



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN  
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**FISIOLOGÍA VEGETAL**

**Cambios en la fotoquímica, intercambio de gases y crecimiento por estrés hídrico y recuperación de una planta tipo C<sub>3</sub> y una MAC**

**HUITZIMÉNGARI CAMPOS GARCÍA**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**D O C T O R   E N   C I E N C I A S**

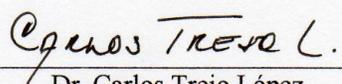
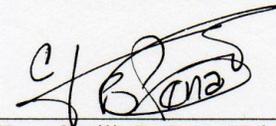
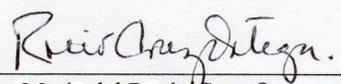
**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2012**

La presente tesis titulada “Cambios en la fotoquímica, intercambio de gases y crecimiento por estrés hídrico y recuperación de una planta tipo C<sub>3</sub> y una MAC”, realizada por el alumno **HUITZIMÉNGARI CAMPOS GARCÍA**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS**  
**RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**  
**FISIOLOGÍA VEGETAL**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO	 _____ Dr. Carlos Trejo López
ASESORA	 _____ Dra. Cecilia B. Peña Valdivia
ASESOR	 _____ Dr. Rodolfo García Nava
ASESORA	 _____ Dra. María del Rocío Cruz Ortega
ASESOR	 _____ Dr. F. Víctor Conde Martínez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2012

## Resumen

La disponibilidad limitada de agua es el principal factor ambiental que limita el crecimiento de las plantas y su rendimiento, aunado al cambio climático puede ocasionar que la escasez de agua se vuelva una limitante aún mayor de la productividad de las plantas. Las limitaciones en el crecimiento de las plantas impuestas por el déficit de agua se deben en gran medida a la reducción del balance de carbono, que es dependiente de la fotosíntesis. El conocimiento actual de las limitaciones fisiológicas de la fotosíntesis durante periodos de déficit de agua y su recuperación es escaso, pero crucial para mejorar el entendimiento de la respuesta de las plantas a la sequía y para definir esquemas de riego que permitan ahorrar agua en la agricultura. Este estudio contribuye al entendimiento del estrés por déficit de humedad en las plantas y su recuperación, desde un punto de vista fisiológico, examinando las relaciones fundamentales entre la toma de carbono, el crecimiento y la pérdida de agua. Además de una revisión general, se presenta una revisión del concepto de estrés, fotosíntesis y fluorescencia de clorofila para cuantificar el comportamiento fotosintético (Capítulo II); se prueba el efecto de la disminución en el potencial de agua en la germinación, crecimiento inicial y estabilidad de las membranas de la raíz de *Agave lechuguilla* y *A. salmiana* para establecer límites y requerimientos hídricos de estas suculentas de zonas áridas y semiáridas (Capítulo III); se estudia la regulación de la fotosíntesis en condiciones de estrés hídrico y su recuperación en chile pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.), con metabolismo fotosintético  $C_3$  (Capítulo IV). Los resultados mostraron que el movimiento de los acarreadores de electrones fotosintéticos, que llevan a la reducción de los aceptores de electrones finales, fue disminuido por el estrés y junto con las regulaciones estomáticas y del metabolismo fotosintético limitaron de manera importante la asimilación de carbono. La recuperación de la fotosíntesis después del riego estuvo limitada principalmente por el cierre estomático y la restauración lenta de actividad de la cadena de transporte de electrones fotosintética. En el Capítulo V se describe un estudio realizado con plantas de *A. salmiana* con metabolismo ácido de Crasuláceas, sometidas a suspensión de riego para inducir estrés por déficit de humedad, seguida de riego de recuperación. El análisis de fluorescencia OJIP reveló la aparición de una banda L y K lo que interpretamos como pérdida de la conectividad energética entre las unidades del fotosistema II (FSII) y limitaciones en el complejo productor de oxígeno. El abatimiento de la actividad fotoquímica ocurrió principalmente a través de la inactivación de los centros de reacción del FSII (transformación a pozas de calor) y a un aumento en el tamaño de la antena funcional. Los resultados sugieren que la disipación térmica del exceso de energía puede ser un mecanismo adaptativo importante para proteger el aparato fotosintético del fotodaño, que permite a las plantas jóvenes de *A. salmiana* sobrevivir durante el estrés hídrico y preservar la integridad del aparato fotosintético, lo que posibilita su recuperación con el riego posterior. En el Capítulo VI se describe un estudio con plantas de *C. annuum* con estrés por déficit de humedad, mediante la reducción del riego. Las evaluaciones se hicieron a intervalos durante la ausencia de riego para obtener un gradiente del estrés. Los resultados mostraron la disminución progresiva del potencial de agua del suelo y de la hoja con el tiempo de suspensión de riego, de la tasa de asimilación de  $CO_2$  ( $A$ ), la conductancia estomática ( $g_s$ ) y la transpiración de la hoja. La correlación directa detectada entre el parámetro  $PI_{total}$  de la prueba JIP,  $A$  y  $g_s$ , demuestra que la detección temprana del estrés hídrico puede ser una guía para la realización de los riegos.

