. R. Mosquim. 2001. Características fisiológicas de porta-enxertos de videira em solução salina. *Sci. Agric.* 58: 139-143. doi: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162001000100021>.
- Sarwat, M., A. Hashem, M. A. Hanger, E. F. Abd-Allah, A. A. Alqarawi, M. N. Alyemeni, P. Ahmad, and S. Guzel. 2016. Mitigation of NaCl stress by arbuscular mycorrhizal fungi through the modulation of osmolytes, antioxidants and secondary metabolites in mustard (*Brassica juncea* L.) plants. *Front. Plant Sci.* 7: 869-883. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00869>.
- SSA (Secretaría de Salud). 2015. *Farmacopea homeopática de los Estados Unidos Mexicanos*. FEUM-SSA. Biblioteca Nacional de México 615.532-scdd21. ISBN: 978-607-460-509-9.
- StatSoft Inc. 2011. *Statistica*. System reference. StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA.
- Taffouo, V. D., J. K. Kouamou, L. M. Tchiengue N., B. A. N. Ndjedji, and A. Akoa. 2009. Effects of salinity stress on growth, ions partitioning and yield of some Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivars. *Int. J. Bot.* 5: 135-143. doi: 10.3923/ijb.2009.135.143.
- Xiao, J., Ch. Hu, Y. Chen, B. Yang, and J. Hua. 2014. Effects of low magnesium and an arbuscular mycorrhizal fungus on the growth, magnesium distribution and photosynthesis of two citrus cultivars. *Sci. Hortic.* 177: 14-20. doi: 10.1016/j.scienta.2014.07.016.
- Yamasaki, S. and L. R. Dillenburg. 1999. Measurements of leaf relative water content in *araucaria angustifolia*. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 11: 69-75.