



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Efecto de diferentes factores ambientales (luz, temperatura y déficit hídrico) en la acumulación de osmolitos en *Echeveria laui* (CRASSULACEAE)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
BIÓL. MIGUEL ANGEL VERASTEGUI VIDAL

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DR. ELÍAS PIEDRA IBARRA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DR. CÉSAR MATEO FLORES ORTÍZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM
DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Efecto de diferentes factores ambientales (luz, temperatura y déficit hídrico) en la acumulación de osmolitos en *Echeveria laui* (CRASSULACEAE)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. MIGUEL ANGEL VERASTEGUI VIDAL

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. ELÍAS PIEDRA IBARRA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. CÉSAR MATEO FLORES ORTÍZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE, 2016

Lic. Ivonne Ramirez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de mayo de 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **VERASTEGUI VIDAL MIGUEL ANGEL**, con número de cuenta 404039454, con la tesis titulada "**Efecto de diferentes factores ambientales (luz, temperatura y déficit hídrico) en la acumulación de osmolitos en Echeveria laui (CRASSULACEAE).**", realizada bajo la dirección del **DR. ELIAS PIEDRA IBARRA**:

Presidente: DR. JUAN GERARDO CRÍZ MONTIEL
Vocal: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS
Secretario: DRA. MARÍA DEL ROSIO CRUZ ORIEGA
Suplente: DR. HUGO VIRGILIO PERALES VELA
Suplente: DRA. ALMA DELFINA LUCIA CROZCO SEGOVIA

Sin otro particular me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria Cd. Mx., a 29 de agosto de 2016.

M del Coro Ariz.
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por la oportunidad de realizar mi trabajo de Maestría y el apoyo para concluirlo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca de posgrado con número 480804/282037, para la realización de mis estudios de maestría.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) por hacerme beneficiario de la Beca Para Tesis de Posgrado con folio 14BTM0108, como apoyo para la culminación de mi trabajo de tesis.

A la Fundación para la reserva de la Biósfera Cuicatlán, A. C. por la donación de ejemplares de *Echeveria laui* y el apoyo en la realización de este trabajo dentro de las instalaciones del Vivero la Iberia con registro UMA: MX/VIV-CO-218-OAX/05.

A los miembros del Comité Tutor:

Dr. Elías Piedra Ibarra.

Dr. César Mateo Flores Ortíz.

Dra. María del Rocío Cruz Ortega.



AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

- A mi familia, por el apoyo incondicional que me han brindado hasta el momento, son muy importantes para mí.
- Al Dr. Juan Gerardo Ortiz Montiel, por todas las grandes cosas que me ha enseñado que soy capaz de hacer y sobre todo por ser más que un profesor, gracias por brindarme la oportunidad de ser su amigo.
- Al Dr. Elías Piedra Ibarra, por la dedicación al proyecto y las acertadas correcciones que hicieron posible este trabajo.
- A mi extraordinaria colega M. en C. María del Rocío Reyero Saavedra, fuiste una pieza clave en este equipo, gracias por permanecer cerca siempre que te necesito, tu ayuda fue invaluable.
- A mis compañeras M. en C. Montserrat López Coria y Biol. Yolanda Pozos Ruíz, por su apoyo, esfuerzo y dedicación a este trabajo, gracias por su solidaridad, pero sobre todo por su amistad.
- A mí querida amiga M. en C. Teresa Ortiz Melo, por apoyarme en este trabajo con la traducción del resumen y por compartir todas tus alegrías con nosotros.
- Al M. en C Luis Barbo, por todas las facilidades y asesorías que nos brindó durante la realización de este trabajo.
- Al Biólogo Jerónimo Reyes y a la Lic. Patricia Jones, por todas las facilidades y atenciones que tuvieron durante el desarrollo de éste trabajo.
- A la Dra. María del Rocío Cruz Ortega, Dr. César Mateo Flores Ortiz, Dra. Alma Delfina Lucia Orozco Segovia, Dr. Hugo Virgilio Perales Vela y Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras, por las observaciones tan acertados que realizaron al trabajo.
- Al Sr. Antonio, Sr. Ignacio Trejo y Sra. Josefina, gracias por todas las atenciones que tuvieron con nosotros.
- A Wendy y a Led, por el apoyo y motivación durante el desarrollo de este proyecto, gracias por permanecer cerca.
- A mis amigos Pablo, Iván y Marisol, por formar parte de mi vida, gracias amigos.
- A todos mis compañeros de laboratorio, por hacerme sonreír todos los días.



DEDICATORIA

A mis padres y familia, que han sido una gran motivación para mí...

En especial a ti madre, por el esfuerzo sobre humano que has hecho para mantener vivos nuestros sueños, eres extraordinaria y en definitiva eres mi vida, esto es para ti, te amo.



ÍNDICE

• Lista de Figuras y Cuadros	1
• Resumen	2
• Abstract	3
• Introducción	4
• Hipótesis	6
• Objetivos	6
• Antecedentes	7
• Metodología	
○ Características generales del trabajo	
▪ <i>Material Biológico.</i>	9
▪ <i>Fotoperiodo.</i>	9
▪ <i>Procedimientos para las determinaciones.</i>	9



- *Cuantificación de prolina por espectrometría.* 10

- *Cuantificación de prolina por HPLC*
 - *Extracción y derivatización de prolina con 9-fluorenilmetil-cloroformato (FMOC-Cl).* 10

 - *Separación y cuantificación de prolina-FMOC por HPLC-Fluorómetro.* 11

- *Determinación de azúcares solubles.* 11

- *Potencial hídrico.* 11

- *Curva de saturación rápida por luz.* 12

- Ensayo
 - *Respuesta al estrés de corto plazo en condiciones controladas: Déficit hídrico y temperatura elevada.* 13

- Experimentos
 - *1. Respuesta al estrés de largo plazo en condiciones controladas: Déficit hídrico y temperatura elevada.* 14



- 2. *Respuesta al estrés de largo plazo en condiciones controladas:*
Exceso de flujo fotónico. 14
- 3. *Respuesta al estrés de largo plazo en condiciones in situ:*
Riego, temperatura y luz. 15
- 4. *Respuesta al estrés de corto plazo en condiciones controladas*
con plantas que fueron sometidas a estrés abiótico in situ:
Déficit hídrico y temperatura elevada. 16
- Resultados
 - Ensayo
 - *Respuesta al estrés de corto plazo en condiciones controladas:*
Déficit hídrico y temperatura elevada. 18
 - Experimentos
 - 1. *Respuesta al estrés de largo plazo en condiciones controladas:*
Déficit hídrico y temperatura elevada. 18
 - 2. *Respuesta al estrés de largo plazo en condiciones controladas:*
Exceso de flujo fotónico. 24



- 3. *Respuesta al estrés de largo plazo en condiciones in situ:*
Riego, temperatura y luz.27

- 4. *Respuesta al estrés de corto plazo en condiciones controladas*
con plantas que fueron sometidas a estrés abiótico in situ:
Déficit hídrico y temperatura elevada.30

- *Discusión*37

- *Conclusiones*47

- *Literatura citada*48

- *Anexo*58



LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

- **Figura 1.-** *Esquema general de trabajo.*
- **Figura 2.-** *Daño por déficit hídrico y temperatura.*
- **Figura 3.-** *Concentración de prolina en plantas con déficit hídrico y diferentes temperaturas.*
- **Figura 4.-** *Concentración de azúcares solubles en plantas con déficit hídrico y diferentes temperaturas.*
- **Figura 5.-** *Potencial hídrico en plantas con déficit hídrico y diferentes temperaturas.*
- **Figura 6.-** *Curva de saturación rápida por luz.*
- **Figura 7.-** *Concentración de azúcares solubles: estrés por luz.*
- **Figura 8.-** *Temperaturas de cuatro meses “La Iberia”, Cuicatlán Oax.*
- **Figura 9.-** *Concentración de prolina en plantas con déficit hídrico a largo plazo.*
- **Figura 10.-** *Concentración de azúcares solubles en plantas con déficit hídrico a largo plazo.*
- **Figura 11.-** *Potencial hídrico en plantas con déficit hídrico a largo plazo.*
- **Figura 12.-** *Temperaturas e irradiaciones del invernadero UMF, FES-Iztacala, UNAM.*
- **Figura 13.-** *Plantas de E. laui antes y después de ingresar a la cámara de crecimiento a 44°C.*
- **Figura 14.-** *Concentración de prolina en plantas con déficit hídrico y temperatura elevada.*
- **Figura 15.-** *Concentración de azúcares solubles en plantas con déficit hídrico y temperatura elevada.*
- **Figura 16.-** *Potencial hídrico en plantas con temperatura elevada y déficit hídrico.*
- **Figura 17.-** *Porcentaje de variación del potencial hídrico con respecto al control.*
- **Cuadro 1.-** *Potencial hídrico, concentraciones de prolina y azúcares solubles, en plantas con déficit hídrico a una temperatura de 44°C.*
- **Cuadro 2.-** *Concentraciones de prolina en plantas con déficit hídrico y diferentes temperaturas.*
- **Cuadro 3.-** *Concentraciones de azúcares solubles en plantas con déficit hídrico y diferentes temperaturas.*
- **Cuadro 4.-** *Potencial hídrico en plantas con diferentes temperaturas y déficit hídrico.*
- **Cuadro 5.-** *Potencial hídrico, concentraciones de prolina y azúcares solubles, en plantas con Exceso de flujo fotónico.*
- **Cuadro 6.-** *Potencial hídrico, concentraciones de prolina y azúcares solubles, en plantas con déficit hídrico a largo plazo.*
- **Cuadro 7.-** *Concentración de prolina en plantas con déficit hídrico y temperatura elevada.*
- **Cuadro 8.-** *Concentración de azúcares solubles en plantas con déficit hídrico y temperatura elevada.*
- **Cuadro 9.-** *Potencial hídrico en plantas con déficit hídrico y temperatura elevada.*



RESUMEN

El ajuste osmótico en plantas es una respuesta al estrés ambiental que consiste en la disminución del potencial hídrico mediado por la biosíntesis de solutos orgánicos (osmolitos). Estos compuestos ayudan a reducir la pérdida de agua, pueden ser azúcares, polioles, aminoácidos y compuestos cuaternarios de amonio. *Echeveria laui* es una crasulácea endémica de Oaxaca, México. Crece en cañadas, con suelos rocosos, poco profundos y susceptibles a la erosión, donde el agua es un recurso limitado. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes factores ambientales (luz, temperatura y déficit hídrico) en la acumulación de osmolitos. En el laboratorio, un grupo de plantas fue sometido a un estrés por luz ($483.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), temperatura ($44 \text{ }^\circ\text{C}$) y a un déficit hídrico, éstas plantas se colocaron dentro de una cámara de crecimiento bajo condiciones de luz y temperatura controladas. La respuesta osmótica fue evaluada en diferentes tiempos midiendo el potencial hídrico y la acumulación de los osmolitos en hojas: azúcares solubles y prolina. Por otro lado, se colocó un grupo de plantas *in situ* (Cuicatlán, Oaxaca) fuera del invernadero, en sombra y sin riego por 30 días, posteriormente fueron distribuidas en diferentes sitios: a cielo abierto, bajo sombra e invernadero, por cuatro meses. Cada grupo constaba de dos tratamientos, uno con riego cada tercer día y otro que no fue regado durante los cuatro meses. Los resultados de los tratamientos en condiciones controladas mostraron que la irradiación y el déficit hídrico no promovieron un ajuste osmótico a lo largo de 20 días, mientras que, el incremento en la temperatura ocasionó un gran deterioro físico, que en algunos casos condujo a la muerte y una acumulación significativa de prolina y azúcares solubles. Sin embargo, la planta no sintetizó osmolitos como respuesta ante el estrés a corto plazo (55 h). Las plantas que permanecieron durante cinco meses sin riego y a cielo abierto en Cuicatlán Oax., mostraron diferencias significativas en las concentraciones de prolina y azúcares solubles, así como una disminución significativa en el potencial hídrico (-0.41 MPa) respecto a las plantas que habían tenido riego cada tercer día (-0.27 MPa). Cuando las plantas que permanecieron a cielo abierto y sin riego fueron trasladadas al Estado de México y se colocaron a $44 \text{ }^\circ\text{C}$, las plantas mostraron tolerancia a esta temperatura manteniendo su potencial hídrico sin cambios, sugiriendo que las constantes fluctuaciones en la humedad relativa en campo (*in situ*), estimularon la acumulación de azúcares solubles en pequeñas cantidades, preparando a la planta para poder tolerar condiciones más severas. Los resultados de éste estudio muestran que *E. laui* es una planta tolerante a la sequía, pero susceptible a las temperaturas elevadas, si no tiene un proceso de aclimatación previo.



ABSTRACT

In plants, osmotic adjustment is a response to environmental stress consisting of a decrease in water potential, mediated by the biosynthesis of organic solutes (osmolytes). These compounds help to reduce water loss; they can be sugars, polyols, amino acids and quaternary ammonium compounds. *Echeveria laui* is a Crassulaceae endemic to Oaxaca, Mexico. It grows in ravines, with rocky and shallow soils, and is susceptible to erosion, where water is a limited resource. The aim of this study was to evaluate the effect of different environmental factors (light, temperature and water deficit) in the osmolytes accumulation. A group of plants was subjected to light ($483.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), temperature (44°C) and water deficit stress, they were placed in a growth chamber with controlled conditions of light and temperature at the laboratory. Osmotic response was evaluated at different times by measuring water potential and osmolytes accumulation in leaves: soluble sugars and proline. Also, an *in situ* group of plants were placed outside a greenhouse (Cuicatlán, Oaxaca), under shade and with no water for 30 days, and then the plants of this group were distributed in different places, open sky, shade or greenhouse, for four months. Each group consisted of two treatments, one that was watered every third day and another that was not watered during four months. The results of the treatments under controlled conditions showed that irradiation and water deficit did not promote an osmotic adjustment over 20 days, while the temperature increase caused a big physical deterioration, which in some cases led to death and a significant accumulation of proline and soluble sugars. Nonetheless osmolytes were not synthesized by the plant as a response to short-term stress (55 hrs). Plants that stayed for five months at open sky and without irrigation at Cuicatlán, Oaxaca, showed significant differences in proline and soluble sugars concentration, as well as a significant decrease on water potential (-0.41 MPa) compared to plants which were watered every third day (-0.27 MPa). When this group of plants was transferred to the state of Mexico and placed at 44°C , they didn't change their water potential showing tolerance at this temperature, suggesting that constant fluctuations of relative humidity in field (*in situ*), stimulated soluble sugars accumulation at low quantities, preparing the plant to tolerate more severe conditions. Our results show that *E. laui* is a drought-tolerant plant, but susceptible to high temperatures, unless it has prior acclimatization process.



INTRODUCCIÓN

Aunque el término “estrés”, es a menudo utilizado subjetivamente y con varios significados. La definición fisiológica de estrés ambiental en plantas se refiere a “cualquier cambio en las condiciones de crecimiento, que altera o interrumpe su homeostasis metabólica” (Bosco, *et al.*, 2013).

Algunas especies de plantas tienen una amplia distribución en el planeta y pueden llegar a ser susceptibles a las sequías, por ejemplo *Pinus edulis* y *Juniperus monosperma*, aun cuando llegan a conformar bosques ubicados en zonas consideradas semiáridas, tienen poca tolerancia al déficit hídrico (Borland, *et al.* 2015; Stimson, *et al.* 2005), a diferencia de algunas plantas que fueron moldeadas por ambientes áridos, como las suculentas *Kalanchoe daigremontiana*, *K. fedtschenkoi* cv. *marginata*, *K. tomentosa* y *Cotyledon ladismithiensis*, que muestran un amplio margen de tolerancia a largos periodos de sequía (Rózsavölgyi, *et al.*, 2005). En estos ambientes extremos, las plantas están expuestas a una gran variedad de factores que limitan su desarrollo, crecimiento y reproducción (Cramer, *et al.*, 2011; Yoshida, *et al.*, 1997). Estas plantas presentan mecanismos que les permiten tolerar y reducir los daños ocasionados por factores ambientales (por ejemplo: disminución de área foliar, cambio en la orientación de las hojas, alteraciones en la composición lipídica de la membrana, síntesis de ceras, flavonoides, acumulación de poliaminas o alcaloides específicos, ajuste osmótico, entre otros), contribuyendo a su sobrevivencia (Teriz y Kadiolglu, 2006; Cushman, 2001; Zhu, 2001; Hare *et al.*, 1998; Furini *et al.*, 1994; Boyer, 1970).

Actualmente la escasez de agua, no es un evento exclusivo de zonas áridas, cada vez es más recurrente en nuestro planeta y existe una gran variedad de factores que pueden desencadenarlo, por ejemplo puede resultar de bajas precipitaciones, baja capacidad de retención de agua por el suelo, excesiva salinidad, temperaturas extremas (frías o calientes), alta irradiación solar, baja presión de vapor atmosférico o una combinación de estos factores (Taiz y Zinger, 2010; Nilsen y Orcutt, 1996), junto con la irradiación solar, pueden alcanzar niveles limitantes para la sobrevivencia de las plantas cuando se presentan por periodos prolongados. Por ejemplo, en *Rosularia elmytica*, *Sedum stoloniferum* y *Portulaca oleracea*



las altas irradiaciones y el déficit hídrico, promueven un incremento en la actividad antioxidante, cuando el estrés se prolonga por 20 días, esta actividad disminuye y la acumulación de especies reactivas de oxígeno aumenta, generando un estrés oxidativo. Por otro lado, el déficit hídrico estimula un ajuste osmótico que es detectado por la disminución del potencial hídrico de sus hojas (Habibi, *et al.* 2011).

Muchas plantas biosintetizan solutos orgánicos de bajo peso molecular conocidos como osmolitos; los cuales pueden ser azúcares, polioles, aminoácidos y compuestos cuaternarios de amonio (Burg y Ferraris, 2008, Hare *et al.*, 1998; Yoshida, *et al.*, 1997), lo que les permite realizar un ajuste osmótico interno, el cual repercute en la disminución del potencial hídrico en los tejidos por efecto de los osmolitos sintetizados reduciendo así la pérdida de agua (Redondo-Gómez, 2013; Buchanan *et al.*, 2000). Entre estos osmolitos se encuentran los azúcares solubles, que funcionan como osmoprotectores disminuyendo la pérdida de turgencia y jugando un papel central en la protección ante el estrés ambiental a través de la producción de energía, conservando las interacciones hidrofílicas en membranas y proteínas, evitando su desnaturalización (Mohammadkhani y Heidari, 2008; Finkelstein y Gibson, 2001; Buchanan *et al.*, 2000; Leopold, *et al.*, 1994; Voetberg y Sharp, 1991). La prolina es otro osmolito cuya acumulación en tejidos vegetales es un marcador de estrés ambiental, particularmente para déficit hídrico (Mahalingam, 2015; Boscaiu, 2013; Routley, 1966), su papel como osmoprotector, se debe a las características hidrofílicas que le permiten estabilizar macromoléculas, almacenar nitrógeno para usarlo después del déficit hídrico, así como inducir la expresión de genes importantes para la tolerancia al estrés (Trovato, *et al.*, 2008; Smirnov y Maggio, *et al.*, 2002; Samaras, *et al.* 1995; Stewart, 1985).

Las plantas con Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (MAC), tienen características fisiológicas que les permiten sobrevivir en ambientes áridos y tolerar prolongados periodos sin humedad disponible en el suelo, manteniendo su metabolismo activo por más de un año en estas condiciones (Cristescu, *et al.*, 2010; Smith y Winter, 1996; Szarek y Ting, 1975).

Echeveria laui, es una crasulácea endémica del estado de Oaxaca, Mex., con metabolismo MAC, que vive en ambientes que favorecen el déficit hídrico, con clima seco, temperaturas superiores a los 45°C e irradiaciones solares por arriba de los 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (DFFF, 400-



700 nm). A esta especie, generalmente se le encuentra en cañadas, con suelos rocosos, poco profundos y susceptibles a la erosión, donde el agua es un recurso limitado (Reyes-Santiago, *et al.*, 2004). Es posible que estas condiciones, promuevan en *E. laui* la expresión de mecanismos, que incrementen sus probabilidades de sobrevivencia (Piña-Poujol *et al.*, 2007) y es importante conocerlos, para considerarlos en programas que pretendan favorecer la conservación de este recurso vegetal. Lo que nos lleva a preguntarnos, ¿Cuáles son estos mecanismos de tolerancia? y ¿*E. laui* invertirá parte de sus recursos para realizar un ajuste osmótico, frente a los diferentes factores de estrés (luz, temperatura y déficit hídrico)?

HIPOTESIS

El ajuste osmótico en *E. laui* es fundamental para la tolerancia y sobrevivencia a largos periodos de déficit hídrico.

OBJETIVOS

General

- Determinar si la exposición de *E. laui* a factores ambientales estresantes, promueve un ajuste osmótico.

Particulares

En condiciones de laboratorio:

- Evaluar el potencial hídrico, la concentración de prolina y azúcares solubles en hojas de *E. laui* como respuesta fisiológica bajo estrés hídrico, térmico y luminoso.

En el campo

- Evaluar la respuesta *in situ* de *E. laui* al estrés abiótico (hídrico, térmico y luminoso), midiendo el potencial hídrico, las concentraciones de prolina y azúcares solubles.