## Abstract

Low water availability is the main environmental factor limiting plant growth and yield worldwide. In addition to global climate change will probably make water scarcity an even greater limitation to plant productivity across agriculture systems. The limitation of plant growth imposed by low water availability is mainly due to reductions of plant carbon balance, which is largely dependent on photosynthesis. Current knowledge about physiological limitations to photosynthesis during developing of water deficit and recovery after re-watering is scarce, but crucial to improve the understanding of plant responses to drought and for the development of water-saving irrigation schedules in agriculture. This thesis contributes to our understanding of how plants respond to water stress and recovery, taking particularly a physiological point of view, examining the underlying relationships among carbon uptake, growth and water loss. In addition to a general review, a revision of stress concept, photosynthesis, and the use of chlorophyll fluorescence to assess photosynthetic performance are submitted (Chapter II); the effect of low water potential on seed germination, seedling root growth and root membrane stability of *Agave lechuguilla* and *Agave salmiana* to establish thresholds of water requirements for these arid and semi-arid succulents are treated (Chapter III); it's address a study to examine the mechanism which photosynthesis is regulated during water stress and recovery in the C<sub>3</sub> bell pepper (*Capsicum annuum* L.) plant (Chapter IV). The results showed that the movement of photosynthetic electron carriers leading to the reduction of end electron acceptors was reduced by water stress and together with stomatal regulation and photosynthetic metabolism imposed an important limitation on carbon assimilation. Photosynthesis recovery after re-watering was mostly limited by both stomatal closure and slow restoration of the photosynthetic electron transport chain. In Chapter V a study was performed with *A. salmiana* plants (a Crassulacean acid metabolism plant) with water-withholding to induce water stress, followed by re-watering to induce recovery. Analysis of OJIP transients revealed the appearance of an L and K-band suggesting a lost on the energetic connectivity between PSII units and a limitation of the oxygen evolving complex. Down-regulation of photochemical activity occurred predominantly through both inactivation of PSII reaction centre's (transformation to heat sinks) and to an increase in the functional antenna size. The results suggest that thermal dissipation of excess energy may be an important adaptive mechanism to protect the photosynthetic apparatus from photodamage which enabled *A. salmiana* seedlings not only to survive during aggravating water stress but also help to preserve the integrity of the photosynthetic apparatus and recovery after re-watering. In Chapter VI a study was performed with *C. annuum* plants that were water stressed by reducing irrigation amounts. Several measurements were made at various intervals during the drought cycle to obtain a gradient of water stress situations. The results showed that as water stress increases, there was a progressive decline of both soil and leaf water potential, CO<sub>2</sub> assimilation rates (*A*), stomatal conductance (*g<sub>s</sub>*) and transpiration. A direct correlation between a JIP-test parameter PI<sub>total</sub> and important gas exchange parameters (*A* and *g<sub>s</sub>*) were shown, providing that early detection of water stress would be a useful guide to irrigation requirements.

## **Agradecimientos**

Agradezco al pueblo de México que por medio del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología me otorgó una beca para realizar mis estudios de doctorado.

*Quiero expresar mi más sincera gratitud a las siguientes personas:*

Al Dr. Carlos Trejo, mi consejero y amigo, por su guía científica y estímulo, sus discusiones motivantes, comprensión y paciencia. Siempre recordaré con aprecio el ambiente de trabajo y las facilidades que me brindó.

A la Dra. Cecilia B. Peña Valdivia por su percepción, discusiones y valiosos comentarios sobre mi trabajo y escrito.

Al Dr. Rodolfo García Nava por sus estimulantes ideas, preguntas y consejos.

A la Dra. María del Rocío Cruz Ortega por darme la oportunidad de trabajar con ella lo cual ha tenido un profundo efecto en mis estudios y en mi vida.

Al Dr. F. Víctor Conde Martínez por su apoyo y ayuda durante mis estudios.

Al Dr. Ebandro Uscanga Mortera por mostrar interés en mi investigación y por su amistad.

A la M.C. Ana Bertha Galicia y Sra. Irma del laboratorio de Fisiología Vegetal Ambiental y Biofísica por su apoyo y facilidades otorgadas durante mi trabajo en el mismo.

Quiero agradecer a todos mis amigos y colegas de los posgrados en Fisiología Vegetal, Genética, Forestal y Botánica, con quienes el trabajo diario, recesos y tiempo de sano esparcimiento fue aún más agradable. Entre tantos a Eleodoro, Sandra, Jorge, Manuel, Rocandio, Yolanda, Wuenses, Natalia, Jose, Sandra, Angélica, Fátima, Nora,... A mis compañeros de cubículo Christian, Fran, Mayra y Gisela.

Un cálido agradecimiento a mis amados padres Rodolfo y Guadalupe, a mis queridos hermanos Tonatiuh y Yuritziri junto con mi sobrina Mónica por su apoyo y aliento infinito, sin los cuales este paso en mi formación no hubiese sido posible.

A Gabriela por acompañarme durante todo este tiempo otorgándome su cariño y amor, por creer en mí y darme fuerzas para terminar este proyecto, aún en los momentos más difíciles. A mi hijo, fruto de nuestro amor.

Finalmente pero no menos importantes, quiero expresar mi gratitud a mis amigos: Rubén Alejandro, René, Ernesto, Esteban, Alejandro, Ariel y Edwin. Gracias por su amistad todos estos años.

## Contenido

Resumen .....	iii
Abstract.....	iv
Agradecimientos .....	v
Contenido .....	vi
Lista de Figuras .....	xi
Lista de Cuadros .....	xviii
Lista de Abreviaturas .....	xix
I. Introducción General.....	1
II. Revisión de Literatura.....	9
II.1. Estrés abiótico .....	9
II.1.1. Sequía, estrés hídrico y tolerancia al estrés .....	10
II.2. Relaciones Hídricas.....	11
II.3. Fotosíntesis.....	12
II.3.1. Reacciones de la fotosíntesis: fundamentos .....	13
II.3.1.1. Absorción de luz y captura .....	15
II.3.1.2. Transporte de electrones fotosintético.....	15
II.3.1.3. Síntesis de ATP .....	17
II.3.1.4. El ciclo Calvin-Benson.....	18
II.4. Fluorescencia de clorofila <i>a</i> .....	21
II.4.1. Técnicas para medir la fluorescencia de clorofila <i>a</i> .....	21
II.4.1.1. Prueba JIP .....	24
II.4.1.2. Fluorimetría de modulación de la amplitud por pulso (PAM) y la técnica de análisis de extinción .....	26
III. Efecto de la disponibilidad de agua en la germinación y crecimiento inicial de la raíz de <i>Agave lechuguilla</i> y <i>Agave salmiana</i> (Agavaceae) .....	29
III.1. Resumen.....	29
III.2. Abstract .....	30
III.3. Introducción .....	30
III.4. Materiales y Métodos.....	32
III.4.1. Material vegetal.....	32

III.4.2. Tratamientos y diseño experimental .....	33
III.4.3. Imbibición .....	34
III.4.4. Germinación .....	34
III.4.5. Ajuste de la función inversa normal.....	35
III.4.6. Crecimiento longitudinal de la raíz .....	35
III.4.7. Bondad de ajuste de los modelos .....	36
III.4.8. Biomasa seca final y estado hídrico de las plántulas .....	37
III.4.9. Liberación de electrolitos .....	37
III.4.10. Normalidad y homoscedasticidad .....	38
III.5. Resultados .....	39
III.5.1. Imbibición y germinación .....	39
III.5.2. Crecimiento inicial de la raíz .....	43
III.5.3. Biomasa seca y estado hídrico de las plántulas.....	45
III.5.4. Liberación de electrolitos por la raíz.....	45
III.6. Discusión .....	48
III.7. Conclusiones .....	54
IV. Cambios en la fotoquímica del FSII, intercambio de gases y crecimiento del chile pimiento morrón ( <i>Capsicum annuum</i> L.) por estrés hídrico y recuperación.....	56
IV.1. Resumen .....	56
IV.2. Abstract.....	57
IV.3. Introducción.....	58
IV.4. Materiales y Métodos .....	62
IV.4.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	62
IV.4.2. Tratamientos, diseño experimental y análisis estadístico .....	62
IV.4.3. Evaluación del estado hídrico del suelo y la hoja .....	63
IV.4.4. Intercambio de gases y curvas $A/C_i$ .....	64
IV.4.5. Aumento rápido de la fluorescencia de clorofila <i>a</i> .....	66
IV.4.6. Parámetros biofísicos del FSII derivados de las ecuaciones de la prueba JIP ..	66
IV.4.7. Crecimiento .....	69
IV.5. Resultados.....	69
IV.5.1. Estado hídrico del suelo y planta .....	69