ANTECEDENTES

La información relacionada con el ajuste osmótico en crasuláceas es escasa, sin embargo existen numerosos estudios en plantas superiores, donde muestran que el contenido de algunos osmolitos como prolina, pueden incrementarse rápidamente como respuesta al estrés; por ejemplo, en *Oryza sativa* la concentración de prolina incrementó rápidamente en las primeras cinco horas bajo estrés hídrico (Choudhary, *et al.*, 2005). El mismo efecto se observó en plantas de *Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis thaliana*, acumulando diez veces más prolina respecto a las plantas irrigadas (Yoshida, *et al.*, 1997). Además se ha reportado que la acumulación de este osmolito, está acompañado de un incremento en la concentración de azúcares solubles, como se ha observado en plantas de *Lycopersicon esculentum* después de un estrés osmótico por 24 horas (Polavarapu, *et al.*, 2014). En *Phaseolus vulgaris* después de ocho días de estrés hídrico, los cambios en el estado de activación de sacarosa fosfato sintasa pueden desempeñar un papel fisiológico relevante en plantas bajo estrés, incrementando el suministro de sacarosa para la regulación osmótica, estos cambios pueden ser más evidentes al prolongarse la duración del estrés. Aunque estos carbohidratos pueden aumentar y llegar a duplicar los niveles basales en hojas y tallo, siempre y cuando hayan sido sometidas a un proceso de aclimatación (Fu, *et al.*, 2010; Castillo, *et al.*, 1992).

Además del déficit hídrico, la temperatura y la irradiación son otros factores que pueden causar daños en las plantas, principalmente en el aparato fotosintético y todo lo relacionado con él, como la apertura estomática, el cambio de metabolismo de C_3 a MAC en el caso de plantas facultativas e incluso pueden afectar el balance entre la fijación de CO_2 y la acumulación de ácidos orgánicos. Algunas plantas con metabolismo MAC como *Hylocereus undatus*, *Kalanchoë pinnata* y *Ananas comosus* tienen un estrecho margen de tolerancia a las temperaturas elevadas, el incremento de este factor por periodos prolongados llega a necrosar sus tejidos, como resultado de una acumulación excesiva de especies reactivas de oxígeno y pérdida de agua, además de afectar la absorción neta de CO_2 diario (Lin, *et al.*, 2006; Nobel y De la Barrera, 2002). Por otro lado, se encuentran las plantas suculentas con este mismo metabolismo MAC como *Neobuxbaumia tetetzo*, *Pachycereus weberi*,



Stenocereus stellatus, *Escontria chiotilla* y *Myrtillocactus geometrizans*, que han mostrado algunas estrategias que les permiten tener una ventaja de sobrevivencia ante el estrés, por ejemplo utilizan gran proporción de la luz que absorben para la fotosíntesis, que se traduce en poder reductor, tienen grandes vacuolas y su tamaño define la cantidad de ácidos orgánicos que pueden acumular, además de presentar una mayor acumulación de ácidos orgánicos durante las mañanas, facilitando a mediodía la disponibilidad de grandes cantidades de CO₂ interno para su descarboxilación, características que brindan una ventaja para reducir el riesgo de fotohinibición debido a que estas plantas en los horarios con temperaturas e irradiación más agresivos, pueden depender de sus reservas energéticas para mantenerse metabólicamente activas (Hernández-González y Briones, 2007).

Como se mencionó anteriormente, la capacidad que tienen algunas plantas suculentas para tolerar largos periodos en estrés ha sido poco explorada, sin embargo existen reportes que muestran como el ajuste osmótico se encuentra presente durante estos eventos extremos, por ejemplo en *Sedum album* fue reportado un incremento gradual en el contenido foliar de prolina y betaína después de cinco meses en déficit hídrico (Sayed, *et al.* 1994), por otro lado, *Sedum rubrotinctum* presentó una gran tolerancia a la falta de riego, tras la pérdida gradual de turgencia en un lapso de dos años, y *Opuntia bigelovii* disminuyó el potencial hídrico, duplicando la acumulación de ácidos orgánicos en su tejido foliar, después de 3 años de mantenerla suspendida en el aire, sin tener contacto con el suelo (Teeri, *et al.*, 1986).

En el caso específico de la especie que compete a este trabajo, Piña-Poujol *et al.* (2007) sugieren que *E. laui* además de presentar un metabolismo MAC, puede ser una especie tolerante al estrés, presenta crecimiento lento y baja asimilación de nutrientes durante su desarrollo en un ambiente árido. Su metabolismo fotosintético puede ser afectado por la temperatura, particularmente en Q_A, uno de los componentes de la cadena transportadora de electrones, alterando su estado redox y se ha propuesto que la prolina podría actuar como donador alternativo de electrones y mantener el flujo cuando la temperatura ambiental aumenta (Reyero, 2014).



METODOLOGÍA

Características generales del trabajo

Material biológico

Las plantas de *E. laui* utilizadas en este trabajo fueron donadas por el Vivero “La Iberia”, perteneciente a la Fundación para la Reserva de la Biosfera, Cuicatlán, A. C., localizado en la Iberia s/n, San Juan Bautista, Cuicatlán, Oaxaca, con registro UMA: MX/VIV-CO-218-OAX/05.

La selección de las plantas se realizó con los siguientes criterios: haber florecido por lo menos una vez en su vida y presentar un diámetro de 12.7 ± 1.9 cm. Las plantas estaban en macetas de 6” y como sustrato se utilizó tierra proveniente del sitio de origen (el cual presenta suelos de tipo feozem háplico) mezclada con tepojal en proporción 1:1. En la figura 1 se muestra el esquema general que se siguió para el desarrollo de este trabajo.

Fotoperiodo

En los experimentos donde se controlaron las condiciones ambientales, se utilizó un fotoperiodo de 12/12 (luz/obscuridad). Las 12 h correspondientes al periodo luminoso fueron divididas en ciclos de $190/334/190 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por periodos de 2/8/2 h respectivamente, esto con el fin de simular el fotoperiodo registrado en el vivero “La Iberia”. Los valores en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, representan densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) en una longitud de onda de 400 - 700 nm.

Procedimientos para las determinaciones

En todos los casos las pruebas realizadas en condiciones controladas, el primer muestreo siempre se realizó antes de introducir las plantas a la cámara de crecimiento.



- *Cuantificación de prolina por espectrometría*

Se utilizó el método descrito por Bates *et al.* (1973). Se maceró 1 g de hoja en 1.5 mL de ácido sulfosalicílico (3 %), centrifugando por 4 min a 3500 rpm. Se tomó 1 mL del sobrenadante, se le agregó 1 mL de ninhidrina ácida (15 mL Ac. Acético glacial (100 %) + 10 mL Ac. Fosfórico (6 M) + 625 mg Ninhidrina), 1 mL de ácido acético glacial (100 %), y fue agitado vigorosamente, cubriendo con aluminio el tubo para incubarlo en baño María por 60 min, cuidando que el agua cubriera el nivel de la muestra, después, los tubos se colocaron en agua helada para enfriarlos rápidamente. Se les añadió 2 mL de Tolueno (100 %; Baker, ACS) y se procedió a agitarlos vigorosamente hasta que la muestra adquirió una apariencia lechosa. Finalmente se dejó reposar hasta que se visualizaron dos fases y se leyó la fase superior a 520 nm (Perkin Elmer, Lambda 2 UV/VIS, Überlingen, Alemania), la curva patrón se construyó con concentraciones de prolina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$; Aldrich) de 0 a $8 \mu\text{g mL}^{-1}$, siguiendo el mismo procedimiento que se realizó a las muestras.

- *Cuantificación de prolina por HPLC*

Para realizar el análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se siguió la metodología de acuerdo a como lo reporta Vélez (2007), dividiendo el proceso en dos etapas de la forma siguiente:

1. *Extracción y derivatización de prolina con 9-fluorenilmetil-cloroformato (FMOC-Cl)*

La prolina de las muestras que fueron analizadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), fue extraída de acuerdo al método descrito por Näsholm *et al.* (1987). Macerando 1 g de hoja en 3 mL de alcohol etílico al 80 %, seguido de centrifugación a 14000 rpm durante 5 min. La derivatización de prolina con FMOC-Cl se realizó de acuerdo al método de Sultana *et al.* (2001), recuperando 100 μl del sobrenadante y agregándole 100 μL de buffer de borato de potasio (0.8 M, pH 10), agitados en vórtex por 1 min y agregando 200 μL de FMOC-Cl (10 mM en acetonitrilo), seguido de agitación por 1 min en vórtex. Finalmente se realizaron dos lavados en agitación con vórtex por 1 min cada uno, con 500 μL de heptano (100 %), descartando la fase superior en cada caso.



2. Separación y cuantificación de Prolina-FMOC por HPLC-Fluorómetro

El sistema de HPLC (Agilent serie 1100, California, EUA) fue equipado con un inyector manual (Agilent) con un loop de 20 μL , un degasificador de solventes en línea (Agilent), una bomba (Agilent) y un fluorómetro (Perkin Elmer, Überlingen, Alemania). El análisis cromatográfico se realizó siguiendo el método utilizado por Vélez (2007), que contiene algunas modificaciones del método descrito por López-Galindo *et al.* (2003).

Las condiciones de la cromatografía fueron, fase móvil A: fosfato de amonio 30 mM (pH 6.5) en metanol:agua 15:85 (v/v); fase móvil B: metanol:agua 15:85 (v/v); fase móvil C: acetonitrilo:agua 90:10 (v/v); flujo constante de 1.2 mL min^{-1} , la columna (Allsphere ODS-15u; 4.6 mm x 250 mm) se mantuvo a temperatura ambiente. La detección por fluorescencia se realizó con longitudes de onda de excitación y de emisión de 263 y 611 nm respectivamente. El programa de gradiente utilizado para la separación de Prolina-FMOC fue de 16.5, 69, 14.5 % de fase móvil A, B y C respectivamente.

- *Determinación de azúcares solubles*

La prueba para carbohidratos solubles fue realizada siguiendo el método descrito por Dubois *et al.* (1956) de fenol-ácido sulfúrico, macerando 1 g de tejido en 1 mL de agua destilada (este extracto fue diluido en una proporción 1:100). En 250 μL de la dilución fueron mezclados 250 μL de Fenol al 5 % agitando levemente. Finalmente se añadió 1.25 mL de ácido sulfúrico (96%), se mezcló y se dejó reposar por 30 min para su posterior lectura a 485 nm. Como patrón se utilizó glucosa ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) de 0 a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

- *Potencial hídrico*

Para estimar el potencial hídrico se utilizó una gota de sabia, la cual se obtuvo presionando levemente con los dedos un fragmento de hoja, se colocó en un refractómetro (Huake Instrument Co., Ltd, RHB-32 ATC, Shenzhen, China) para su lectura, también se realizó una curva patrón construida con concentraciones molales conocidas de sacarosa (0 - 0.6) con



base en °Bx. Finalmente el valor fue calculado con ayuda de la ecuación de Van't Hoff (Arriaga, *et al.*, 2013):

$$\Psi = - R T C i$$

Dónde: Ψ = Potencial hídrico.

R = Constante ideal de los gases ($0.0083143 \text{ Kg MPa (Mol}\cdot\text{K)}^{-1}$).

T = Temperatura en grados Kelvin ($^{\circ}\text{C} + 273$).

C = Concentración molal de la solución.

i = Coeficiente de disociación (*Sacarosa* = 1).

- *Curva de saturación rápida por luz.*

La curva fue construida con los datos obtenidos con un fluorómetro (Hansatech, FMS 2, Norfolk, Inglaterra), por medio de fluorescencia modulada, incrementando gradualmente el flujo de fotones. Utilizando el programa Origin 3.0, fue calculada la velocidad de saturación de los centros de reacción ($V = ETRr_{MAX} X (K+X)^{-1}$), donde:

V = Velocidad de saturación de los centros de reacción.

$ETRr_{MAX}$ = Tasa máxima relativa de transporte de electrones.

X = Flujo de Fotones.

K = Flujo de fotones al cual la tasa relativa de transporte de electrones, es la mitad de la máxima capacidad fotosintética.

También se calculó la pendiente (b), aplicando una regresión lineal simple ($y = b \cdot x + a$), para poder calcular la radiación mínima de saturación (E_k), la cual fue calculada dividiendo la tasa máxima relativa de transporte de electrones y la pendiente de los centros de reacción antes de saturarse ($E_k = ETRr_{MAX} b^{-1}$).



Ensayo

Respuesta al estrés de corto plazo en condiciones controladas: Déficit hídrico y temperatura elevada.

Las plantas a lo largo de su desarrollo en el vivero “La Iberia”, fueron regadas cada tercer día, posteriormente fueron trasladadas al laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, de la Unidad de Morfología y Función, FES-Iztacala, UNAM (Edo. Méx.) y se trasplantaron en macetas de 6 pulgadas, con un sustrato de las mismas características, pero secado al aire libre por una semana a temperatura ambiente.

Con el fin de observar la dinámica que tenía la respuesta osmótica ante el estrés a corto plazo y los cambios de irradiación durante el día, se realizó un ensayo con tres repeticiones, colocando 6 plantas en una cámara de crecimiento marca “Environmental Growth Chambers”, Modelo GCW8-1 (Chagrin Falls, Ohio, EUA) programada a 44 ± 1 °C. La humedad relativa osciló de 9.6 - 42.5 % (Min – Max) debido a que no fue posible controlar este parámetro, se registró con un datalogger (Extech instruments, RHT10, New Hampshire, EUA). La concentración de prolina se determinó con el método descrito por Bates *et al.* (1973), los azúcares solubles siguiendo el método de Fenol-Ácido Sulfúrico descrito en Dubois *et al.* (1956) y el potencial hídrico se estimó como se indicó anteriormente en el apartado con el mismo nombre. Las pruebas se realizaron antes de ingresar las plantas en la cámara de crecimiento y en las diferentes fracciones del periodo luminoso establecido, correspondiente a $190 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (una hora después de iniciar el periodo luminoso) y $334 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2 y 7 h después de iniciar el periodo luminoso), a lo largo de 55 h, quedando los muestreos a las 0, 24, 26, 31, 48, 50 y 55 h. Durante este tiempo a las plantas no se les suministró riego. Los datos fueron analizados de forma descriptiva.



Experimentos

1. Respuesta al estrés de largo plazo en condiciones controladas: Déficit hídrico y temperatura elevada.

Con el fin de evaluar el efecto de la falta de agua y la temperatura, durante lapsos prolongados de tiempo, en el ajuste osmótico, se evaluaron a lo largo de 20 días (0, 4, 8, 12, 16 y 20 días) tres factores (temperatura, riego y tiempo), formando tres tratamientos con temperatura constante (24, 34 y 44 °C) y dos de riego (déficit hídrico e irrigación), en este último caso el sustrato fue secado al aire libre por una semana a temperatura ambiente y permaneció sin riego en el transcurso del experimento, así mismo las plantas del otro grupo tuvieron riego a saturación cada tercer día. Para llevar a cabo este experimento se ocuparon 60 plantas. En todos los tratamientos la humedad relativa fue de 48.7 - 68.3 % (Min - Max) y se obtuvo el potencial hídrico ($^{\circ}\text{Bx}$), la concentración de azúcares solubles (Dubois *et al.*, 1956) y de la prolina (Bates *et al.*, 1973) después de 6 horas de iniciar el periodo luminoso establecido ($n = 10$). Los datos se evaluaron con un análisis de varianza de dos factores con un $\alpha \leq 0.05$.

2. Respuesta al estrés de largo plazo en condiciones controladas: Exceso de flujo fotónico.

Para evaluar si un exceso de luz inducía un ajuste osmótico en *E. laui*, fue necesario obtener una curva de saturación rápida por luz ($n = 10$) y así determinar la radiación mínima de saturación (E_k), para establecer la irradiación que representaría un exceso de flujo fotónico a 24°C.

La fluorescencia modulada permite realizar curvas de saturación rápida por luz, a través de pulsos luminosos controlados, que permiten observar la saturación de los fotosistemas a medida que la luz aumenta, de tal manera que se puede determinar el momento en el cual, la intensidad de luz provoca estrés. En *E. laui*, esta curva se obtuvo con un fluorómetro (Hansatech, FMS 2, Norfolk, Inglaterra). Las plantas fueron expuestas a 11 flujos fotónicos



diferentes, el protocolo consistió en un primer pulso luminoso para inducir fluorescencia sin promover la fotosíntesis ($0.15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), el siguiente pulso estimuló la actividad fotosintética y fue útil para cerrar todos los centros de reacción ($> 10,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), estos dos pulsos tuvieron una duración de 0.7 seg. El siguiente pulso es conocido como luz actínica y fue usado para inducir la fotosíntesis en un rango de $17 - 721 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la duración fue de 30 seg por cada intensidad, seguido de 5 seg en oscuridad y un pulso saturante (Ralph, *et al.* 2005).

Una vez calculada la E_k , se formaron tres tratamientos con flujos fotónicos diferentes, seleccionado uno por arriba del E_k y dos por abajo de este valor, permitiendo evaluar por 20 días dos factores (Flujo fotónico y tiempo), con un total de 30 plantas, las cuales fueron colocadas en una cámara de crecimiento a 24°C , con los flujos fotónicos seleccionados. La humedad relativa osciló de $44.1 - 63.1 \%$ (Min - Max) y el riego a saturación se realizó cada tercer día durante 20 días, en cada grupo se estimó el potencial hídrico de las hojas por refractometría ($^\circ\text{Bx}$, $n = 10$) y se determinó la concentración de azúcares solubles por espectrometría de acuerdo con el método descrito por Dubois *et al.* (1956, $n = 10$). La determinación de prolina se realizó por HPLC con la metodología utilizada por Vélez (2007, $n = 4$). Los muestreos se realizaron cada cuatro días a lo largo de 20 días, después de 6 horas de iniciar el periodo luminoso establecido y a los datos se les aplicó un análisis de varianza de dos factores ($\alpha \leq 0.05$).

3. Respuesta al estrés de largo plazo en condiciones in situ: Riego, temperatura y luz.

Para analizar el ajuste osmótico de *E. laui* ante el estrés ambiental impuesto durante la temporada de secas, las plantas fueron colocadas fuera del invernadero de “La Iberia” en Cuicatlán, Oax. y mantenidas sin riego durante 30 días, con sombra durante la mañana y en las últimas horas de la tarde. Una vez transcurrido este tiempo se colocaron en diferentes condiciones ambientales por cuatro meses, con el fin de evaluar dos factores (riego y lugar de crecimiento), para ello se colocó un grupo expuesto a cielo abierto (**A**: $915 - >2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $19.5 - 40.1^\circ\text{C}$), otro denominado como “**B**”, el cual permaneció en una irradiación de



20 - 42 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y temperaturas de 17.1 - 33.1 °C y un grupo más permaneció dentro del invernadero (**IN**: 15 - 92 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 14.4 - 38.4 °C). Los grupos de cada condición fueron divididos en dos, **R**: irrigados cada tercer día a saturación y **S**: sin riego durante todo el experimento, quedando un total de cinco tratamientos con 24 plantas cada uno.

Transcurridos cuatro meses, se tomó una hoja por planta para determinar la concentración de prolina por HPLC (Vélez, 2007, n = 4). Los azúcares solubles fueron cuantificados por espectrometría (Dubois *et al.*, 1956, n = 3) y el potencial hídrico fue estimado con base a °Bx por refractometría (n = 3). Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza de dos factores ($\alpha \leq 0.05$).

4. Respuesta al estrés de corto plazo en condiciones controladas con plantas que fueron sometidas a estrés abiótico in situ: Déficit hídrico y temperatura elevada.

Concluidos los cuatro meses del tratamiento anterior, las plantas (**AR, AS, BR, BS, INR y INS**) fueron trasladadas al invernadero del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, FES-Iztacala, UNAM (Edo. Méx.). Con el fin de evaluar el efecto de dos factores (riego y tiempo), en los tratamientos antes descritos (**IN, B y A**), respecto a la respuesta osmótica en condiciones controladas, los grupos **R** y **S** fueron mantenidos en las mismas condiciones de riego que tuvieron en “La Iberia” los últimos 5 meses. Las plantas permanecieron 15 días en el invernadero, la temperatura osciló entre 14.5 - 35.9 °C y la irradiación entre 5.2 - 329.1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Transcurridos los 15 días, las plantas fueron colocadas en una cámara de crecimiento con una temperatura de 44 ± 1 °C y humedad relativa de 28 - 61.8 % (Min - Max), manteniendo las condiciones de riego (**R** y **S**). La estimación del potencial hídrico (°Bx) y la determinación de la concentración de prolina (Bates *et al.*, 1973) y azúcares solubles (Dubois *et al.*, 1956) se realizaron a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h, a los datos se les aplicó un análisis de varianza de dos factores con un $\alpha \leq 0.05$ (n=6).