IV.5.2. Cambios en las características del intercambio de gases durante el estrés hídrico y recuperación .....	70
IV.5.3. Análisis de la cinética al aumento en la concentración de CO <sub>2</sub> durante el estrés hídrico y recuperación .....	72
IV.5.4. Cambios en la fluorescencia de clorofila <i>a</i> en respuesta al estrés hídrico y recuperación .....	74
IV.5.5. Crecimiento .....	85
IV.6. Discusión .....	87
IV.7. Conclusiones .....	95
V. Relaciones hídricas, fotosíntesis y crecimiento de plántulas de <i>Agave salmiana</i> Otto ex Salm-Dyck (Agavaceae) con déficit de humedad en el suelo .....	97
V.1. Resumen .....	97
V.2. Abstract .....	98
V.3. Introducción .....	99
V.4. Materiales y Métodos .....	104
V.4.1. Material vegetal y tratamientos .....	104
V.4.2. Evaluación del estado hídrico del suelo .....	105
V.4.3. Estado hídrico de la planta .....	106
V.4.4. Intercambio de gases .....	106
V.4.5. Análisis de los datos de fluorescencia de clorofila y ecuaciones de la prueba JIP .....	107
V.4.6. Curvas de respuesta a la luz y fluorescencia modulada .....	109
V.4.7. Acidez titulable del tejido .....	111
V.4.8. Contenido de clorofilas de la hoja .....	111
V.4.9. Asignación de biomasa seca y crecimiento .....	112
V.4.10. Análisis estadístico .....	112
V.5. Resultados .....	113
V.5.1. Relaciones hídricas .....	113
V.5.2. Fluorescencia modulada y curvas de respuesta a la luz .....	115
V.5.3. Fluorescencia rápida de la clorofila <i>a</i> OJIP .....	127
V.5.4. Dinámica del intercambio de gases durante el desarrollo del estrés hídrico y recuperación .....	134

V.5.5. Contenido de clorofila en la hoja .....	140
V.5.6. Crecimiento y partición de biomasa seca .....	141
V.6. Discusión.....	142
V.6.1. Relaciones hídricas.....	142
V.6.2. Fotosíntesis durante el estrés hídrico y recuperación .....	143
V.6.3. Crecimiento durante el estrés hídrico y recuperación .....	159
V.7. Conclusiones .....	161
VI. Estudio paralelo de la asimilación de CO <sub>2</sub> y la cinética de fluorescencia OJIP en plantas de chile pimienta morrón durante estrés hídrico .....	163
VI.1. Resumen .....	163
VI.2. Abstract.....	164
VI.3. Introducción.....	164
VI.4. Materiales y Métodos .....	167
VI.4.1. Material vegetal y tratamientos.....	167
VI.4.2. Evaluación del estado hídrico del suelo .....	168
VI.4.3. Potencial de agua de la hoja.....	169
VI.4.4. Medición simultánea del intercambio de gases y fluorescencia de Chl <i>a</i> .....	169
VI.4.5. Análisis de los datos de fluorescencia de clorofila .....	170
VI.4.6. Ecuaciones de la prueba JIP – utilización de las señales de fluorescencia .....	171
VI.4.7. Análisis estadístico.....	174
VI.5. Resultados.....	174
VI.5.1. Relaciones hídricas e intercambio de gases .....	174
VI.5.2. Fluorescencia de clorofila <i>a</i> en hojas con estrés por déficit de humedad .....	177
VI.5.3. Relación entre los parámetros derivados de la prueba JIP y el intercambio de gases .....	180
VI.6. Discusión .....	186
VI.6.1. Respuesta al estrés hídrico .....	186
VI.6.2. Relación entre la fluorescencia de clorofila <i>a</i> y la fotosíntesis.....	187
VI.6.3. Relación entre la conductancia estomática y la fluorescencia de clorofila <i>a</i> ..	190
VI.6.4. El índice de desempeño PI <sub>total</sub> como una herramienta para monitorear el estrés hídrico y programar los riegos .....	193
VI.7. Conclusiones.....	194