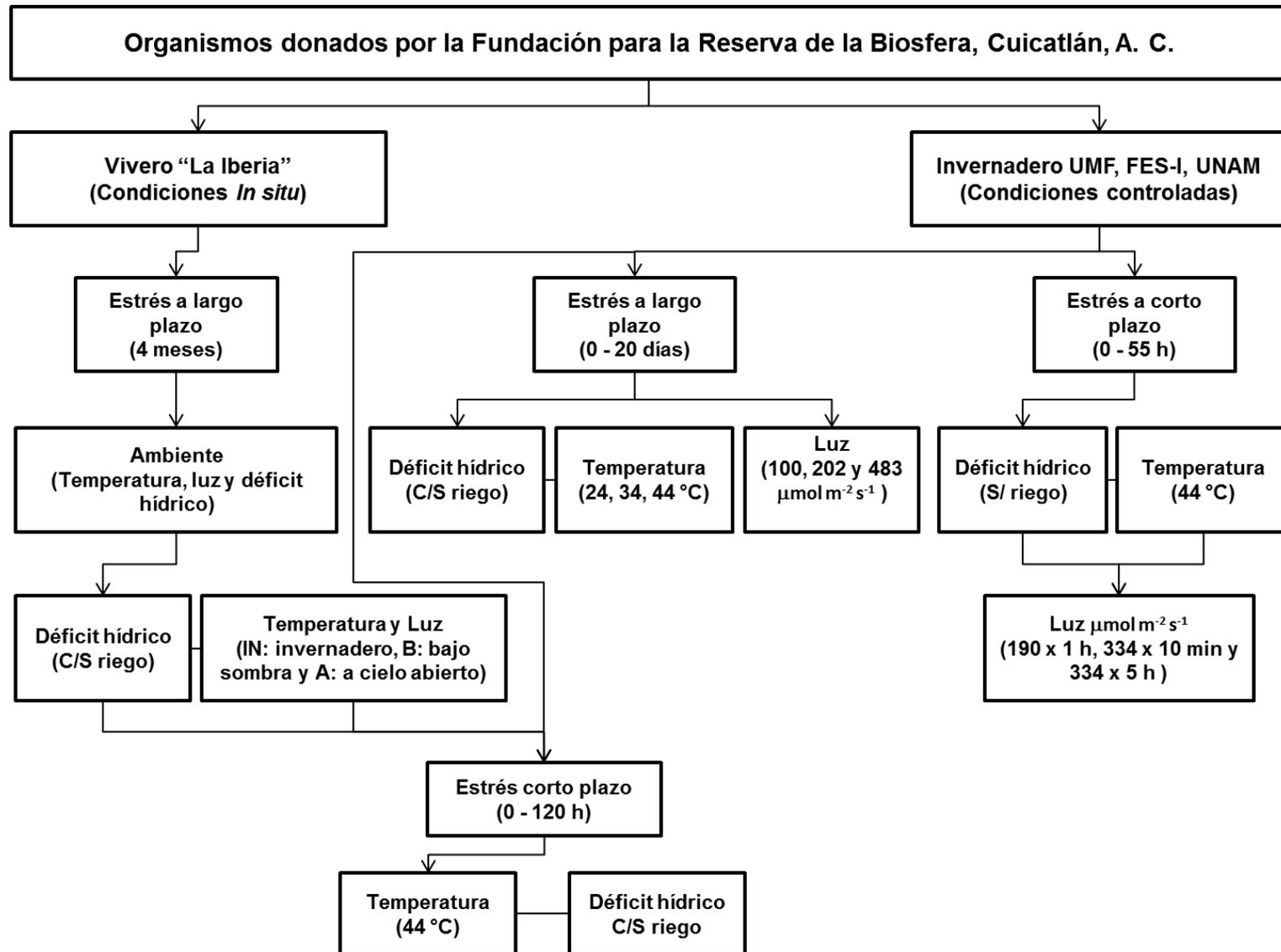


Fig.-1 Esquema general de trabajo



RESULTADOS

Ensayo

Respuesta al estrés de corto plazo en condiciones controladas: Déficit hídrico y temperatura elevada.

Después de 55 h de tratamiento las plantas presentaron pérdida de turgencia y marchitez. La concentración de prolina en los individuos mantenidos a 44°C, incrementó de 53.55 (hora 0) hasta 169.29 $\mu\text{g g}^{-1}$ al finalizar el experimento (55 h). Sin embargo, al igual que en la concentración de azúcares solubles y el potencial hídrico, los errores estándar fueron muy grandes y se solaparon uno con otro lo que muestra que no existen diferencias (Anexo Cuadro 1).

Experimentos

1. Respuesta al estrés de largo plazo en condiciones controladas: Déficit hídrico y temperatura elevada.

Las plantas permanecieron en cámaras con condiciones controladas y en temperaturas de 24, 34, y 44 °C respectivamente, como se describió en materiales y métodos, en cada condición se mantuvo un grupo sin riego y el otro con aporte de agua a saturación.

Prolina.

Las plantas que permanecieron a 24 °C no mostraron diferencias en la concentración de prolina, pero las expuestas a 34 °C incrementaron el contenido de prolina entre el día 0 y 16 tanto en las plantas con riego (5.90 - 18.33 $\mu\text{g g}^{-1}$), como en las sometidas a déficit hídrico (8.68 - 19.02 $\mu\text{g g}^{-1}$; Anexo Cuadro 2), sin embargo no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con y sin riego en esta temperatura. Vale la pena mencionar que las plantas de este grupo desarrollaron una coloración rojiza al cabo del tratamiento. El grupo que



permaneció a 44 °C también desarrolló pigmentación rojiza, estas plantas comenzaron a mostrar un deterioro físico que comprometía su sobrevivencia, por lo que el experimento para este tratamiento se terminó al octavo día (Fig. 2). Los resultados obtenidos durante este lapso mostraron diferencias significativas entre el día 0 y 4 en la acumulación de prolina, así como entre el resto de temperaturas, alcanzando valores de 54.79 $\mu\text{g g}^{-1}$ en plantas con riego y 120.58 $\mu\text{g g}^{-1}$ en las que estuvieron bajo déficit hídrico (Fig. 3).

Azúcares solubles.

Los grupos que permanecieron a 44 °C, no presentaron diferencias significativas en ningún caso, pero en los grupos a 34 °C se mostró un incremento gradual que llegó a ser significativo al final del experimento (Anexo Cuadro 3), en relación al inicio y con respecto al tratamiento a 24 °C tanto en el grupo irrigado, como en el de déficit hídrico (Fig. 4). El tratamiento a 24 °C, sin riego, el día 16 presentó un incremento significativo (45.71 mg g^{-1}) en la concentración de azúcares solubles, con respecto al día 4, este incremento coincidió con la disminución que tuvo la humedad relativa en la cámara (34.3 %) en ese momento.

Potencial hídrico.

En los tratamientos a 44 °C, a pesar del daño en la planta, las hojas que continuaron vivas (centro o ápice) no presentaron modificaciones significativas en el potencial hídrico entre el día 0 y 8 (Anexo Cuadro 4), sin embargo en los tratamientos de 24 y 34 °C se observó una disminución estadísticamente significativa del potencial hídrico entre el día 0 y 20, los tratamientos irrigados y en déficit hídrico no presentaron diferencias significativas entre ellos (Fig. 5).

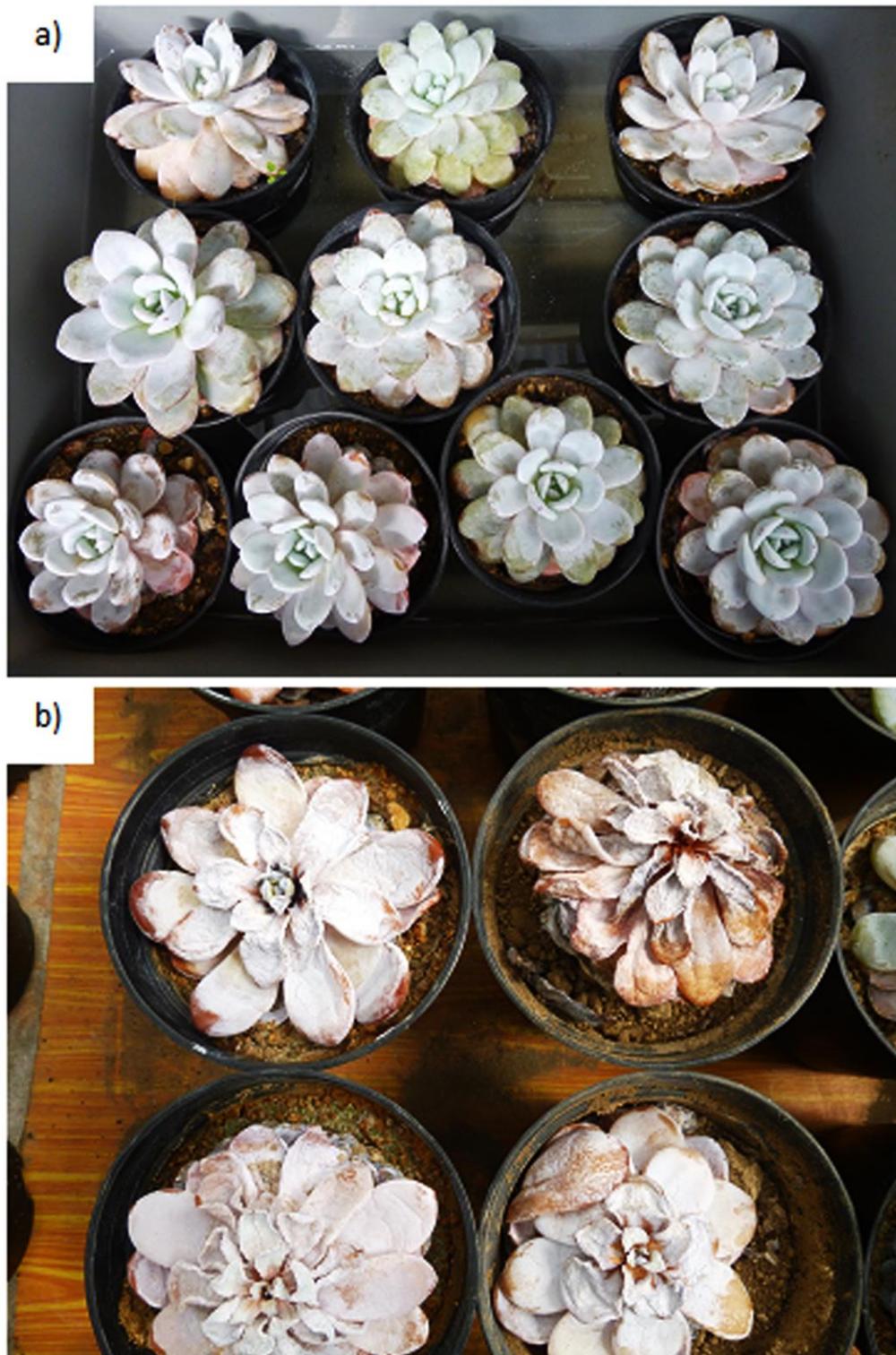


Fig.- 2 Plantas de *E. laui*, sometidas a 44°C con riego. **a)** Antes de introducirlas a la cámara de crecimiento (día 0), **b)** Ocho días después de iniciar el tratamiento.

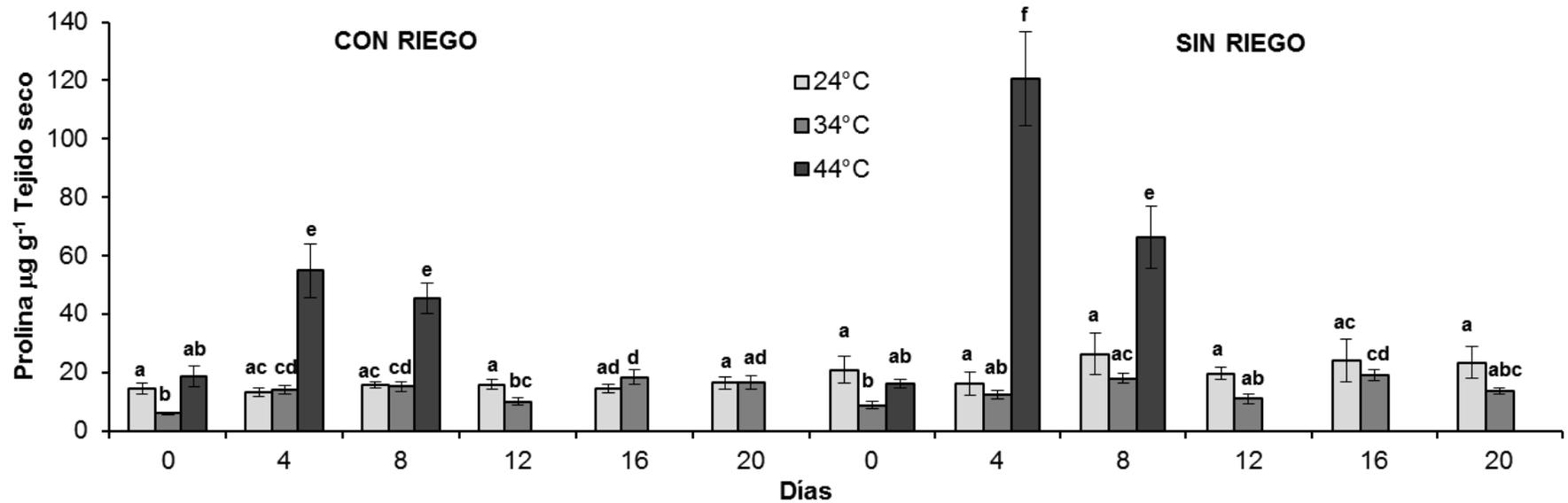


Fig.- 3 Plantas de *E. laui*, sometidas a estrés hídrico y gradiente de temperatura a largo plazo. En cámara de crecimiento con fotoperiodo de 12 h luz con ciclos de 190/334/190 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y humedad relativa de 48.7 - 68.3 %. Letras diferentes representan cambios significativos entre todas las variables (temperatura, riego y tiempo). Medias \pm error estándar (una vez), $n = 10$. Tukey $P < 0.050$.

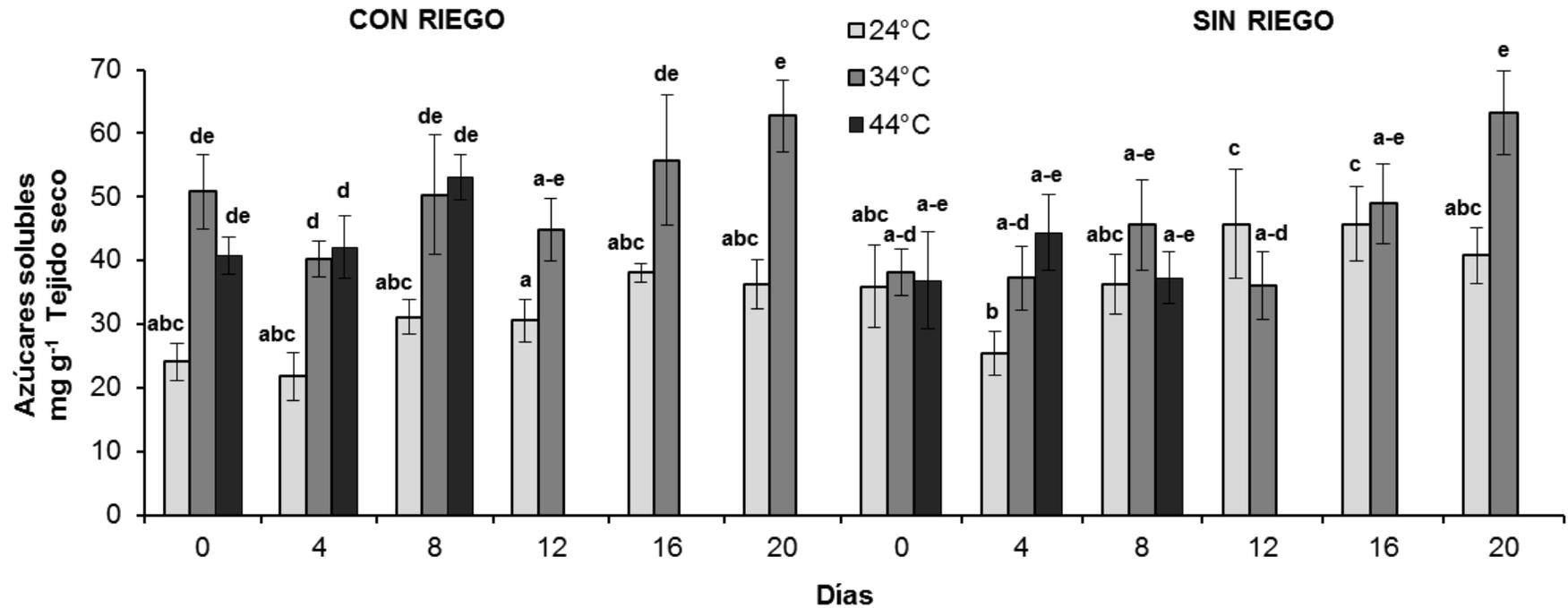


Fig.- 4 Plantas de *E. laui*, sometidas a estrés hídrico y gradiente de temperatura a largo plazo. En cámara de crecimiento con fotoperiodo de 12 h luz con ciclos de 190/334/190 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y humedad relativa de 48.7 - 68.3 %. Letras diferentes representan cambios significativos entre todas las variables (temperatura, riego y tiempo). Medias \pm error estándar (una vez), n = 10. Tukey P < 0.050.

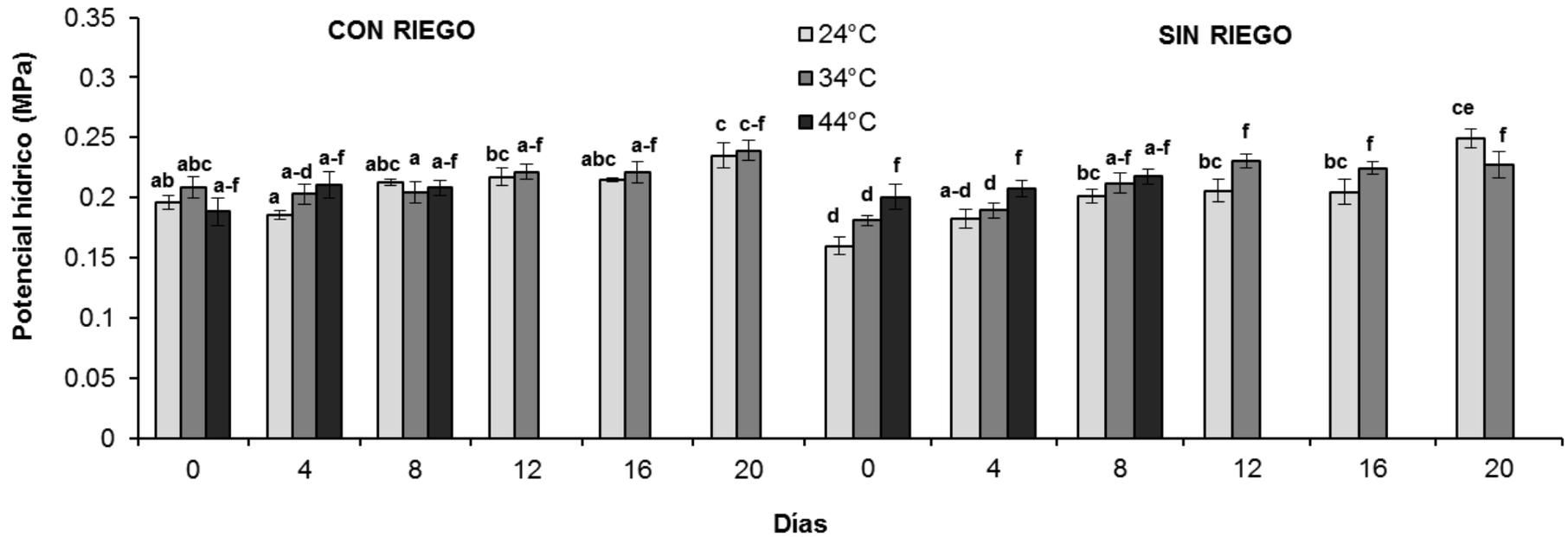


Fig.-5 Plantas de *E. laui*, sometidas a estrés hídrico y gradiente de temperatura a largo plazo. En cámara de crecimiento con fotoperiodo de 12 h luz con ciclos de 190/334/190 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y humedad relativa de 48.7 - 68.3 %. Letras diferentes representan cambios significativos entre todas las variables (temperatura, riego y tiempo). Medias \pm error estándar (una vez), n = 10. Tukey P < 0.050.



2. Respuesta al estrés de largo plazo en condiciones controladas: Exceso de flujo fotónico.

Curva de saturación rápida por luz.

Con la curva de saturación rápida por luz (Fig. 6), fue determinada la radiación mínima de saturación ($E_k = 331.87 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y basados en este valor, fueron seleccionadas tres intensidades de luz, $100.20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (**B**), que representó la región limitante de luz (irradiación sub óptima que limita la fotosíntesis), $202.12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (**M**), con valores de qP (energía fotoquímica o de trabajo) por arriba de qNP (energía no fotoquímica o no aprovechable), cercano a E_k , con un buen transporte de electrones y por último $483.25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (**A**), con saturación en la cadena de transporte de electrones.

Prolina.

Los diferentes flujos de fotones utilizados no modificaron el contenido de prolina significativamente, en ninguno de los tratamientos.

Azúcares solubles.