VII. Discusión general.....	196
VII.1. Suculencia en la planta MAC en comparación con la planta C <sub>3</sub> .....	197
VII.2. Efecto del estrés hídrico en la fotosíntesis de las plantas estudiadas C <sub>3</sub> y MAC. 198	
VII.2.1. Limitaciones estomáticas.....	198
VII.2.2. Limitaciones no estomáticas: efecto en los eventos fotoquímicos .....	199
VII.2.3. Integración del efecto del estrés hídrico en la fotosíntesis .....	203
VII.3. Conclusiones finales y perspectivas futuras .....	205
Literatura Citada.....	209
Anexos.....	230

## Lista de Figuras

<b>Figura II.1.</b> Esquema Z para el transporte de electrones en la fotosíntesis, del agua a la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato NADPH <sup>+</sup> .....	14
<b>Figura II.2.</b> El ciclo de Calvin-Benson.....	19
<b>Figura II.3.</b> Reducción de la cadena del transporte de electrones y su relación con la traza OJIP.....	23
<b>Figura II.4.</b> Presentación esquemática de la prueba-JIP.....	24
<b>Figura II.5.</b> Análisis de extinción de la fluorescencia por el método de pulso de saturación en una hoja de <i>A. salmiana</i> adaptada a la oscuridad.....	27
<b>Figura III.1.</b> Germinación acumulada observada y ajustadas al modelo de distribución inversa normal (— línea continua) de <i>A. lechuguilla</i> a -0.03 (■), -0.48 (□), -1.19 (◆) y -2.04 (◇) MPa y <i>A. salmiana</i> a -0.03 (●), -0.48 (○), -1.19 (▼) y -2.04 (△) MPa ( <i>n</i> = 4).....	41
<b>Figura III.2.</b> Curvas del crecimiento longitudinal de la raíz modeladas con la ecuación de Korf sobre los valores observados en el tiempo en <i>A. lechuguilla</i> (A) y <i>A. salmiana</i> (B) en cuatro $\Psi_w$ del medio.....	44
<b>Figura III.3.</b> Liberación de electrolitos en el tiempo por las raíces de <i>A. lechuguilla</i> (A) y <i>A. salmiana</i> (B) en tres distintos $\Psi_w$ . Se muestra el promedio $\pm$ E.S. ( <i>n</i> =4).....	47
<b>Figura IV.1.</b> Efecto de la suspensión del riego en el potencial hídrico del suelo (A) y de la hoja (B) en plantas de <i>C. annuum</i> . Los puntos son el promedio $\pm$ e.e. ( <i>n</i> = 6)....	70
<b>Figura IV.2.</b> Efecto de estrés hídrico en las variables de intercambio de gases (A, tasa de asimilación de CO <sub>2</sub> ; <i>g<sub>s</sub></i> , conductancia estomática; <i>Tr</i> , transpiración). Los datos son el promedio $\pm$ e.e. ( <i>n</i> = 10).....	71
<b>Figura IV.3.</b> Tasa de asimilación neta de CO <sub>2</sub> (A) en relación a la concentración subestomática de CO <sub>2</sub> ( <i>C<sub>C</sub></i> ) en hojas de <i>C. annuum</i> en tres niveles de estrés hídrico definidos por el potencial de agua de la hoja. Los datos son las observaciones de cinco repeticiones en cada potencial de agua.....	72
<b>Figura IV.4.</b> Cambios en la cinética de inducción de fluorescencia de Chl <i>a</i> polifásica (OJIP) en hojas de <i>C. annuum</i> con riego adecuado (● -0.57 MPa) y con distintos niveles de estrés hídrico (○ -0.77, ▼ -1.27, △ -1.72). Cada curva es el promedio ( <i>n</i> = 8).....	75