Cada tratamiento mostró un incremento significativo el día 16, con respecto al día 4 y coincidió con la disminución en la humedad relativa de la cámara (23.2%; Fig. 7).

Potencial hídrico.

No mostró cambios significativos en ninguno de los tratamientos (Anexo Cuadro 5).

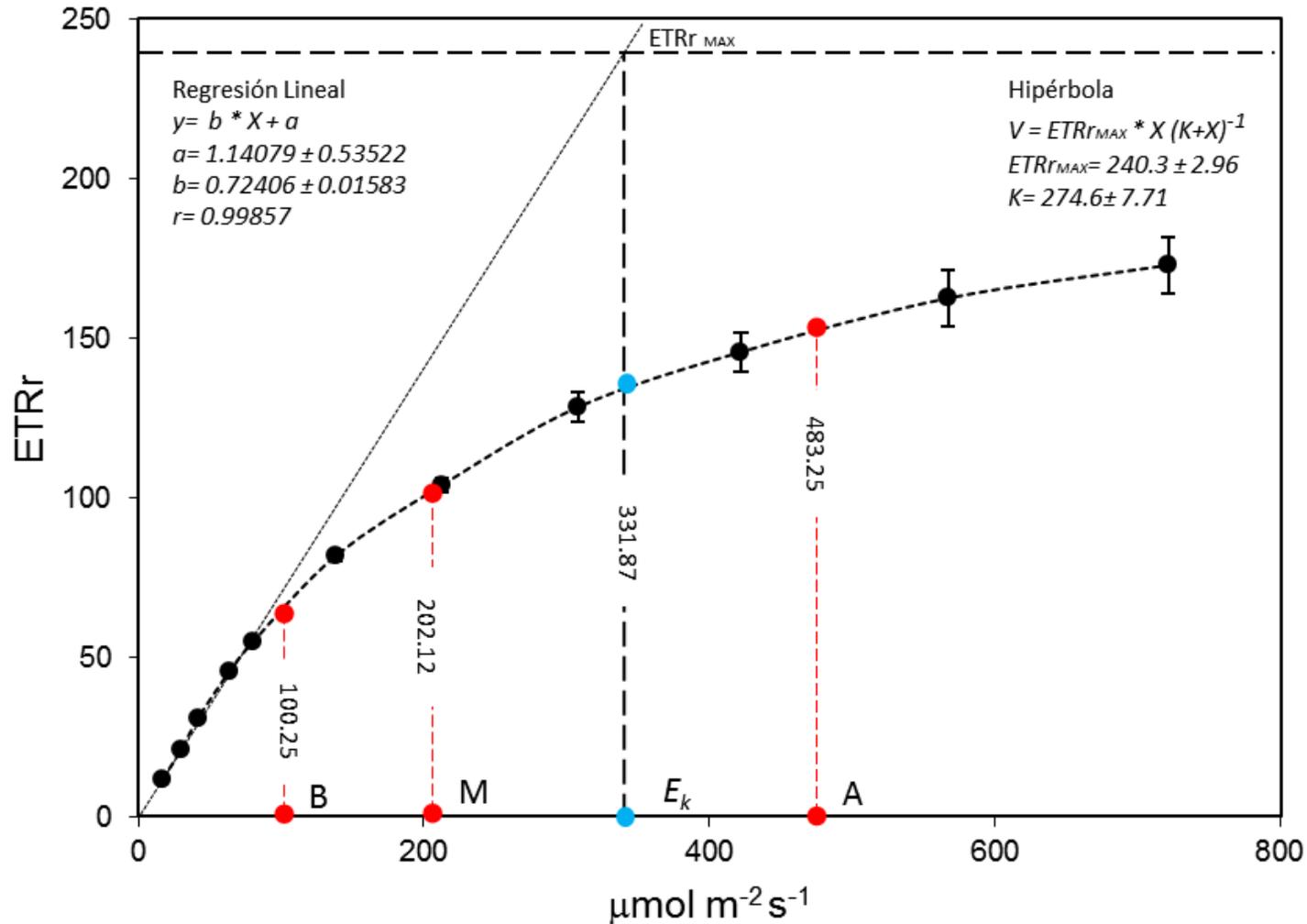


Fig.-6 Curva rápida de saturación por luz en *E. laui* a 24 °C. ETRr: Tasa relativa de transporte de electrones, estimado con la multiplicación del rendimiento cuántico operacional por el flujo de fotones ($\dot{\epsilon}\text{PS2R}$) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Luz: $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. E_k : ($ETRr_{MAX}$) (b^{-1}). Valores en líneas interpoladas en la curva representan intensidad de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), B: intensidad baja, M: intensidad que permite un buen transporte de electrones, E_k : radiación mínima de saturación, A: intensidad de luz que excede la capacidad de aprovechamiento de energía. Medias \pm error estándar (una vez), n = 10.

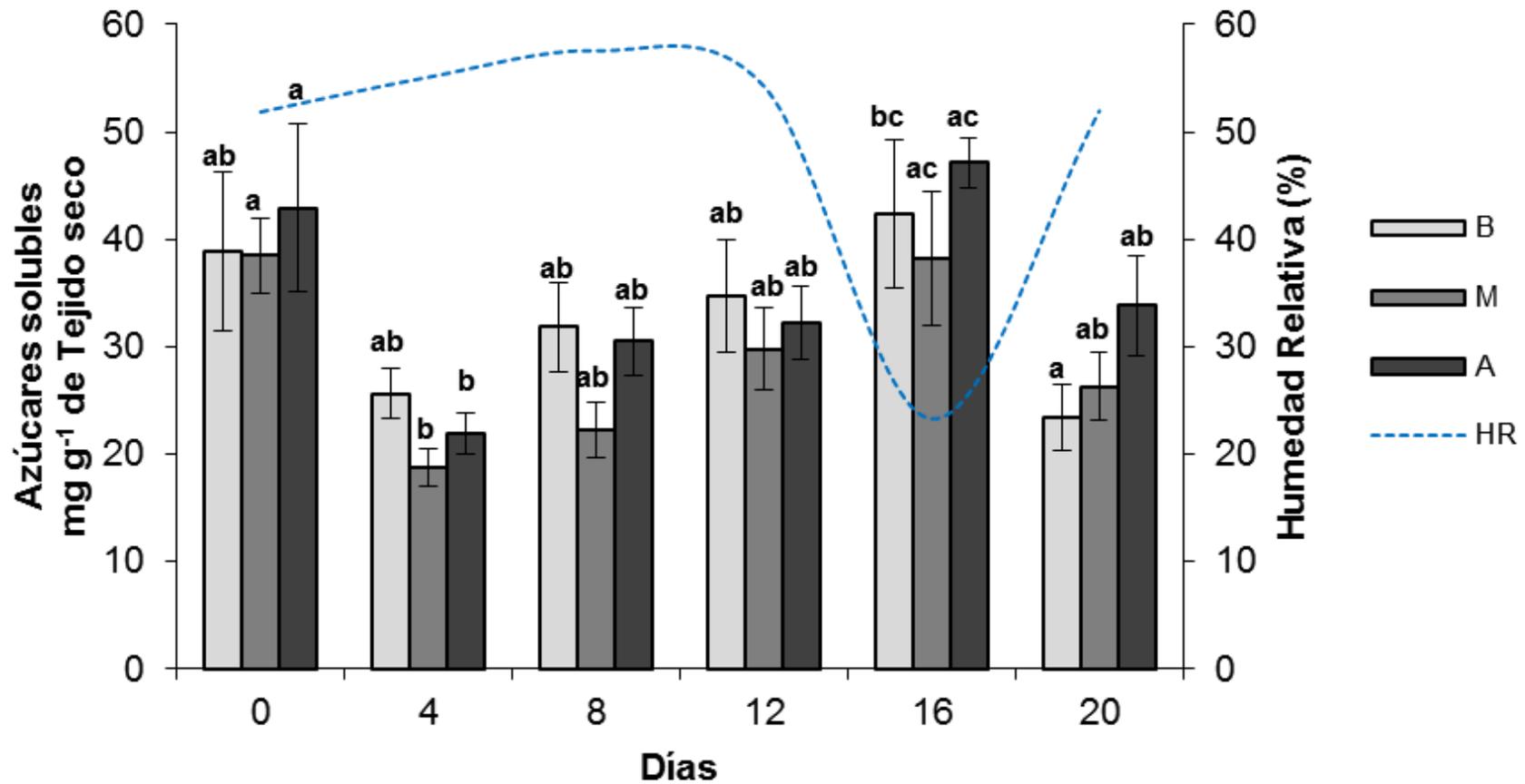


Fig.- 7 Plantas de *E. laui*, mantenidas en una cámara de crecimiento con temperatura de 24 ± 1 °C. Fotoperiodo de 12 h luz B: $100.20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, M: $202.12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, A: $483.25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Línea punteada en azul: humedad relativa (% HR) se muestra los registros al momento de los muestreos. Letras diferentes representan cambios significativos entre todas las variables (flujo fotónico y tiempo) Medias \pm error estándar (una vez), $n = 10$. Tukey $P < 0.050$.



3. Respuesta al estrés de largo plazo en condiciones in situ: Riego, temperatura y luz.

Las plantas que fueron mantenidas durante cuatro meses bajo distintas condiciones en Cuicatlán, Oax. (Fig. 8) mostraron un incremento en la acumulación de osmolitos (Anexo Cuadro 6) y solo los tratamientos a cielo abierto redujeron el diámetro de su roseta en un 23.8 y 70.1 % (AR y AS respectivamente).

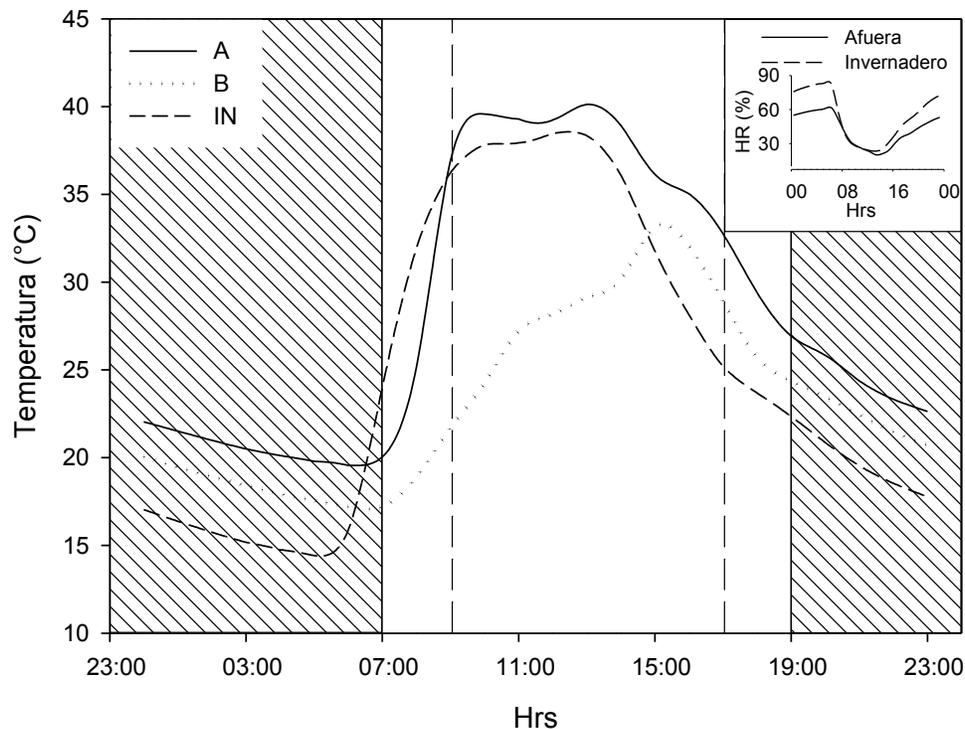


Fig.-8 Temperaturas promedio de cuatro meses (La Iberia, Cuicatlán, Oax.). Los registros fueron obtenidos colocando un datalogger (Extech instruments, RHT10, New Hampshire, EUA), A: fuera del invernadero directamente al sol (20 - 40 °C), B: fuera del invernadero con sombra (17 - 33 °C), IN: dentro del invernadero (14 - 38 °C). Área sombreada representa la noche (12 h), área clara representa el día (12 h), área entre líneas punteadas verticales representa el rango de exposición con mayor temperatura (8 h). En la esquina superior derecha se muestra la humedad relativa (HR) correspondiente al mismo periodo, dentro y fuera del invernadero.

Prolina.

El contenido de prolina (Fig. 9) mostró diferencias significativas entre plantas expuestas a cielo abierto (AR: 27.78 $\mu\text{g g}^{-1}$, AS: 22.56 $\mu\text{g g}^{-1}$) y las que permanecieron dentro del invernadero (INR 1.65 $\mu\text{g g}^{-1}$, INS 1.40 $\mu\text{g g}^{-1}$), sin embargo no se encontraron diferencias



significativas entre las plantas que permanecieron en el invernadero con riego y las que no lo tuvieron.

Azúcares solubles.

La acumulación de azúcares solubles en las plantas expuestas directamente al sol (AR y AS), fue mayor respecto a las que permanecieron dentro del invernadero (INR e INS; Fig. 10); mientras que las plantas con déficit hídrico no presentaron diferencias significativas respecto a las que tuvieron riego.

Potencial hídrico.

El incremento de prolina y la acumulación de azúcares solubles se reflejaron en la disminución del potencial hídrico, encontrando diferencias significativas entre las plantas a cielo abierto (A) y el resto de los tratamientos, además de mostrar diferencias entre los tratamientos con riego y sin riego de los grupos A y B (Fig. 11).

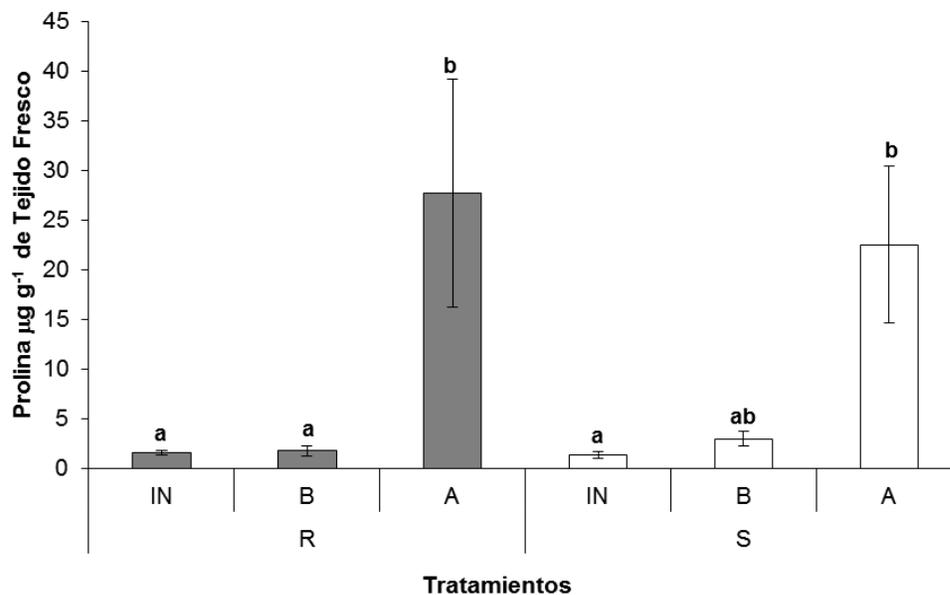


Fig.-9 Plantas de *E. laui* después de 4 meses, con pre aclimatación de 30 días sin riego fuera del invernadero La Iberia. A) Cielo abierto ($915 - > 2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), B) Bajo sombra ($20 - 42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), IN) Invernadero ($15 - 92 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), R) Riego (cada 3 días a saturación) y S) sin riego. Letras diferentes representan cambios significativos entre todas las variables (lugar de crecimiento y riego). Medias \pm error estándar (una vez), $n = 4$. Tukey $P < 0.050$.

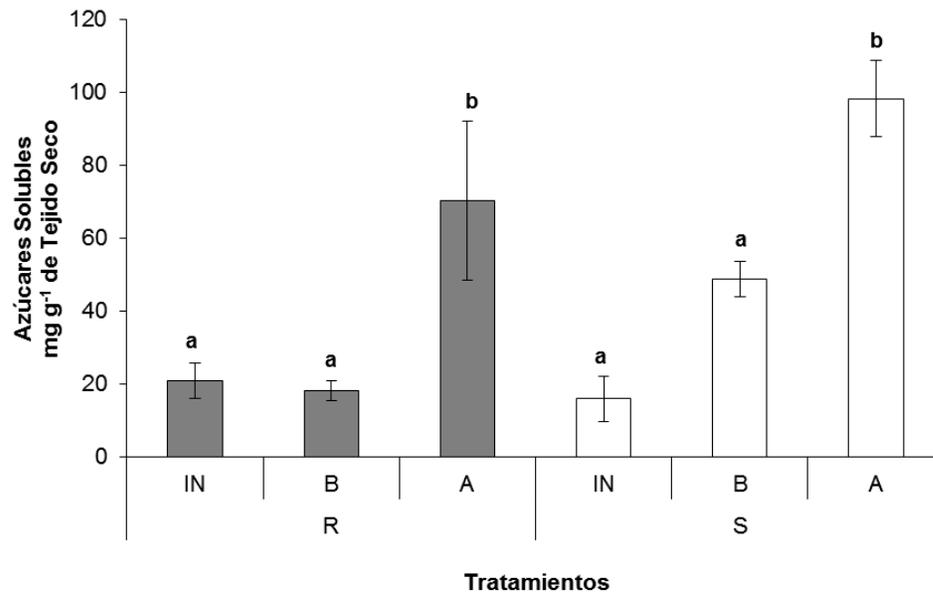


Fig.-10 Plantas de *E. laui*, después de 4 meses, con pre aclimatación de 30 días sin riego fuera del invernadero La Iberia. A) Cielo abierto ($915 - > 2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), B) Bajo sombra ($20 - 42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), IN) Invernadero ($15 - 92 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), R) Riego (cada 3 días a saturación) y S) sin riego. Letras diferentes representan cambios significativos entre todas las variables (lugar de crecimiento y riego). Medias \pm error estándar (una vez), $n = 3$. Tukey $P < 0.050$.

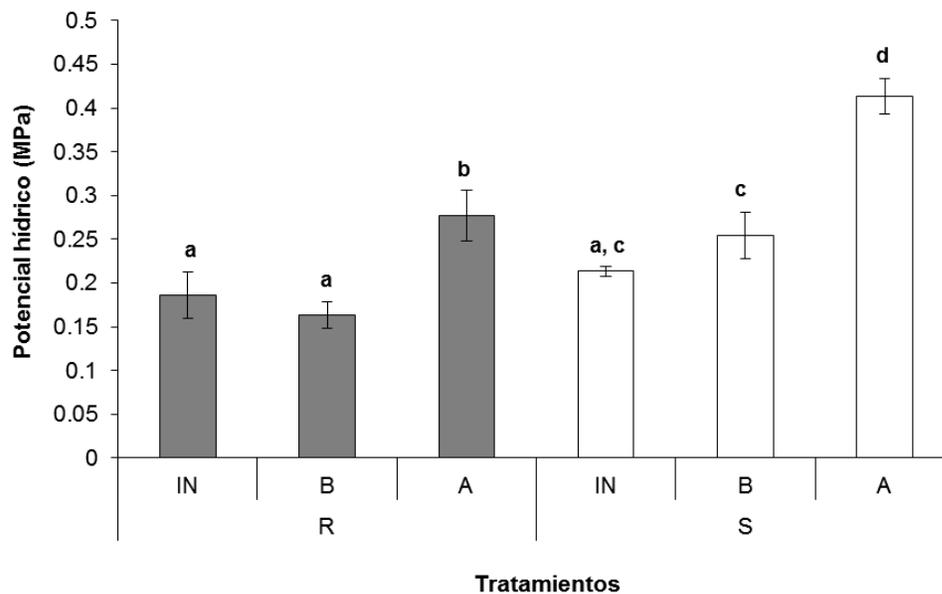


Fig.-11 Plantas de *E. laui*, después de 4 meses, con pre aclimatación de 30 días sin riego fuera del invernadero La Iberia. A) Cielo abierto ($915 - > 2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), B) Bajo sombra ($20 - 42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), IN) Invernadero ($15 - 92 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), R) Riego (cada 3 días a saturación) y S) sin riego. Letras diferentes representan cambios significativos entre todas las variables (lugar de crecimiento y riego). Medias \pm error estándar (una vez), $n = 3$. Tukey $P < 0.050$.



4. Respuesta al estrés de corto plazo en condiciones controladas con plantas que fueron sometidas a estrés abiótico in situ: Déficit hídrico y temperatura elevada.

Como se indicó, las plantas utilizadas en esta prueba fueron sometidas anteriormente a distintos tratamientos durante cuatro meses en el invernadero “La Iberia” (Fig. 8). Posterior a este tiempo se trasladaron al invernadero de la UMF, FES-I, UNAM (Edo. Méx.) y fueron mantenidas por 15 días en las mismas condiciones de riego que se encontraban en “La Iberia” (Fig. 12), finalmente se les impuso una temperatura de 44 °C. En este caso ninguna planta presentó algún deterioro físico que comprometiera su sobrevivencia, aunque las que provenían del invernadero (INR e INS), perdieron turgencia (Fig. 13).

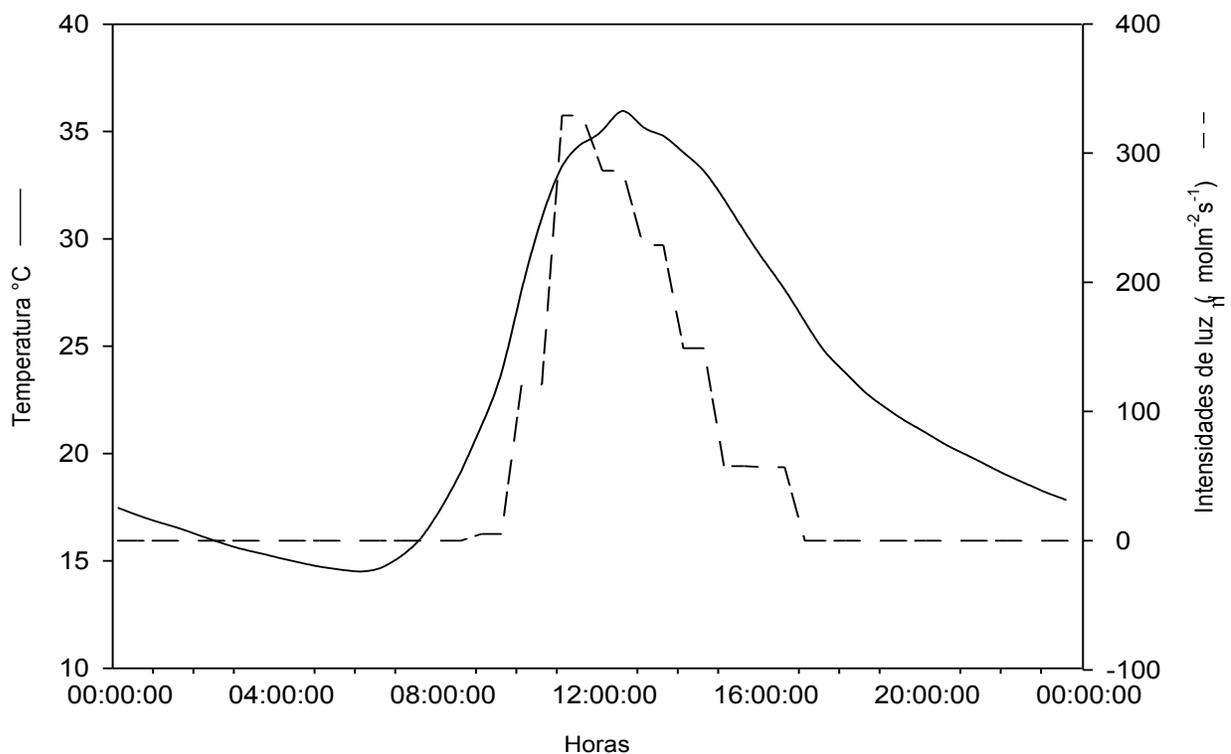


Fig.-12 Promedio de temperaturas e intensidades de luz (15 días). Los registros fueron obtenidos colocando un datalogger (Extech instruments, RHT10, New Hampshire, EUA) en el invernadero de la Unidad de Morfología y Función, FES-Iztacala, UNAM.

*Prolina.*

La concentración de prolina en todos los tratamientos tuvo variaciones a lo largo del experimento (Anexo Cuadro 7), sin embargo, el análisis estadístico indicó que no fueron significativas (Fig. 14).

Azúcares solubles.

La humedad relativa de la cámara disminuyó a 15.2 % a las 72 h y la concentración de azúcares solubles presentó diferencias significativas en esta hora entre los tratamientos con y sin riego (Anexo Cuadro 8). Las plantas bajo sombra con riego (BR) y el resto de los tratamientos sin riego (BS, AR y AS) presentaron diferencias a lo largo del experimento entre la hora 0 y la 72 (Fig. 15).

Potencial hídrico.

El potencial hídrico no disminuyó a lo largo del experimento en ningún caso (Anexo Cuadro 9), sin embargo mantuvieron diferencias significativas los tratamientos BS y AS, con respecto a los grupos con riego (Fig. 16). En la figura 17 los datos relacionados de esta misma variable, muestran un comportamiento de aclimatación en los tratamientos que permanecieron más estresados (BS, AR y AS).

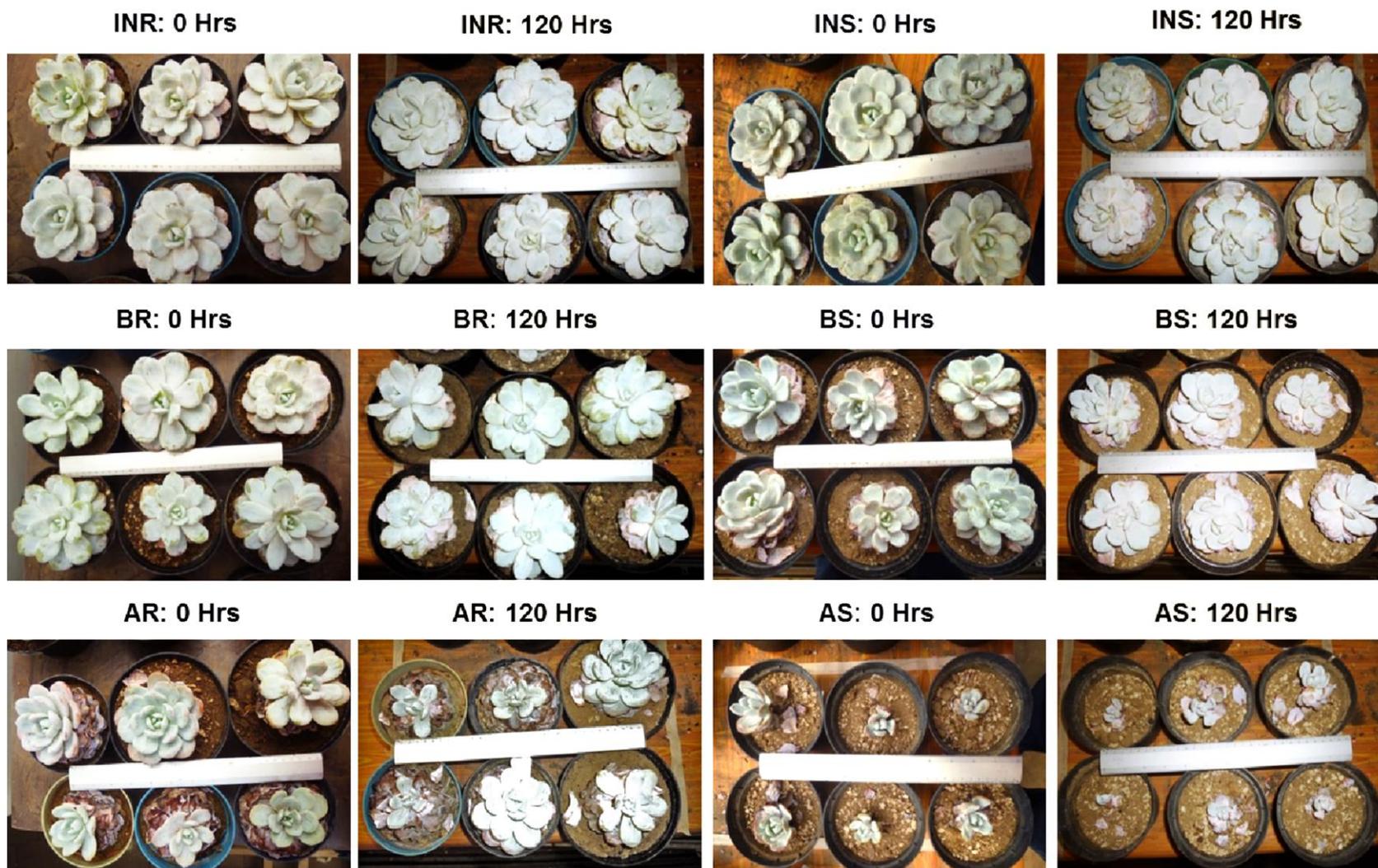


Fig.-13 *E. laui* antes y después de colocarlas dentro de la cámara de crecimiento a 44 °C, no se observaron cambios físicos en las plantas que comprometieran su sobrevivencia. Las plantas provenían de tratamientos en campo IN: invernadero, B: con sombra, A: a cielo abierto, todos los tratamientos tuvieron un grupo con riego (R) y otro sin riego (S).

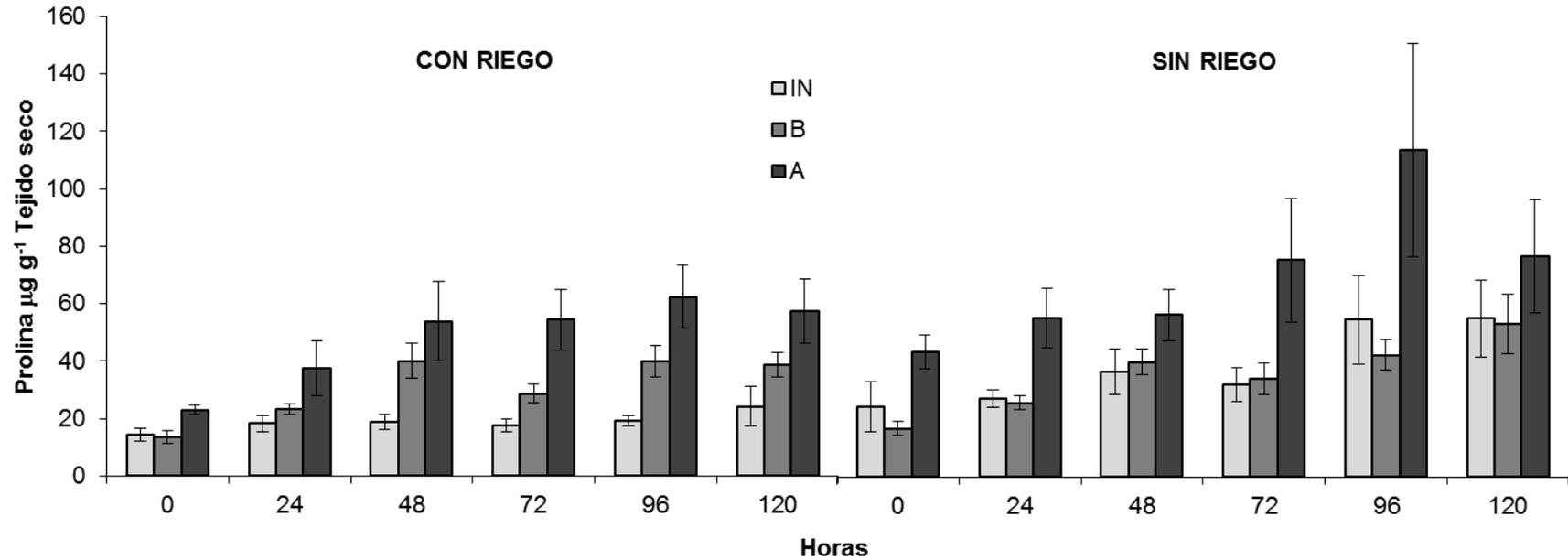


Fig.-14 Plantas de *E. laui*, en una cámara de crecimiento a 44 °C, fotoperiodo de 12 h luz con ciclos de 190/334/190 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y humedad relativa de 28 - 61.8 %. Después de 4 meses en “La Iberia” Cuicatlán, Oax. IN: invernadero (15 - 92 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). B: en sombra (20 - 42 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), A: cielo abierto (915 - > 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 15 días en el invernadero de la UMF de la Fes-I (14.5 - 35.9 °C, 5.2 - 329.1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Sin diferencias significativas (n = 6). Medias \pm error estándar (una vez). ANOVA de dos factores $\alpha < 0.050$.

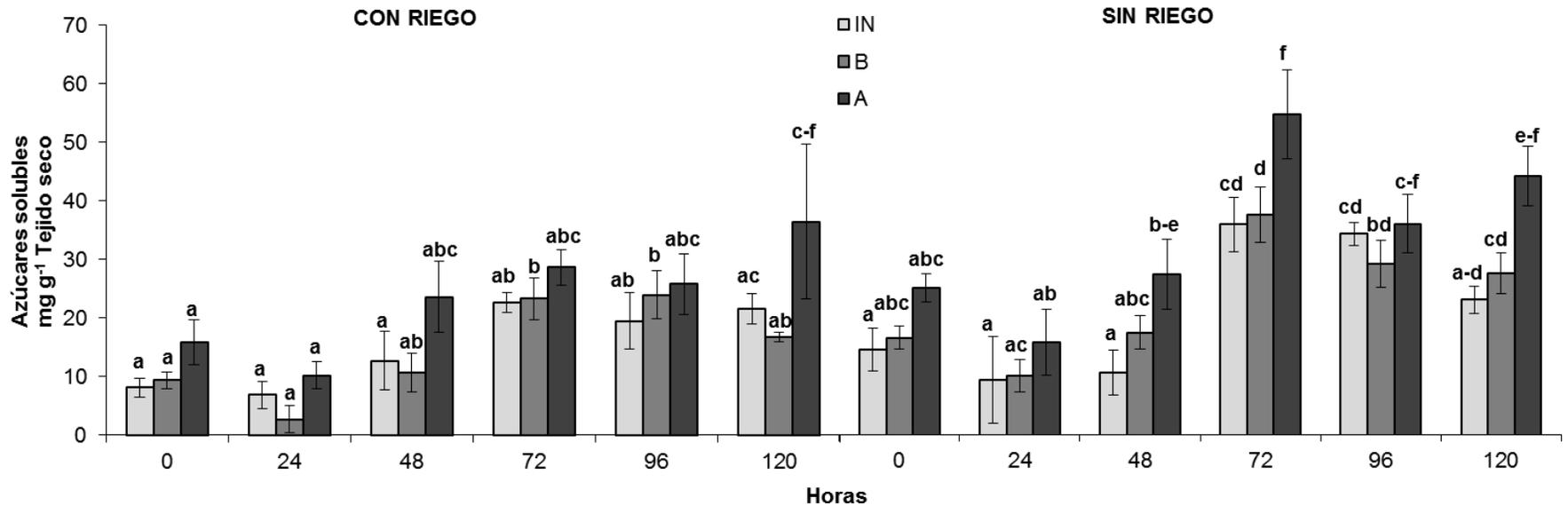


Fig.-15 Plantas de *E. laui*, dentro de una cámara de crecimiento a 44 °C, fotoperiodo de 12 h luz con ciclos de 190/334/190 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y humedad relativa de 28 - 61.8 %. Después de 4 meses en “La Iberia” Cuicatlán, Oax. IN: invernadero (15 - 92 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). B: en sombra (20 - 42 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), A: cielo abierto (915 - > 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 15 días en el invernadero de la UMF de la Fes-I (14.5 - 35.9 °C, 5.2 - 329.1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Letras diferentes representan cambios significativos entre todas las variables (lugar de crecimiento y riego). Medias \pm error estándar (una vez), n = 6. Tukey P < 0.050.

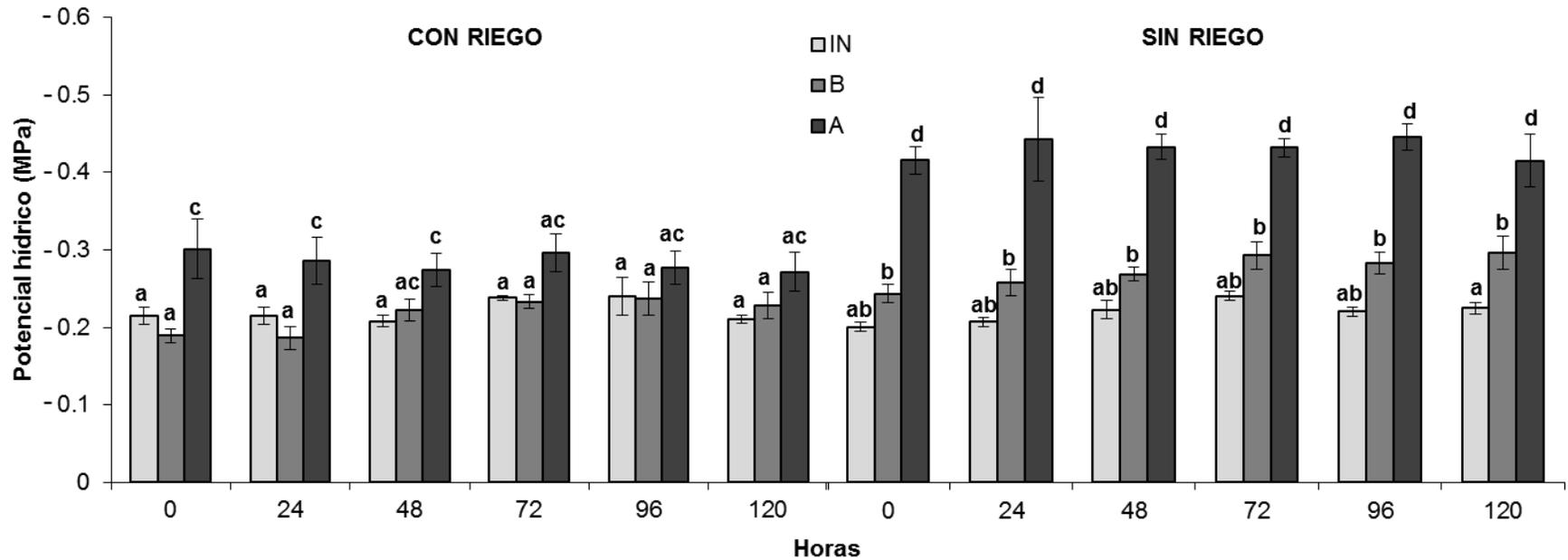


Fig.-16 Plantas de *E. laui*, dentro de una cámara de crecimiento a 44 °C y fotoperiodo de 12 h luz con ciclos de 190/334/190 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y humedad relativa de 28 - 61.8 %. Después de 4 meses en “La Iberia” Cuicatlán, Oax. IN: invernadero (15 - 92 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). B: en sombra (20 - 42 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), A: cielo abierto (915 - > 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 15 días en el invernadero de la UMF de la Fes-I (14.5 - 35.9 °C, 5.2 - 329.1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Letras diferentes representan cambios significativos entre todas las variables (lugar de crecimiento, riego y tiempo). Medias \pm error estándar (una vez), n=6. Tukey P < 0.050.

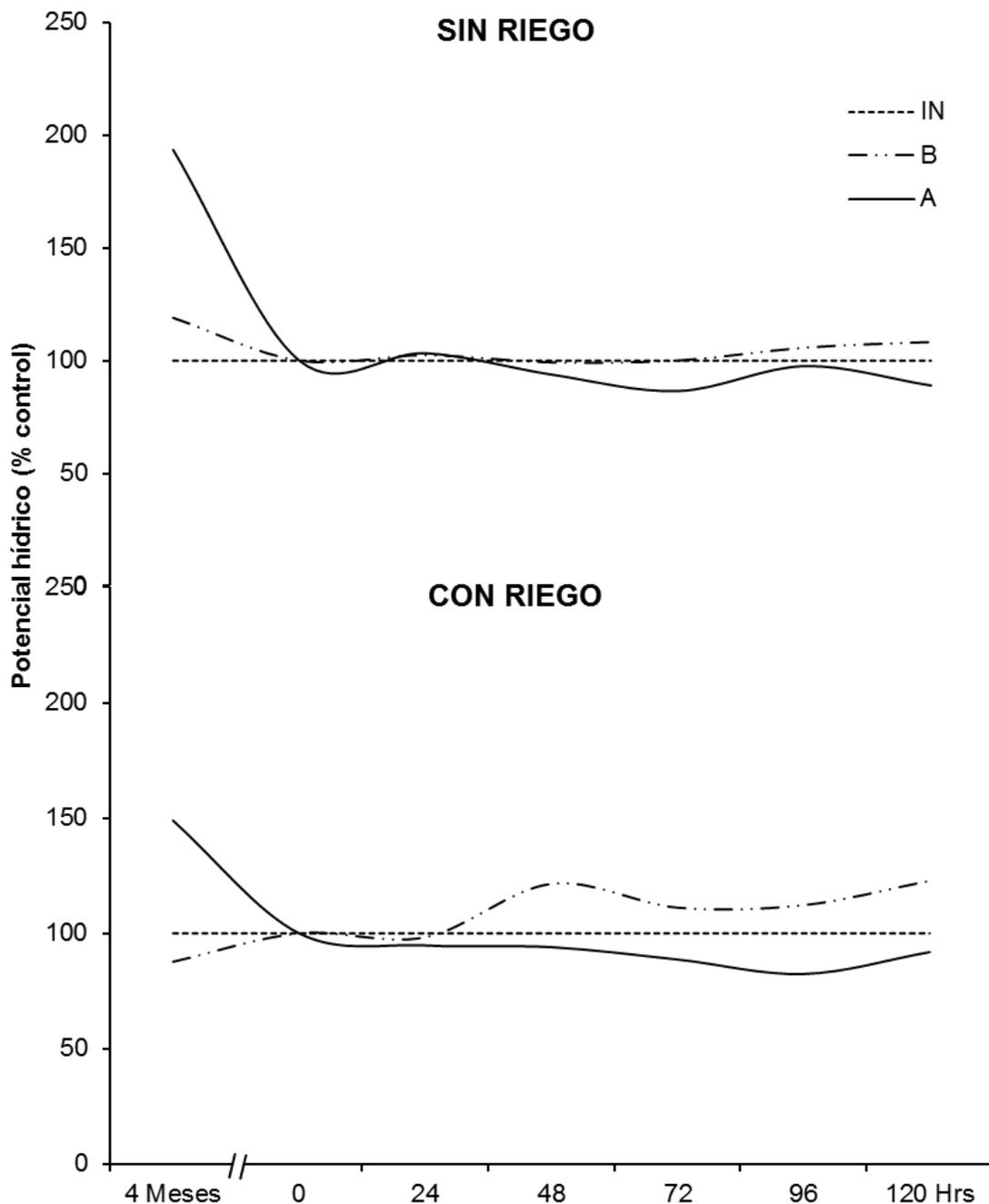


Fig.-17 Respuesta osmótica de los diferentes tratamientos (IN: invernadero, B: en sombra y A: cielo abierto) respecto al control, después de 4 meses en “La Iberia” Cuicatlán, Oax. y de permanecer dentro de una cámara de crecimiento a 44 °C, por 120 h. Cuatro Meses *in situ*: $[(tratamiento * 100) invernadero^{-1}]$, Cámara de crecimiento 120 h: $[[((horario * 100) hora 0^{-1}) * 100] Invernadero^{-1}]$ La discontinuidad de tiempo representa 15 días en el invernadero de la UMF de la Fes-I (Edo. Méx).