<b>Figura IV.5.</b> Parámetros que cuantifican la estructura de la maquinaria fotosintética en hojas de <i>C. annuum</i> adaptadas a la oscuridad (1 h) a diferentes potenciales de agua de la hoja ( $\Psi_L$ ). Los parámetros derivados de la prueba JIP aplicada a las trazas de aumento rápido de la fluorescencia (OJIP), fueron normalizados utilizando como referencia los valores correspondientes al tratamiento testigo.....	76
<b>Figura IV.6.</b> Eficiencias para todo el flujo de energía en cascada – desde la absorción a la reducción de los aceptores finales de electrones del FSI – e índices de comportamiento en hojas de <i>C. annuum</i> adaptadas a la oscuridad (1 h) a diferentes potenciales de agua de la hoja ( $\Psi_L$ , MPa).....	78
<b>Figura IV.7.</b> Parámetros que cuantifican la estructura de la maquinaria fotosintética en hojas de <i>C. annuum</i> adaptadas a la oscuridad (1 h) posteriormente al riego de recuperación (A). Eficiencias para todo el flujo de energía en cascada – desde la absorción a la reducción de los aceptores finales de electrones del FSI – e índices de comportamiento en hojas de <i>C. annuum</i> adaptadas a la oscuridad (1 h) posteriores al riego de recuperación (B).....	82
<b>Figura IV.8.</b> Producción cuántica máxima de la fotoquímica primaria $F_V/F_M$ (●) e índice de desempeño $PI_{ABS}$ (○) normalizado con el testigo a distintos potenciales de agua (A) y posteriormente al riego de recuperación (B) en hojas de <i>C. annuum</i> .....	83
<b>Figura IV.9.</b> Cambio en la forma de las curvas de la fluorescencia de Chl <i>a</i> normalizadas entre $F_0$ y $F_K$ expresadas como $W_{OK} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$ . $\Delta W_{OK} = W_{OK(\text{tratamiento})} - W_{OK(\text{testigo})}$ donde tratamiento testigo (----), -0.60 (●), -0.77 (○), -1.27 (▼), y -1.72 (△) en A y tratamiento testigo (----), día 1 (●), día 2 (○), día 3 (▼), día 4 (△), día 7 (■) y día 10 (□) posterior al riego de recuperación en B.....	85
<b>Figura IV.10.</b> Cambio en la forma de las curvas de la fluorescencia de Chl <i>a</i> normalizadas entre $F_0$ y $F_J$ expresadas como $W_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$ . $\Delta W_{OJ} = W_{OJ(\text{tratamiento})} - W_{OJ(\text{testigo})}$ donde tratamiento testigo (----), -0.60 (●), -0.77 (○), -1.27 (▼), y -1.72 (△) en A y tratamiento testigo (----), día 1 (●), día 2 (○), día 3 (▼), día 4 (△), día 7 (■) y día 10 (□) posterior al riego de recuperación en B.....	85
<b>Figura IV.11.</b> Producción de área foliar al final del periodo experimental (A) y partición de biomasa seca al final del periodo experimental (B) en plantas de <i>C. annuum</i> en dos condiciones de humedad en el suelo. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas con $P < 0.05$ ( $n = 5$ ).....	86
<b>Figura V.1.</b> Dinámica del contenido de agua del suelo en plantas de <i>A. salmiana</i> con dos condiciones de riego. Los datos son el promedio $\pm$ e.e. ( $n = 6$ ).....	113

<b>Figura V.2.</b> Cambios en el contenido relativo de agua de la hoja de <i>A. salmiana</i> con riego y con estrés hídrico y rehidratación. Los datos son el promedio $\pm$ e.e. ( $n = 5$ )....	114
<b>Figura V.3.</b> Cambios en el potencial de agua de la hoja de <i>A. salmiana</i> con riego y con estrés hídrico y rehidratación. Los datos son el promedio $\pm$ e.e. ( $n = 6$ ).....	115
<b>Figura V.4.</b> Gráficas de la señal de fluorescencia registradas durante la realización de las curvas de respuesta rápida a la luz a cinco horas del día en hojas de <i>A. salmiana</i> con dos condiciones de riego. Cada gráfica es representativa de cuatro réplicas, con un RWC y LWP de la hoja de $92.5 \pm 1.5$ % y $-0.49 \pm 0.09$ MPa en las plantas testigo; $65.4 \pm 12.4$ % y $-0.37 \pm 0.05$ MPa en las plantas con estrés hídrico.....	116
<b>Figura V.5.</b> Gráficas de la señal de fluorescencia registradas durante la realización de las curvas de respuesta rápida a la luz a cinco horas del día en hojas de <i>A. salmiana</i> con dos condiciones de riego. Cada gráfica es representativa de cuatro réplicas, con un RWC y LWP de la hoja de $93.9 \pm 2.5$ % y $-0.40 \pm 0.08$ MPa en las plantas testigo; $38.2 \pm 7.44$ % y $-0.93 \pm 0.09$ MPa en las plantas con estrés hídrico.....	117
<b>Figura V.6.</b> Gráficas de la señal de fluorescencia registradas durante la realización de las curvas de respuesta rápida a la luz a cinco horas del día en hojas de <i>A. salmiana</i> con dos condiciones de riego. Cada gráfica es representativa de cuatro réplicas, con un RWC y LWP de la hoja de $92.5 \pm 1.4$ % y $-0.45 \pm 0.10$ MPa en las plantas testigo; $48.1 \pm 9.3$ % y $-0.48 \pm 0.10$ MPa en las plantas con un día de riego de recuperación.....	118
<b>Figura V.7.</b> Gráficas de la señal de fluorescencia registradas durante la realización de las curvas de respuesta rápida a la luz a cinco horas del día en hojas de <i>A. salmiana</i> con dos condiciones de riego. Cada gráfica es representativa de cuatro réplicas, con un RWC y LWP de la hoja de $93.9 \pm 1.1$ % y $-0.51 \pm 0.07$ MPa en las plantas testigo; $85.4 \pm 5.8$ % y $-0.53 \pm 0.10$ MPa en las plantas con 21 días de riego de recuperación.....	119
<b>Figura V.8.</b> Curvas de respuesta a la luz de la tasa aparente de transporte de electrones fotosintético (ETR) durante un ciclo diurno en plántulas de <i>A. salmiana</i> con riego y un RWC y LWP de $93.5 \pm 1.1$ % y $-0.45 \pm 0.10$ MPa (A, C, E, G); estrés hídrico medio $65.4 \pm 12.4$ % y $-0.37 \pm 0.05$ MPa (B); estrés hídrico severo $38.2 \pm 7.44$ % y $-0.93 \pm 0.09$ MPa (D); un día de riego de recuperación $48.1 \pm 9.3$ % y $-0.48 \pm 0.10$ MPa (F) y 21 días de riego de recuperación $85.4 \pm 5.8$ % y $-0.53 \pm 0.10$ MPa (H). Las curvas fueron tomadas a diferentes tiempos durante el transcurso del día: 5:00 am (●), 8:00 am (○), 12:00 pm (▼), 4:00 pm (△) y 8:00 pm (■). Los datos son el promedio de cuatro repeticiones $\pm$ e.e.....	123

**Figura V.9.** Curvas de respuesta a la luz de la extinción no fotoquímica (NPQ) durante un ciclo diurno en plántulas de *A. salmiana* con riego y un RWC y LWP de  $93.5 \pm 1.1 \%$  y  $-0.45 \pm 0.10$  MPa (A, C, E, G); estrés hídrico medio  $65.4 \pm 12.4 \%$  y  $-0.37 \pm 0.05$  MPa (B); estrés hídrico severo  $38.2 \pm 7.44 \%$  y  $-0.93 \pm 0.09$  MPa (D); un día de riego de recuperación  $48.1 \pm 9.3 \%$  y  $-0.48 \pm 0.10$  MPa (F) y 21 días de riego de recuperación  $85.4 \pm 5.8 \%$  y  $-0.53 \pm 0.10$  MPa (H). Las curvas fueron tomadas a diferentes tiempos durante el transcurso del día: 5:00 am (●), 8:00 am (○), 12:00 pm (▼), 4:00 pm (△) y 8:00 pm (■). Los datos son el promedio de cuatro repeticiones  $\pm$  e.e. .... 124

**Figura V.10.** Producción cuántica efectiva ( $\Delta F/F_m'$ ) de plantas de *A. salmiana* con riego y un RWC y LWP de  $93.5 \pm 1.1 \%$  y  $-0.45 \pm 0.10$  MPa (A, C, E, G); estrés hídrico medio  $65.4 \pm 12.4 \%$  y  $-0.37 \pm 0.05$  MPa (B); estrés hídrico severo  $38.2 \pm 7.44 \%$  y  $-0.93 \pm 0.09$  MPa (D); un día de riego de recuperación  $48.1 \pm 9.3 \%$  y  $-0.48 \pm 0.10$  MPa (F) y 21 días de riego de recuperación  $85.4 \pm 5.8 \%$  y  $-0.53 \pm 0.10$  MPa (H). Los datos fueron obtenidos entre las 0800 y 1800 h. Se ajustaron ecuaciones exponenciales de decaimiento individual a los datos ( $n = 130$ ). .... 125