DISCUSIÓN

Ensayo

Respuesta al estrés de corto plazo en condiciones controladas: Déficit hídrico y temperatura elevada.

La síntesis y acumulación de la prolina pueden formar parte de la respuesta al estrés osmótico en plantas, impidiendo la desnaturalización de macromoléculas y en muchas especies se ha establecido una correlación entre la acumulación de este osmolito y la tolerancia al estrés abiótico (Trovato, *et al.*, 2008; Kavi, *et al.* 1995). En este ensayo las plantas perdieron turgencia y presentaron marchitez en la mayoría de sus hojas, principalmente en las más alejadas del centro o ápice de la planta, los errores estándar mostraron que no había diferencias en la concentración de prolina, sin embargo la acumulación de este osmolito parecía tener una tendencia a incrementar. Al finalizar las 55 h se observó que las plantas presentaban desarrollo floral, esto explicaría porque los registros de este osmolito fueron los más altos ($169.29 \mu\text{g g}^{-1}$ de tejido seco), en comparación con el resto de los experimentos de este trabajo. Es posible que esa acumulación no provenga de la síntesis de *novo*, ya que en diferentes plantas se ha reportado, que el estrés no es el único evento que induce la acumulación de prolina, también ocurre durante el proceso del desarrollo reproductivo, por ejemplo en especies como *Brassica napus*, *A. thaliana* y *Lycopersicon esculentum* cv Moneymaker, fue observada una mayor acumulación de prolina en tejidos reproductivos como flores, polen, silicuas y semillas, que en cualquier otro órgano analizado. Esta acumulación es provocada por el transporte de prolina de diferentes partes de la planta (hojas y tallos) hacia los tejidos reproductivos, llegando al 23 – 60 % del total del pool de este aminoácido (Mattioli, *et al.*, 2009; Good y Zaplachinski, 1994). La formación de prolina está dada por la vía del glutamato y la de ornitina, esta última durante el desarrollo floral genera pirrolin-5-carboxilato (P5C) que es utilizado para la producción de glutamato y no para la síntesis de prolina durante el estrés, suministrando energía a la mitocondria durante esta etapa (Polavarapu, *et al.*, 2014; Roosens, *et al.*, 2002; Funk, *et al.*, 2008). Al correlacionar los datos de azúcares solubles con potencial hídrico, no hubo diferencias



estadísticamente significativas, esto sugiere que *E. laui* no presenta una respuesta al estrés en corto plazo, ya que se ha reportado que la acumulación de prolina en plantas bajo estrés, es acompañada por un aumento en la concentración de azúcares solubles y disminución del potencial hídrico (Keunen, *et al.*, 2013; Balibrea, *et al.*, 1997).

Experimentos

1. Respuesta al estrés de largo plazo en condiciones controladas: Déficit hídrico y temperatura elevada.

Uno de los principales efectos del déficit hídrico y el incremento de la temperatura en plantas suculentas o de zonas áridas, es el cambio de un comportamiento C₃ a uno MAC. *E. laui* tiene la característica de presentar un metabolismo ácido de las crasuláceas de tipo facultativo, puede realizar la transición C₃-MAC y viceversa dependiendo de las condiciones ambientales que se presenten, tanto en plantas jóvenes, como adultas (Reyero, 2014). Este metabolismo en déficit hídrico o temperaturas elevadas, confiere protección contra el estrés oxidativo (Habibi, *et al.* 2011). En otros trabajos, se ha reportado que la temperatura promueve la formación de radicales libres y estimula la actividad de enzimas antioxidantes, las cuales juegan un papel protector en el estrés oxidativo, un ejemplo de ello es la enzima superóxido dismutasa (SOD) que permitió en *Aloe vera* contrarrestar la formación de radicales libres y evitar entrar en una condición de estrés oxidativo inducido por la temperatura (Delatorre-Herrera, *et al.*, 2010). El incremento de temperatura en *E. laui*, tiene la capacidad de inhibir el transporte de electrones en los fotosistemas y estimular la síntesis de pigmentos como violaxantina y zeaxantina (ciclo de las xantofilas), compuestos que permiten la disipación de energía como calor para evitar los daños oxidativos (Reyero, 2014; Chen, *et al.* 2011; Alfonso, *et al.* 2000). En este trabajo la concentración de prolina en *E. laui* no mostró cambios entre los tratamientos con riego y sin riego, estableciendo que la respuesta de ajuste osmótico fue estimulada por la temperatura, ya que el incremento de este aminoácido fue significativo a lo largo de los días en los tratamientos de 34 y 44 °C. Lo que plantea que la respuesta al incremento de temperatura además de estar asociada a la actividad antioxidante, también puede generar un ajuste osmótico en *E. laui*.



La prolina es conocida por conferir tolerancia osmótica durante un estrés abiótico y en algunas plantas como *Aloe vera*, se ha reportado que éste aminoácido incrementa 75 % su concentración en condiciones de déficit hídrico (Delatorre-Herrera, *et al.*, 2010). Como se mencionó anteriormente, *E. laui* no presentó diferencias estadísticamente significativas en la acumulación de éste osmolito, entre los tratamientos sin riego y sus contrapartes irrigadas, lo que indica que esta crasulácea es tolerante al déficit hídrico, este comportamiento coincide con lo reportado para *Sedum album*, que no presentó una acumulación de prolina bajo estrés hídrico (Sayed, *et al.*, 1994). Hay autores que cuestionan la función primordial de la prolina en la osmoregulación, subrayando que su función está más involucrada en la etapa de recuperación del estrés, ya que el ajuste osmótico podría lograrse mejor con hidratos de carbono como solutos compatibles (Müller, *et al.*, 2012; Hoekstra *et al.*, 2001). En este trabajo la acumulación de prolina se presentó con antelación conforme la temperatura aumentó, encontrando diferencias el día 4 y 8 (con riego y sin riego respectivamente) para los tratamientos a 34 °C y el día 4 en los de 44 °C. Por otro lado, los azúcares solubles del tratamiento a 34 °C, fueron incrementando gradualmente hasta presentar diferencias significativas el día 20 de tratamiento, la disminución de la humedad relativa el día 16 en el tratamiento de 24 °C, indujo cambios en la concentración de azúcares solubles, mismos que fueron reflejados en la disminución del potencial hídrico al final del experimento en estos dos tratamientos (Anexo Cuadro 4). Las células vegetales utilizan un sistema de defensa que implica activar genes que codifican para el sistema antioxidantes que están relacionados con el estrés, y que a su vez, inducen cambios en la maquinaria bioquímica de la planta. Los estudios han demostrado que las especies reactivas de oxígeno requieren moléculas adicionales para enviar y amplificar señales de defensa. Las respuestas al estrés no son rutas lineales, implican múltiples vías y la interacción de cofactores adicionales o moléculas de señalización para coordinar una respuesta específica a un estímulo dado (Kumar y Venkateswarlu, 2001). Al presentarse un déficit hídrico moderado, los solutos compatibles, incluyendo aminoácidos y sus derivados, polioles, betaínas y disacáridos, son sintetizados inicialmente para proteger a las proteínas y membranas de la deshidratación, sin embargo, las concentraciones de estos solutos son a menudo insuficientes para aumentar la capacidad de retención de agua de las células, pero pueden servir como moléculas señalizadoras que indiquen a la planta que se avecinan condiciones estresantes. En éste caso, los disacáridos y



oligosacáridos no reductores actúan como sustitutos del agua para satisfacer los requerimientos de hidrógeno en los grupos polares en la superficie de las proteínas deshidratadas. Al analizar las redes metabólicas involucradas en el estrés hídrico, se determinó que la regulación de la síntesis de aminoácidos es más compleja que la de los carbohidratos, por lo que hay razones para suponer que el papel de los azúcares en la osmoprotección es más significativo que el de prolina (Urano *et al.*, 2009).

2. Respuesta al estrés de largo plazo en condiciones controladas: Exceso de flujo fotónico.

Las plantas presentan alteraciones metabólicas por exceso de luz cuando las antenas de los fotosistemas absorben más energía luminosa de la que puede ser utilizada para la fotosíntesis. Esta situación se produce cuando la intensidad luminosa aumenta (densidad del flujo de fotones), hasta valores próximos o superiores al punto de saturación de luz, alcanzando la mayor eficiencia fotosintética (Azcón-Bieto *et al.*, 2008). La radiación mínima de saturación (E_k) para *E. laui* fue de $331.87 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en una temperatura de $24 \text{ }^\circ\text{C}$. El valor de E_k puede variar dependiendo de la temperatura en la que se encuentre el organismo, ya que conforme la temperatura incrementa, el punto de la radiación mínima de saturación se hace más pequeño, aunque existen otros factores involucrados que podrían modificar este valor, como es la propia aclimatación o la respuesta de defensa que presente la planta ante algún estrés abiótico (Ralph, *et al.*, 2005). De cualquier modo, E_k depende de los centros de reacción disponibles en el momento de la medición y se ha visto que la activación e inactivación de los centros de reacción, puede ser una característica en organismos con la capacidad de adaptar su aparato fotosintético a los efectos de los diferentes tipos de estrés abiótico, como se ha reportado en campo con *E. laui* (Reyero, 2014; González, *et al.* 2008).

Al incrementar la irradiación se observó una tonalidad rojiza en *E. laui*, posiblemente por la producción de antocianinas, lo que sugirió que esta especie es sensible a los cambios de irradiación, pero su morfología y fisiología fotosintética le confieren características que le permiten ser tolerante a las altas irradiaciones (Reyero, 2014).



El Exceso de flujo fotónico en las plantas puede afectar la eficiencia fotosintética, principalmente debido al daño oxidativo en el fotosistema II (PSII). Cuando una planta se mantiene en estrés, disminuye la velocidad del ciclo de Calvin, el cual promueve la oxidación de NADPH y restauración de NADP^+ , provocando que el flujo de la cadena transportadora de electrones se suprima debido a una insuficiencia de aceptores de electrones (NADP^+), esto conduce a la producción de oxígeno singulete en los centros de reacción del PSII y la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Chaves, *et al.*, 2009; Kato, *et al.*, 2003). Para amortiguar los daños provocados por la peroxidación, las plantas inducen en cloroplastos la acumulación de enzimas como: delta-pirrolin-5-carboxilato sintasa 1 (P5CS1) y pirrolin-5-carboxilato reductasa (P5CR), que dan lugar al incremento de prolina derivado de glutamato, para mantener el flujo de electrones entre los centros de reacción de la fotosíntesis y estabilizar el balance redox, reduciendo la fotoinhibición y el daño del aparato fotosintético (Szabados, *et al.* 2009; Székely, *et al.*, 2008; Hare, *et al.*, 1997). *E. laui* no mostró incrementos significativos de prolina en ninguno de los tratamientos con luz, incluso en aquellos con una irradiación de $483.25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ que representaban un estrés luminoso, al rebasar el umbral de saturación (Ralph, *et al.*, 2005), esto podría deberse a que la luz está íntimamente relacionada con dos factores, el primero es la temperatura, que fue separada suprimiendo los efectos de ésta al realizar la curva de saturación luminosa, obteniendo el punto de radiación mínima de saturación ($E_k = 331.87 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 24°C). El otro factor es la exposición a una parte del espectro de luz, el ultravioleta, el cual es un factor que afecta principalmente los procesos fisiológicos de la fotosíntesis, generando radicales libres, que las plantas contrarrestan activando una serie de mecanismos de protección, incluyendo la síntesis de flavonoides y de prolina (Reyero, 2014; Hayat, *et al.*, 2012). Algunos cultivos como la mostaza, arroz y frijol han mostrado una rápida respuesta al estrés provocada por luz UV, incrementando de 3 hasta 7 veces los niveles de prolina, reduciendo considerablemente la cantidad de radicales libres producidos durante la exposición, a diferencia de las plantas colocadas en luz blanca fluorescente fría, las cuales no presentaron cambios en la concentración de este aminoácido (Pardha, *et al.*, 1995). Así mismo, en cultivos de *Malva parviflora*, *Plantago major*, *Rumex vesicarius* y *Sisymbrium erysimoides* Desf, el incremento de prolina está asociado de igual manera, con la exposición a la radiación ultravioleta (Salama, *et al.*, 2011). Esto indicó que el espectro de luz utilizado en



este trabajo no representó un factor estresante en relación con la respuesta osmótica, ya que no se mostraron cambios significativos en la prolina y en el potencial hídrico. En contraste, el día 16 los azúcares solubles incrementaron su concentración en todos los tratamientos, debido a la disminución de la humedad relativa (23.28 %) en la cámara de crecimiento. En algunas especies como *Arabidopsis*, *Coffea arabica* y *Nicotiana tabacum*, la acumulación de azúcares como galactinol y rafinosa en bajas concentraciones representa una señal molecular endógena para la inducción de la respuesta antioxidante, ante un factor abiótico, contribuyendo efectivamente a la tolerancia al estrés, cuando las condiciones se vuelven más severas (Sengupta, *et al.*, 2015; Balasubramaniyam y Harvey, 2015; ElSayed, *et al.*, 2014; Nishizawa, *et al.*, 2008).

3. Respuesta al estrés de largo plazo en condiciones in situ: Riego, temperatura y luz.

Los cambios de temperatura, altas irradiaciones y la falta de riego, representan una interacción compleja en el ambiente, que puede afectar diversos procesos fisiológicos en las plantas. En *Sedum album*, estos factores inducen la acumulación de prolina, betaína y en la disminución del potencial hídrico (Sayed, *et al.*, 1994). Los resultados presentados en este trabajo de *E. laui*, mostraron características similares a los registrados en *Sedum album*, por ejemplo, la prolina no afectó significativamente el potencial hídrico en los primeros 20 días y en este mismo periodo, tampoco se encontraron diferencias entre los tratamientos irrigados y los que permanecieron bajo déficit hídrico. Cuando el tiempo de exposición a los principales factores que promueven el estrés abiótico se extendió a 5 meses (tomando en cuenta la fase de preaclimatación), los datos en *E. laui*, revelaron que el diámetro de las rosetas fue claramente disminuido en los tratamientos a cielo abierto, la concentración de prolina y azúcares solubles, incrementó de forma contundente en los tratamientos expuestos directamente al ambiente y no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos con riego y sin riego. Por otro lado, el potencial hídrico mostró una disminución significativa tanto en los tratamientos expuestos al ambiente, como entre los grupos irrigados y los que permanecieron en déficit hídrico, de la misma forma que se presentó en *S. album* y *S. rubrotinctum* en un tiempo similar (Teeri, *et al.* 1986). Los datos presentados sugieren que las



plantas sin riego experimentaron un ajuste osmótico en el transcurso de este trabajo. Estos resultados nos indican que la respuesta al estrés hídrico no actúa de forma aislada y viene acompañada de otros compuestos con propiedades protectoras que se acumulan en los tejidos, uno de ellos puede ser malato, el cual puede estar participando como un componente osmoregulador ante el déficit hídrico, como se ha reportado para *Sedum rubrotinctum*, después de dos años en estrés hídrico la acumulación de malato contribuyó significativamente en el ajuste del potencial hídrico (Teeri, *et al.* 1986). El metabolismo ácido de las crasuláceas, no solo sirve para el ahorro, sino también para la captura de agua. En *Senecio medley-woodii* y *Kalanchoë daigremontiana* bajo estrés hídrico, los cambios en los niveles de malato, causaron una reducción en el potencial hídrico de las hojas favoreciendo la absorción de agua. Los cambios en los niveles de malato pueden resultar en grandes alteraciones de la presión osmótica en plantas suculentas, principalmente por la mañana, proporcionando un medio de ajuste osmótico (Herrera, 2009).

En *E. laui* se ha reportado que los meses con temperatura elevada, baja humedad relativa e intensidades de luz altas, inducen una mayor acumulación de ácidos orgánicos por las mañanas, cuando la humedad relativa del ambiente es más alta (Reyero, 2014). Esto indica que *E. laui* tiene la oportunidad de importar agua a las células vía estomática, por las mañanas, permitiendo que las hojas conserven su turgencia y como consecuencia tiene la capacidad de ser tolerante a largos periodos bajo déficit hídrico.

4. Respuesta al estrés de corto plazo en condiciones controladas con plantas que fueron sometidas a estrés abiótico in situ: Déficit hídrico y temperatura elevada.

Hay muchos componentes ambientales que pueden alterar el comportamiento fisiológico de las plantas, la exposición leve a estos factores potencialmente dañinos, puede infligir cambios a nivel molecular y al mismo tiempo activar mecanismos de reparación. Cuando los organismos son sometidos a estos factores en dosis subletales, pueden estimular procesos vitales dentro de las células y crear un cambio positivo en la homeostasis de las plantas (Yoshihiro, 2012). Una temporada de secas puede inducir el incremento en la concentración de prolina de forma inicial, según un estudio realizado con algunos miembros de la familia Crassulaceae que fueron monitoreados por siete años, ésta acumulación podría tener una



función protectora. Al prolongarse la sequía observaron que los altos niveles de prolina dejaron de marcar diferencias entre una medición y otra, reflejando un estado en que las reacciones metabólicas se reducen al mínimo, dando paso a la tolerancia al estrés, debido a las características presentes en su entorno (Treichel, *et al.*, 1984). Es probable que en *E. laui* el pretratamiento en el que fueron expuestas al ambiente por cuatro meses, haya promovido una respuesta similar al del ejemplo anterior, ya que los niveles de prolina permanecieron elevados, tal y como lo habían presentado las plantas *in situ* al término del experimento de cuatro meses, al colocarlas posteriormente en condiciones controladas (44 °C), el contenido de este osmolito no presentó diferencias significativas.

Una de las observaciones más importantes fue que la sobrevivencia de los organismos más estresados (BS, AR y AS) no se vio comprometida, mostrando una gran tolerancia a elevadas temperaturas, las cuales estimulan la formación de especies reactivas de oxígeno, mismas que son menguadas por la actividad de enzimas antioxidantes, promovida por una alta concentración de prolina, confiriendo protección contra el estrés oxidativo (Habibi, *et al.* 2011; Verslues, *et al.* 2010). Un estrés previo es capaz de promover una aclimatación que puede extender la longevidad de las plantas promoviendo la síntesis de agentes protectores, los cuales le confieren la capacidad de poder tolerar un estrés de mayor intensidad. Existen respuestas metabólicas que logran mejorar los efectos individuales de un estrés en particular, pueden estar estimuladas a través de la intensidad, agentes ambientales, interacciones y combinaciones de los diferentes tipos de estrés (Parsons, 2005). Estas respuestas adaptativas son conocidas como hormesis y pueden proporcionar protección de nivel bajo a moderado. El término propone designar a tal efecto estimulador, las concentraciones subinhibitorias de agentes tóxicos en cualquier organismo, es un proceso compensatorio, después de una perturbación inicial en la homeostasis. La exposición de las plantas a periodos cortos de estrés moderado, contribuyen claramente a soportar un estrés posteriormente más severo, reduciendo la mortalidad. Por lo tanto, el modelo de hormesis puede extenderse a múltiples agentes ambientales, protección cruzada, expresión de alta eficiencia energética y por tanto a una aptitud que evoluciona en respuesta a agentes ambientales simples y múltiples, donde los costos energéticos no son excesivos (Poschenrieder, *et al.* 2013). Por ejemplo, la disponibilidad de hidratos de carbono puede ser un factor limitante para la absorción de CO₂ y para la formación de malato vacuolar (Lara, *et*



al., 2010). Algunos géneros que presentan MAC, como *Agave*, *Ananas* y *Opuntia*, han demostrado que la selectiva repartición de carbohidratos, es un factor clave para el éxito ecológico de estas plantas bajo condiciones ambientales cambiantes (Verslues, *et al.* 2010). Las plantas MAC tienen la capacidad de mantener un bajo costo energético, en términos de ATP, al utilizar azúcares solubles como fuente de energía, para ampliar la magnitud de absorción de carbono y formación de malato, para mantener la fase oscura, conservando el equilibrio de carbono y energía en condiciones ambientales limitantes. La disponibilidad y transporte de azúcares juegan varias funciones reguladoras importantes en las plantas estresadas. Puesto que la tolerancia debe depender de la condición de energía de las células en las que se inducen respuestas que amortiguan los efectos del estrés, muchos tejidos de plantas son propensos a tener una mayor demanda de carbohidratos rápidamente metabolizables (Hare, *et al.* 1998). En *Aechmea* “Maya” (Bromeliaceae), la exposición prolongada al déficit hídrico, provocó una redirección del aporte de sacarosa, como suministro para el sustrato de la fase oscura, aumentando casi 90 % después de 180 días (Ceusters, *et al.*, 2009). En el caso de *E. laui*, se observó un incremento estadísticamente significativo de azúcares solubles a las 72 h y no se encontraron cambios en el potencial hídrico a lo largo de las 120 h, por lo que el incremento de los azúcares puede formar parte de una redistribución y no por una síntesis de *novo*. En *Cajanus cajan* las concentraciones de azúcares solubles no presentaron diferencias, sin embargo al analizar la composición de estos azúcares, pinitol se encontraba en mayor proporción que el resto de los azúcares y aumentaba su concentración, mientras que sus precursores como myo-inositol y ononitol disminuían a concentraciones cercanas a cero (Keller *et al.* 1993). Es probable que los azúcares solubles estén teniendo una participación mucho más activa e importante de lo que se observar en este trabajo, ya que los cambios en la humedad relativa pudieran estar brindando un efecto estimulante en los azúcares solubles y podría explicar la capacidad de *E. laui* para poder tolerar largos periodos en déficit hídrico. En condiciones controladas la disminución de la humedad relativa en las 72 h (15.2 %), promovió un incremento significativo en los azúcares solubles, pero como se ha mencionado anteriormente no tuvo un efecto en el potencial hídrico. Es posible que este incremento en los azúcares pudiera formar parte de una señal de estrés y brindar un efecto estimulante, en términos de parámetros biológicos como es la tolerancia y sobrevivencia al presentarse en pequeñas dosis



(Sengupta, *et al.*, 2015; Rattan, 2004; Calabrese y Baldwin, 1997). *E. laui* se desarrolla en un ambiente donde predomina el estrés por déficit hídrico, sin embargo los registros han demostrado, que en las mañanas se presenta una oportunidad para la recuperación del agua perdida durante el día y las constantes fluctuaciones en la humedad relativa, pudieran estimular la acumulación de azúcares solubles en pequeñas cantidades dentro de los tejidos vegetales, promoviendo en esta especie un efecto de hormesis, que prepara a la planta para poder tolerar condiciones más severas, muy similar al detectado en *Tetrahymena thermophila* en donde algunas proteínas de choque térmico (HSP), aumentan cuando se presentan fluctuaciones rápidas de temperatura en comparación con un entorno estable, lo que da como resultado una inducción metabólica de termotolerancia en entornos cambiantes (Poschenrieder, *et al.* 2013).



CONCLUSIONES

- *E. laui*, es una planta sensible a los cambios de luz, pero sumamente tolerante a altas irradiaciones, sin embargo la luz no es un factor que estimule la síntesis de osmolitos.
- La acumulación de osmolitos en *E. laui*, fue promovida por altas temperaturas y se observó que la exposición a este factor puede llegar a ser letal en corto tiempo.
- Esta crasulácea demostró ser altamente tolerante al déficit hídrico y se comprobó que son necesarios periodos muy prolongados, para manifestar cambios significativos en la acumulación de prolina y azúcares solubles.
- Las fluctuaciones y el incremento de la humedad relativa que ocurre en las primeras 8 horas del día en el sitio de origen, puede ser un importante aporte de agua para esta crasulácea y podría brindarle un probable efecto de hormesis, que le permite sobrevivir y conservar su turgencia.
- *E. laui* tiene una serie de mecanismos asociados al ajuste osmótico que le permiten sobrevivir en ambientes adversos por periodos prolongados, como los de su sitio de origen. Aunque para lograr una reintroducción exitosa, primero es necesario un periodo de aclimatación que involucre un aumento gradual de temperatura.

**LITERATURA CITADA**

- Arriaga, F. A., Trujillo, H. A., Mandujano, P. M., Aguilar, A. I., Perales, V. H., Herrera, R. D., Torres, Z. M., De la Cruz, G. G., Pozos, R. Y., Gracián, S. S., Pavón, M. E. L. y Ortiz, M. J. G. 2013. Morfofisiología vegetal. Un acercamiento práctico. Ed. UNAM-FESI. 3^{ra} edición. México. 145 pp.
- Alfonso, M., Perewoska, I., Kirilovsky, D. 2000. Redox central control of psbA gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. Involvement of the cytochrome b6/f complex. *Plant Physiology*. 122:505-515.
- Azcón-Bieto, J., Talón, M. 2008. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ed. Mc Graw Hill. pp 577-584.
- Balasubramaniam, A. y Harvey, P. J. 2015. Changes in the abundance of sugars and sugar-like compounds in tall fescue (*Festuca arundinacea*) due to growth in naphthalene-treated sand. *Environmental Science and Pollution Research*. 22:5817-5830. DOI: 10.1007/s11356-014-3812-9.
- Balibrea, M. E., Rus-Alvarez, A. M., Bolarín, M. C. y Pérez-Alfocea, F. 1997. Fast Changes in soluble carbohydrates and proline contents in tomato seedlings in response to ionic and non-ionic iso-osmotic stresses. *Journal of Plant Physiology*. 151:221-226. DOI: 10.1016/S0176-1617(97)80156-3.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. y Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39:205-207. DOI: 10.1007/BF00018060.
- Borland, A. M., Wullschleger, S. D., Weston, D. J., Hartwell, J., Tuskan, G. A., Yang, X. y Cushman, J. C. 2015. Climate-resilient agroforestry: physiological responses to climate change and engineering of crassulacean acid metabolism (CAM) as a mitigation strategy. *Plant, Cell and Environment*. 38:1833-1849. DOI: 10.1111/pce.12479.
- Boscaiu, M., Lull, C., Llinares, J., Vicente, O. y Boira, H. 2013. Proline as a biochemical marker in relation to the ecology of two halophytic *Juncus* species. *Journal of Plant Ecology*. 6(2):177-186. DOI: 10.1093/jpe/rts017.
- Bosco, O. A.; Mendes, A. N. L.; Gomes-Filho, E. 2013. Comparison Between the Water and Salt Stress Effects on Plant Growth and Development. En: Akinci, S.



- Responses of Organisms to Water Stress. Ed. Intech. EUA. 188 pp. DOI: 10.5772/54223.
- Boyer, J. S. 1970. Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean, and sunflower at various leaf water potentials. *Plant Physiol.* 46:233-235. DOI: 10.1104/pp.46.2.233.
 - Buchanan, B.B., W. Gruissem y R.L. Jones. 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Ed. Wiley Rockville. 2ª Edición. España. 1280 pp.
 - Burg, M. B. y Ferraris, J. D. 2008. Intracellular organic osmolytes: Function and Regulation. *The Journal of Biological Chemistry.* 283(12):7309-7313. DOI: 10.1074/jbcR700042200.
 - Castillo, M. 1992. Sucrose metabolism in bean plants under water deficit. *Journal of Experimental Botany.* 43:1557-1561. DOI: 10.1093/jxb/43.12.1557.
 - Ceusters, J., Broland, A. M., Londers, E., Verdoodt, V., Godts, C. y Proft, M. P. 2009. Differential usage of storage carbohydrates in the CAM bromeliad *Aechmea 'Maya'* during acclimation to drought and recovery from dehydration. *Physiologia Plantarum.* 135:174-184. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2008.01186.x
 - Chaves, M. M., Flexas, J. y Pinheiro, C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany.* 103:551-560. DOI: 10.1093/aob/mcn125.
 - Chen, X., Li, W., Lu, Q., Wen, X. y Li, H. 2011. The xanthophyll cycle and antioxidative defense system are enhanced in the wheat hybrid subjected to high light stress. *Journal of Plant Physiology.* 168:1828-1836. doi:10.1016/j.jplph.2011.05.019.
 - Choudhary, N. L.; Sairam, R. K. y Tyagi, A. 2005. Expression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene during drought in rice (*Oryza sativa L.*). *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics.* 42:366-370.
 - Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M. y Shinozaki, K. 2011. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *Bio Med Central Plant Biology.* 11:163-177. DOI: 10.1186/1471-2229-11-163.
 - Cristescu, M., Anton, D., Nicu, C. y Manda, M. 2010. Study concerning the behaviour to water stress of some succulent flower plants. *Universitatea Din Craiova-Biologie,*



Horticultură, Tehnologia prelucrării produselor agricole, Ingineria mediului. 15(49):211-220.

- Cushman, J. C. 2001. Osmoregulation in plants: implications for agriculture. *American Zoologist*. 41:758-769. DOI: 10.1093/icb/41.4.758.
- Delatorre-Herrera, J., Delfino, I., Salinas, C., Silvia, H., Cardemil, L. 2010. Irrigation restriction effects on water use efficiency and osmotic adjustment in Aloe Vera plants (*Aloe barbadensis* Miller). *Agricultural Water Management*. 97:1564-1570. DOI: 10.1016/j.agwat.2010.05.008.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 38:350-356. DOI: 10.1021/ac60111a017.
- ElSayed, I. A., Rafudeen, S. M. y Gollack, D. 2014. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress. *Plant Biology*. 16:1-8. DOI: 10.1111/plb.12053.
- Finkelstein, R. R., Gibson, S. I. 2001. ABA and sugar interactions regulating development: crosstalk or voices in a crowd?. *Current Opinion in Plant Biology*. 5:26-32. DOI: 10.1016/S1369-5266(01)00225-4.
- Fu, J., Huang, B., Fry, J. 2010. Osmotic potential, sucrose level, and activity of sucrose metabolic enzymes in tall fescue in response to deficit irrigation. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 135(6):506-510.
- Funck, D., Stadelhofer, B. y Koch, W. 2008. Ornithine- δ -aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *Bio Med Central Plant Biology*. 8:40. DOI: 10.1186/1471-2229-8-40.
- Furini, A., Koncz, C., Salamini, F. y Bartels, D. 1994. Agrobacterium mediated transformation of the desiccation tolerant plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell Reports*. 14:102-106. DOI: 10.1007/BF00233770.
- González, M. S., Perales, V. H., Salcedo, A. M. O. 2008. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*. 27(4):119-129.



- Good, A. G. y Zaplachinski, S. T. 1994. The effects of drought stress on free amino-acid accumulation and protein-synthesis In *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum*. 90:9-14. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1994.tb02185.x.
- Habibi, G. y Hajiboland, R. 2011. Comparison of water stress and UV radiation effects on induction of cam and antioxidative defense in the succulent *Rosularia elymaitica* (*CRASSULACEAE*). *Acta Biológica Cracoviensia*. 53(2):15-24. DOI: 10.2478/v10182-011-0020-5.
- Hare, P. D. y Cress, W. A., 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plant. *Plant Growth Regulation*. 21:79-102. DOI: 10.1023/A:1005703923347.
- Hare, P. D., Cress, W. A. y Van Standen, J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell and Environment*. 21:535–553. DOI: 10.1046/j.1365-3040.1998.00309.x.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, S. A., Pichtel, J. y Ahmad, A. 2012. Role of proline under changing environments. *Plant Signaling and Behavior*. 7(11):1456-1466. DOI: 10.4161/psb.21949.
- Hernández-González, O. y Briones, V. O. 2007. Crassulacean acid metabolism photosynthesis in columnar cactus seedlings during ontogeny: the effect of light on nocturnal acidity accumulation and chlorophyll fluorescence. *American Journal of Botany*. 94(8):1344-1351. DOI: 10.3732/ajb.94.8.1344.
- Herrera, A. 2009. Crassulacean acid metabolism and fitness under water deficit stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM good for?. *Annals of Botany*. 103:645-653. DOI: 10.1093/aob/mcn145.
- Hoekstra, F. A., Golovina, E. A. y Buitink, J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*. 6:431-438. DOI: 10.1016/S1360-1385(01)02052-0.
- Kato, M. C., Hikosaka, K., Hirotsu, N., Makino, A. y Hirose, T. 2003. The excess light energy that is neither utilized in photosynthesis nor dissipated by photoprotective mechanisms determines the rate of photoinactivation in photosystem II. *Plant and Cell Physiology*. 44(3):318-325. DOI: 10.1093/pcp/pcg045.



- Kavi, K. P. B., Zonglie, H., Guo-Hua, M., Chein-An, A. H. y Desh, P. S. V. 1995. Overexpression of Δ -Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*. 108:1387-1394. DOI: 10.1104/pp.108.4.1387.
- Keller, F. y Ludlow, M. M. 1993. Carbohydrate metabolism in drought stressed leaves of Pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Journal of Experimental Botany*. 44:1351-1359.
- Keunen, E., Peshev, D., Vangronsveld, J., Ende, W. V. D. y Cuypers, A. 2013. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *Plant, Cell and Environment*. 36:1242-1255. DOI: 10.1111/pce.12061.
- Kumar, S. A. y Venkateswarlu, B. 2011. Abiotic stress in plants – mechanisms and adaptations. Ed. In Tech. Croacia. 440 pp. DOI: 10.5772/895
- Lara, V. M., Drincovich, F. M. y Andreo, S. C. 2010. Transiciones metabólicas en la fijación fotosintética del carbón en plantas del género *Portulaca*. En: González, R. J. L. y Chueca, S. A. C4 y CAM. Características generales y uso en programas de desarrollo de tierras áridas y semiáridas. Ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid. pp 43-55.
- Leopold, A. C., Sun, W. Q. y Bernal-Lugo, L. 1994. The glassy state in seeds: Analysis and function. *Seed Science Research*. 4:267-274. DOI: 10.1017/S0960258500002294.
- Lin, Q., Abe, S., Nose, A., Sunami, A. y Kawamitsu. 2006. Effects of high night temperature on crassulacean acid metabolism (CAM) photosynthesis of *Kalanchoë pinnata* y *Ananas comosus*. *Plant Production Science*. 9(1):10-19. DOI: 10.1626/pps.9.10.
- López-Galindo, F., Muñoz-Iniestra, D., Hernández-Moreno, M., Soler-Aburto, A., Castillo-López, M. y Hernández-Arzate, I. 2003. Análisis integral de la toposecuencia y su influencia en la distribución de la vegetación y la degradación de suelo en la Subcuenca de Zapotitlán Salinas, Puebla. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. 56:19-41.
- Maggio, A., Miyazaki, S., Veronese, P., Fujita, T., Ibeas, J. I., Damsz, B., Narasimhan, M. L., Hasegawa, P. M., Joly, R. J., Bressan, R. A. 2002. Does proline accumulation



play an active role in stress-induced growth reduction?. *Plant Journal*. 31:699–712. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2002.01389.x.

- Mahalingam, R. 2015. Combined stresses in plants: Physiological, molecular and biochemical aspects. Ed. Springer. EUA. pp 129. DOI: 10.1007/978-3-319-07899-1.
- Mattioli, R., Costantino, P. y Trovato, M. 2009. Proline accumulation in plants, not only stress. *Plant Signaling and Behavior*. 4(11):1016-1018. DOI: 10.4161/psb.4.11.9797.
- Mohammadkhani, N. y Heidari, Reza. 2008. Drought-induced Accumulation of Soluble Sugars and Proline in Two Maize Varieties. *World Applied Sciences Journal*. 3(3):448-453.
- Müller, T., Lentzsch, P. y Müller, M. E. H. 2012. Carbohydrate dynamics in leaves of rapeseed (*Brassica napus*) under drought. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 198(2012):207-2017. DOI: 10.1111/j.1439-037X.2011.00502.x.
- Näsholm, T., Sandberg, G. y Ericsson, A. 1987. Quantitative analysis of amino acid in conifer tissues by high performance liquid chromatography and fluorescence detection of their g-fluorenylmethyl chloroformate derivatives. *Journal of Chromatography*. 396:225-236. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)94060-9.
- Nilsen, E.T. y D.M. Orcutt. 1996. *Physiology of plants under stress. Abiotic factors*. John Wiley and Sons, New York, NY. 704 pp.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y. y Shigeoka, S. 2008. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology*. 147:1251-1263. DOI: 10.1104/pp.108.122465.
- Nobel, P. S. y De la Barrera, E. 2002. High temperatures and net CO₂ uptake, growth and stem damage for the hemiepiphytic cactus *Hylocereus undatus*. *Biotropical*. 34(2):225-231.
- Pardha, S. P., Alia, Sandeep, A. y Prasad, K. V. S. K. 1995. Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. *Biochemical and Biophysical research Communications*. 209(1):1-5. DOI: 10.1006/bbrc.1995.1461.
- Parsons, P. A. 2005. Environments and evolution: interactions between stress, resource inadequacy and energetic efficiency. *Biological Reviews*. 80:589-610. DOI: 10.1017/S1464793105006822.



- Piña-Poujol, P., Valverde, T., Reyes-Santiago, J. 2007. Propagación de la especie en peligro de extinción *E. laui* con fines de conservación. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 52 (1): 4-19.
- Polavarapu, B. K. K. y Nese, S. 2014. Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue?. *Plant, Cell and Environment*. 37(2):300-311. DOI: 10.1111/pce.12157.
- Poschenrieder, C., Cabot, C., Martos, S., Gallego, B. y Barceló, J. 2013. Do toxic ions induce hormesis in plants?. *Plant Science*. 212:15-25. DOI: 10.1016/j.plantsci.2013.07.012.
- Ralph, P. J., Gademann, R. 2005. Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquatic Botany*. 82:222-237. DOI: 10.1016/j.aquabot.2005.02.006.
- Redondo-Gómez, S. 2013. Abiotic and biotic stress tolerance in plant. En: Rout, G. R. y Das, A. B. *Molecular stress physiology of plants*. Ed. Springer. India. pp 1-15. DOI: 10.1007/978-81-322-0807-5_1.
- Reyero, S. M. R. 2014. El papel de la cera en la acumulación de ácidos orgánicos, fotosíntesis y dinámica estomática en *E. laui* (*CRASSULACEAE*). Tesis Maestría en Ciencias Biológicas. UNAM. México. 121 pp.
- Reyes-Santiago J., Brachet, I. C., Pérez, C. J. y Gutiérrez de la Rosa, A. 2004. *Cactáceas y Otras Plantas nativas de la cañada Cuicatlán, Oaxaca*. Ed. Sociedad Mexicana de Cactología. A. C. México. 196 pp.
- Roosens, N. H., Bitar, F. A., Loenders, K., Angenon, G. y Jacobs, M. 2002. Overexpression of ornithine- δ -aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. *Molecular Breeding*. 9:73-80. DOI: 10.1023/A:1026791932238.
- Routley, D. G. 1966. Proline accumulation in wilted ladino clover leaves. *Crop Science*. 6:358-361. DOI: 10.2135/cropsci1966.0011183X000600040019x.
- Rózsavölgyi, T., Lehoczki, E. y Mihalik, E. 2005. Preliminary studies on some chlorophyll fluorescence parameters in crassulaceae species of different leaf characters under water stress. *Acta Biologica Szegediensis*. 49(1-2):223-225.



- Salama, H. M. H., Watban, A. A. A., y Al-Funghom, A. T. 2011. Effect of ultraviolet radiation on chlorophyll, carotenoid, protein and proline contents of some annual desert plants. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 18:79-86. DOI: 10.1016/j.sjbs.2010.10.002.
- Samaras, Y., Bressan R. A., Csonka L.N., Garcia-Rios M., Paino D'Urzo M. y Rhodes D.1995. Proline accumulation during drought and salinity. En: Smirnov, N. *Environment and plant metabolism*. Ed. Bios Scientific Publishers. Oxford. pp 161-187.
- Sayed, O. H., Earnshaw, M. J. y Cooper, M.1994. Growth, water relations, and CAM induction in *Sedum album* in response to water stress. *Biologia Plantarum*. 36(3):383-388. DOI: 10.1007/BF02920936.
- Sengupta, S., Mukherjee, S., Basak, P. y Majumder, L. 2015. Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Frontiers in Plant Science*. 6:656. DOI: 10.3389/fpls.2015.00656.
- Smirnov, N. y Stewart G. R. 1985. Stress metabolites and their role in coastal plants. *Vegetation*. 62:273-278. DOI: 10.1007/978-94-009-5524-0_30
- Smith, J. A. C. y Winter, K. 1996. Taxonomic distribution of crassulacean acid metabolism. En: *Crassulacean Acid Metabolism: Biochemistry, Ecophysiology and Evolution*. Ed. Springer-Verlag, Berlin. 114:427–436. DOI: 10.1007/978-3-642-79060-7_27.
- Stimson, H. C., Breshears, D. D., Ustin, S. L. y Kefauver, S. C. 2005. Spectral sensing of foliar water conditions in two co-occurring conifer species: *Pinus edulis* and *Juniperus monosperma*. *Remote Sensing of Environment*. 96:108-118. DOI: 10.1016/j.rse.2004.12.007.
- Sultana, H., Onodera, R., Or-Rashid, M. M. y Wadúd, S. 2001. Convenient method for the determination of arginine and its related compounds in rumen fluid by reserved phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 755:321-329. DOI: 10.1016/S0378-4347(01)00137-2.
- Szabados, L. y Savouré, A. 2009. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*. 15(2):89-97. DOI: 10.1016/j.tplants.2009.11.009.



- Szarek, S., Ting, I. 1975. Photosynthetic efficiency of CAM plants in relation to C3 and C4 plants. En: Marcelle R. Environmental and Biological Control of Photosynthesis. Ed. Springer Netherlands. Bélgica. pp 289-298. DOI: 10.1007/978-94-010-1957-6.
- Székely, G., Ánrahám, E., Cséplő, A., Rigó, G., Zsigmond, L., Csiszár, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jásik, J., Schmelzer, E., Koncz, C. y Szabados, L. 2008. Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. The Plant Journal. 53:11-28. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03318.x.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2010. Plant Physiology. Ed. Sinauer Associates Inc. 5a. EUA. 782 pp.
- Teeri, J. A., Turner, M., y Gurevitch, J. 1986. The response of leaf water potential and crassulacean acid metabolism to prolonged drought in *Sedum rubrotinctum*. Plant Physiol. 81:678-680. DOI: 10.1104/pp.81.2.678.
- Teriz, R. y Kadiolglu, A. 2006. Drought stress tolerance and the antioxidant enzyme system in *Ctenanthe setosa*. Acta Biologica Cracoviensia, Series Bot. 48(2):89-96.
- Treichel, S., Brinckmann, E., Scheitler, B., y Von Willert, D. J. 1984. Occurrence and changes of proline content in plants in the southern Namib Desert in relations to increasing and decreasing drought. Planta. 162:236-242. DOI: 10.1007/BF00397445.
- Trovato, M., Mattioli, R. y Constantino, P. 2008. Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. Rendiconti Lincei. 19:325-346. DOI: 10.1007/s12210-008-0022-8.
- Urano, K., Maruyama, K., Ogata, Y., Morishita, Y., Takeda, M., Sakurai, N., Suzuki, H., Saito, K., Shibata, D., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. 2009. Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. The Plant Journal. 57:1065-1078. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03748.x.
- Vélez, R. A. I. 2007. Respuestas fisiológicas y moleculares al estrés por sequía de plántulas de *Parkinsonia praecox* (Ruiz y Pav.) Hawkins (*Fabaceae: Caesalpinioideae*). Tesis licenciatura. UNAM. México. 66 pp.
- Verslues, P. E., Sharma, S. 2010. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. The Arabidopsis Book. 8:01-23. DOI: 10.1199/tab.0140.



- Voetberg, G. S. y Sharp, R. E. 1991. Growth of maize primary root at low water potential III. Roles of increased proline deposition in osmotic adjustment. *Plant Physiol.* 96:1125-1230. DOI: 10.1104/pp.96.4.1125.
- Yoshiba, Y., Kiyosure, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. 1997. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant cell Physiol.* 38(10):1095-1102.
- Yoshihiro, I. 2012. Postharvest Stress Treatments in Fruits and Vegetables. En: Parvaiz, A. y Prasad, M. N. V. *Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability*. Ed. Springer Science+Business Media. EUA. pp 347-358. DOI: 10.1007/978-1-4614-0634-1_1.
- Zhu, J. K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science.* 6:66–71. DOI: 10.1016/S1360-1385(00)01838-0.



ANEXO



**Cuadro 1.- Concentración de prolina, azúcares solubles y valor del potencial hídrico en plantas sometidas a estrés de corto plazo.**

Horas	0	24	26	31	48	50	55
Prolina ($\mu\text{g/g}$ de Tejido seco)	53.5 ± 10.2	40.3 ± 2.5	98.9 ± 17.2	96.2 ± 22.5	124.9 ± 10	134.3 ± 44.7	169.2 ± 62.4
Azúcares solubles (mg/g de Tejido seco)	86.6 ± 31	162.4 ± 32.2	191.4 ± 62	186.84 ± 6.5	205.1 ± 97.2	167.1 ± 44	215.7 ± 51.5
Potencial hídrico (MPa)	-0.20 ± 0.01	-0.22 ± 1.96	-0.22 ± 1.96	-0.29 ± 0.03	-0.21 ± 0.01	-0.28 ± 0.03	-0.259 ± 0.05

Las plantas fueron mantenidas en una cámara de crecimiento a 44°C , intensidad de luz $190/334/190 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperiodo 2/8/2 h y humedad relativa de 9.6 - 42.5%. Medias \pm error estándar (una vez, $n = 3$).

**Cuadro 2.- Concentración de prolina en plantas sometidas a estrés por privación de riego y gradiente de temperatura en un plazo largo.**

		Días	0	4	8	12	16	20
μg/g de tejido seco	24°C	R	14.5 ± 1.7 ^a	13.2 ± 1.5 ^{ac}	15.6 ± 1 ^{ac}	15.9 ± 1.7 ^a	14.6 ± 1.4 ^{ad}	16.4 ± 2 ^a
		S	20.9 ± 4.5 ^a	16 ± 3.8 ^a	26.3 ± 7.1 ^a	19.5 ± 2 ^a	24 ± 7.1 ^{ac}	23.2 ± 5.4 ^a
	34°C	R	5.9 ± 0.4 ^b	13.9 ± 1.4 ^{cd}	15.2 ± 1.6 ^{cd}	10 ± 1.2 ^{bc}	18.3 ± 2.4 ^d	16.5 ± 2.2 ^{ad}
		S	8.6 ± 1.2 ^b	12.3 ± 1.5 ^{ab}	18 ± 1.8 ^{ac}	11 ± 1.7 ^{ab}	19 ± 1.7 ^{cd}	13.6 ± 1.1 ^{abc}
	44°C	R	18.8 ± 3.5 ^{ab}	54.7 ± 9.2 ^e	45.3 ± 5.2 ^e	-	-	-
		S	16.2 ± 1.4 ^{ab}	120.5 ± 15.9 ^f	66.3 ± 10.5 ^e	-	-	-

Plantas de *E. laui*. R: con riego, S: sin riego, dentro de una cámara de crecimiento a 24 °C, 34 °C y 44 °C. Fotoperiodo de 12 h luz con ciclos de 190/334/190 μmol m⁻² s⁻¹ y humedad relativa de 48.7 - 68.3 %. Letras diferentes representan cambios significativos entre todas las variables (temperatura, riego y tiempo; n= 10). Medias ± error estándar (una vez). Tukey P < 0.050.

**Cuadro 3.- Concentración de azúcares solubles en plantas sometidas a estrés por privación de riego y gradiente de temperatura en un plazo largo.**

		Días	0	4	8	12	16	20
mg/g de tejido seco	24°C	R	24 ± 2.9 ^{abc}	21.7 ± 3.7 ^{abc}	31 ± 2.6 ^{abc}	30.5 ± 3.2 ^a	38 ± 1.5 ^{abc}	36.2 ± 3.9 ^{abc}
		S	35.8 ± 6.4 ^{abc}	25.4 ± 3.4 ^b	36.2 ± 4.7 ^{abc}	45.7 ± 8.5 ^c	45.713 ± 5.8 ^c	40.8 ± 4.3 ^{abc}
	34°C	R	50.8 ± 5.8 ^{de}	40.1 ± 2.7 ^d	50.3 ± 9.3 ^{de}	44.8 ± 4.9 ^{a-e}	55.7 ± 10.2 ^{de}	62.7 ± 5.6 ^e
		S	38.1 ± 3.6 ^{a-d}	37.2 ± 4.9 ^{a-d}	45.5 ± 7 ^{a-e}	36.1 ± 5.3 ^{a-d}	48.9 ± 6.2 ^{a-e}	63.1 ± 6.5 ^e
	44°C	R	40.8 ± 2.9 ^{de}	42 ± 4.8 ^d	53.1 ± 3.5 ^{de}	-	-	-
		S	36.8 ± 7.5 ^{a-e}	44.3 ± 5.9 ^{a-e}	37.2 ± 4 ^{a-e}	-	-	-

Plantas de *E. laui*. R: con riego, S: sin riego, dentro de una cámara de crecimiento a 24°C, 34°C y 44°C. Fotoperiodo de 12 h luz con ciclos de 190/334/190 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y humedad relativa de 48.7 - 68.3 %. Letras diferentes representan cambios significativos entre todas las variables (temperatura, riego y tiempo; n= 10). Medias \pm error estándar (una vez). Tukey P < 0.050.

**Cuadro 4.- Potencial hídrico de plantas sometidas a estrés por privación de riego y gradiente de temperatura en un plazo largo.**

Días		0	4	8	12	16	20	
MPa	24°C	R	-0.19 ± 0.005 ^{ab}	-0.18 ± 0.004 ^a	-0.21 ± 0.003 ^{abc}	-0.21 ± 0.007 ^{bc}	-0.21 ± 0.001 ^{abc}	-0.23 ± 0.010 ^c
		S	-0.15 ± 0.007 ^d	-0.18 ± 0.007 ^{a-d}	-0.20 ± 0.005 ^{bc}	-0.20 ± 0.009 ^{bc}	-0.20 ± 0.010 ^{bc}	-0.24 ± .007 ^{ce}
	34°C	R	-0.20 ± 0.008 ^{abc}	-0.20 ± 0.008 ^{a-d}	-0.20 ± 0.009 ^a	-0.22 ± 0.006 ^{a-f}	-0.22 ± 0.008 ^{a-f}	-0.23 ± 0.008 ^{c-f}
		S	-0.18 ± 0.004 ^d	-0.18 ± 0.006 ^d	-0.21 ± 0.008 ^{a-f}	-0.23 ± 0.005 ^f	-0.22 ± 0.005 ^f	-0.22 ± 0.011 ^f
	44°C	R	-0.18 ± 0.011 ^{a-f}	-0.21 ± 0.010 ^{a-f}	-0.20 ± 0.006 ^{a-f}	-	-	-
		S	-0.20 ± 0.010 ^f	-0.20 ± 0.006 ^f	-0.21 ± 0.006 ^{a-f}	-	-	-

Plantas de *E. laui*. R: con riego, S: sin riego, dentro de una cámara de crecimiento a 24°C, 34°C y 44°C. Fotoperiodo de 12 h luz con ciclos de 190/334/190 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y humedad relativa de 48.7 - 68.3 %. Letras diferentes representan cambios significativos entre todas las variables (temperatura, riego y tiempo; n = 10). Medias \pm error estándar (una vez). Tukey P < 0.050.

**Cuadro 5.- Concentración de prolina, azúcares solubles y valor del potencial hídrico en plantas sometidas a estrés de largo plazo.**

Días		0	4	8	12	16	20
Prolina ($\mu\text{g/g}$ de tejido fresco)	B	1.2 ± 0.6	1.9 ± 0.6	1.4 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.1	1.9 ± 0.5
	M	1.5 ± 0.2	2.1 ± 0.5	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.4	1.4 ± 0.4	1.8 ± 0.1
	A	1.7 ± 0.9	1.5 ± 0.3	0.8 ± 0.1	2.6 ± 0.4	1.4 ± 0.4	1.6 ± 0.1
Azúcares solubles (mg/g de tejido seco)	B	$38.8 \pm 7.4^{\text{ab}}$	$25.6 \pm 2.3^{\text{ab}}$	$31.8 \pm 4.1^{\text{ab}}$	$34.6 \pm 5.2^{\text{ab}}$	$42.2 \pm 6.8^{\text{bc}}$	$23.3 \pm 3^{\text{a}}$
	M	$38.4 \pm 3.5^{\text{a}}$	$18.7 \pm 1.7^{\text{b}}$	$22.2 \pm 2.5^{\text{ab}}$	$29.7 \pm 3.8^{\text{ab}}$	$38.1 \pm 6.3^{\text{ac}}$	$26.2 \pm 3.1^{\text{ab}}$
	A	$42.9 \pm 7.8^{\text{a}}$	$21.8 \pm 1.9^{\text{b}}$	$30.4 \pm 3.1^{\text{ab}}$	$32.2 \pm 3.3^{\text{ab}}$	$47.1 \pm 2.3^{\text{ac}}$	$33.7 \pm 4.6^{\text{ab}}$
Potencial hídrico (MPa)	B	-0.18 ± 0.019	-0.18 ± 0.010	-0.20 ± 0.008	-0.18 ± 0.010	-0.19 ± 0.007	-0.20 ± 0.009
	M	-0.17 ± 0.010	-0.18 ± 0.012	-0.20 ± 0.009	-0.19 ± 0.011	-0.20 ± 0.014	-0.19 ± 0.011
	A	-0.19 ± 0.011	-0.20 ± 0.01	-0.22 ± 0.014	-0.19 ± 0.007	-0.21 ± 0.011	-0.23 ± 0.017

Las plantas de *E. laui*, fueron mantenidas en una cámara de crecimiento a 24°C. Fotoperiodo de 12/12 h luz/obscuridad y humedad relativa de 44.15 - 63.1 %. B: $100.20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, M: $202.12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, A: $483.25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Letras diferentes en azúcares solubles representan cambios significativos entre todas las variables (flujo fotónico y tiempo), los dos bloques restantes (prolina y potencial hídrico) no presentaron diferencias significativas. Medias \pm error estándar (una vez), n = 10. Tukey P < 0.050.



Cuadro 6.- Acumulación de osmolitos y potencial hídrico en *E. laui* en respuesta a diferentes condiciones de estrés abiótico (riego, temperatura y luz) en un plazo largo.

Tratamientos		R	S
Prolina ($\mu\text{g/g}$ de Tejido fresco)	IN	1.6 ± 0.2^a	1.4 ± 0.3^a
	B	1.8 ± 0.5^a	3 ± 0.7^{ab}
	A	27.7 ± 11.4^b	22.5 ± 7.8^b
Azúcares solubles (mg/g de Tejido seco)	IN	21 ± 4.7^a	16 ± 6.3^a
	B	18.2 ± 2.6^a	48.8 ± 4.8^a
	A	70.4 ± 21.9^b	98.3 ± 10.5^b
Potencial hídrico (MPa)	IN	-0.18 ± 0.026^a	-0.21 ± 0.005^{ac}
	B	-0.16 ± 0.015^a	-0.25 ± 0.026^c
	A	-0.27 ± 0.028^b	-0.41 ± 0.02^d

Plantas en el vivero "La Iberia" en Cuicatlán Oax. A: Cielo abierto, B: Bajo sombra, IN: Invernadero, R: Riego (cada 3 días a saturación) y S: sin riego. Letras diferentes en cada una de las determinaciones (prolina, azúcares solubles y potencial hídrico) representan cambios significativos entre todas las variables (lugar de crecimiento y riego). Medias \pm error estándar (una vez). Prolina (n = 4), azúcares solubles y potencial hídrico (n = 3). Tukey P < 0.050.

**Cuadro 7.- Concentración de prolina en plantas provenientes de tratamientos en campo sometidas a estrés por temperatura en un corto plazo.**

Horas		0	24	48	72	96	120
Con Riego	INR	14.3 ± 2.1	18.3 ± 2.8	18.8 ± 2.6	17.7 ± 2.2	19.2 ± 1.9	24.2 ± 6.9
	BR	13.5 ± 2.2	23.2 ± 1.7	39.9 ± 6	28.7 ± 3.1	39.9 ± 5.6	38.6 ± 4.3
	AR	22.9 ± 1.6	37.4 ± 9.4	53.9 ± 13.7	54.3 ± 10.6	62.4 ± 10.8	57.4 ± 11.1
Sin Riego	INS	24.4 ± 8.7	27.2 ± 3.1	36.7 ± 7.7	32.1 ± 6	54.7 ± 15.2	55.2 ± 13.3
	BS	16.8 ± 2.4	25.9 ± 2.4	40 ± 4.3	34.1 ± 5.4	42.4 ± 5.3	53.2 ± 10.3
	AS	43.6 ± 5.8	55.4 ± 10.5	56.4 ± 8.9	75.6 ± 21.4	113.8 ± 37.1	77 ± 19.6

Plantas que fueron colocadas dentro de una cámara de crecimiento a 44°C, fotoperiodo de 12 h luz con ciclos de 190/334/190 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y humedad relativa de 28 - 61.8 %. Las plantas provenían de un tratamiento previo de 4 meses en Cuicatlán Oax. A: Cielo abierto, B: Bajo sombra, IN: Invernadero. Los Datos se expresan en $\mu\text{g/g}$ de tejido seco. Medias \pm error estándar (una vez). Sin diferencias significativas ($n = 6$). ANOVA de dos factores $\alpha < 0.050$.

**Cuadro 8.- Concentración de azúcares en plantas provenientes de tratamientos en campo sometidas a estrés por temperatura en un corto plazo.**

Horas		0	24	48	72	96	120
Con Riego	INR	8.1 ± 1.5 ^a	6.8 ± 2.3 ^a	12.6 ± 4.9 ^a	22.6 ± 1.7 ^{ab}	19.5 ± 4.7 ^{ab}	21.5 ± 2.5 ^{ac}
	BR	9.4 ± 1.4 ^a	2.7 ± 2.3 ^a	10.7 ± 3.3 ^{ab}	23.2 ± 3.5 ^b	23.9 ± 4.1 ^b	16.7 ± 0.8 ^{ab}
	AR	15.8 ± 3.7 ^a	10.2 ± 2.3 ^a	23.6 ± 6 ^{abc}	28.6 ± 2.9 ^{abc}	25.8 ± 5.1 ^{abc}	36.4 ± 13.1 ^{c-f}
Sin Riego	INS	14.4 ± 3.6 ^a	9.3 ± 7.4 ^a	10.5 ± 3.7 ^a	35.7 ± 4.6 ^{cd}	34 ± 1.9 ^{cd}	22.8 ± 2.3 ^{a-d}
	BS	16.5 ± 1.9 ^{abc}	9.9 ± 2.7 ^{ac}	17.3 ± 2.8 ^{abc}	37.3 ± 4.7 ^d	28.9 ± 3.9 ^{bd}	27.3 ± 3.4 ^{cd}
	AS	24.9 ± 2.3 ^{abc}	15.6 ± 5.5 ^{ab}	27.2 ± 5.9 ^{b-e}	54.3 ± 7.5 ^f	35.7 ± 4.9 ^{c-f}	43.8 ± 5 ^{ef}

Plantas que fueron colocadas dentro de una cámara de crecimiento a 44°C, fotoperiodo de 12 h luz con ciclos de 190/334/190 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y humedad relativa de 28 - 61.8 %. Las plantas provenían de un tratamiento previo de 4 meses en Cuicatlán Oax. A: Cielo abierto, B: Bajo sombra, IN: Invernadero. Los Datos se expresan en mg/g de tejido seco. Medias \pm error estándar (una vez). Letras diferentes representan cambios significativos entre todas las variables (lugar de crecimiento y riego; n = 6). Tukey P < 0.050.

**Cuadro 9.- Potencial hídrico en plantas provenientes de tratamientos en campo sometidas a estrés por temperatura en un corto plazo.**

Horas		0	24	48	72	96	120
Con Riego	INR	-0.21 ± 0.011 ^a	-0.21 ± 0.011 ^a	-0.20 ± 0.007 ^a	-0.23 ± 0.002 ^a	-0.23 ± 0.025 ^a	-0.21 ± 0.005 ^a
	BR	-0.18 ± 0.008 ^a	-0.18 ± 0.014 ^a	-0.22 ± 0.014 ^{ac}	-0.23 ± 0.009 ^a	-0.23 ± 0.021 ^a	-0.22 ± 0.017 ^a
	AR	-0.30 ± 0.038 ^c	-0.28 ± 0.03 ^c	-0.27 ± 0.021 ^c	-0.29 ± 0.024 ^{ac}	-0.27 ± 0.021 ^{ac}	-0.27 ± 0.024 ^{ac}
Sin Riego	INS	-0.20 ± 0.005 ^{ab}	-0.20 ± 0.006 ^{ab}	-0.22 ± 0.011 ^{ab}	-0.24 ± 0.006 ^{ab}	-0.22 ± 0.005 ^{ab}	-0.22 ± 0.007 ^a
	BS	-0.24 ± 0.011 ^b	-0.25 ± 0.016 ^b	-0.26 ± 0.008 ^b	-0.29 ± 0.17 ^b	-0.28 ± 0.013 ^b	-0.29 ± 0.02 ^b
	AS	-0.41 ± 0.017 ^d	-0.44 ± 0.54 ^d	-0.43 ± 0.016 ^d	-0.43 ± 0.011 ^d	-0.44 ± 0.017 ^d	-0.41 ± 0.034 ^d

Plantas que fueron colocadas dentro de una cámara de crecimiento a 44°C, fotoperiodo de 12 h luz con ciclos de 190/334/190 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y humedad relativa de 28 - 61.8 %. Las plantas provenían de un tratamiento previo de 4 meses en Cuicatlán Oax. A: Cielo abierto, B: Bajo sombra, IN: Invernadero. Los datos se expresan en mega pascales (MPa). Medias \pm error estándar (una vez). Letras diferentes representan cambios significativos entre todas las variables (lugar de crecimiento, riego y tiempo; n = 6). Tukey P < 0.050.