**Figura V.11.** Tasa del transporte de electrones (ETR) de plantas de *A. salmiana* con riego y un RWC y LWP de  $93.5 \pm 1.1 \%$  y  $-0.45 \pm 0.10$  MPa (A, C, E, G); estrés hídrico medio  $65.4 \pm 12.4 \%$  y  $-0.37 \pm 0.05$  MPa (B); estrés hídrico severo  $38.2 \pm 7.44 \%$  y  $-0.93 \pm 0.09$  MPa (D); un día de riego de recuperación  $48.1 \pm 9.3 \%$  y  $-0.48 \pm 0.10$  MPa (F) y 21 días de riego de recuperación  $85.4 \pm 5.8 \%$  y  $-0.53 \pm 0.10$  MPa (H). Los datos fueron obtenidos entre las 0800 y 1800 h. Se ajustaron ecuaciones exponenciales de decaimiento individual a los datos ( $n = 130$ ). .... 126

**Figura V.12.** Fluorescencia de la clorofila *a* polifásica de plantas de *A. salmiana* en distintos días posteriores al cese del riego (A) y posterior al riego de recuperación (B) que muestran las fases O (50  $\mu$ s), J (2 ms), I (30 ms) y P (500 ms). Cada resultado es el promedio de nueve repeticiones ( $n = 9$ ). .... 128

**Figura V.13.** Diferencias en la cinética de la fluorescencia de las trazas OJIP ( $\Delta W_{OJ} = W_{OJ(\text{estrés})} - W_{OJ(\text{testigo})}$ ) doblemente normalizadas en la fase O-J que muestran la banda K de plantas de *A. salmiana* en distintos días posteriores al cese del riego (A) y después del riego de recuperación (B). Cada resultado es el promedio de nueve repeticiones ( $n = 9$ ). .... 129

**Figura V.14.** Diferencias en la cinética de la fluorescencia de las trazas OJIP ( $\Delta W_{OK} = W_{OK(\text{estrés})} - W_{OK(\text{testigo})}$ ) doblemente normalizadas en la fase O-J que muestran la banda L de plantas de *A. salmiana* en distintos días posteriores al cese del riego (A) y después del riego de recuperación (B). Cada resultado es el promedio de nueve repeticiones ( $n = 9$ ). .... 129

**Figura V.15.** Proporciones o flujos de energía que representan los parámetros estructurales derivados de la prueba JIP relativos a las plantas testigo durante el estrés hídrico y posterior al riego de recuperación. Producción cuántica máxima para la fotoquímica primaria ( $TR_0/ABS$ ), la producción cuántica para la conversión de la energía de excitación a transporte de electrones ( $ET_0/ABS$ ), la producción cuántica para la reducción de los aceptores finales ( $RE_0/ABS$ ) y los centros de reacción reductores de  $Q_A$  por antena de Chl del FSII ( $RC/ABS$ ). Cada punto es el promedio de nueve repeticiones ( $n = 9$ )..... 131

**Figura V.16.** Flujos de energía específicos por centro de reacción ó parámetros funcionales derivados de la prueba JIP relativos a las plantas testigo durante el estrés hídrico y posterior al riego de recuperación. Flujo de absorción ( $ABS/RC$ ), flujo de captura ( $TR_0/RC$ ), flujo del transporte de electrones ( $ET_0/RC$ ), flujo de electrones para la reducción de los aceptores de electrones finales en el lado del FSI ( $RE_0/RC$ ) y disipación por centro de reacción ( $DI_0/RC$ ). Cada punto es el promedio de nueve repeticiones ( $n = 9$ )..... 131

**Figura V.17.** Eficiencias o probabilidades del transporte de electrones y fuerzas parciales derivados de la prueba JIP normalizados respecto a las plantas testigo durante el estrés hídrico y posterior al riego de recuperación. Eficiencia o probabilidad para el transporte de electrones más allá de la  $Q_A$  ( $ET_0/TR_0$ ), eficiencia o probabilidad de que los acarreadores de electrones intersistemas se muevan para reducir los aceptores de electrones finales ( $RE_0/ET_0$ ) y suma de las fuerzas parciales representadas por el índice de desempeño  $PI_{ABS}$  y totales por el  $PI_{total}$ . Cada punto es el promedio de nueve repeticiones ( $n = 9$ )..... 133

**Figura V.18.** Contribución relativa del aumento IP a la traza de fluorescencia [ $\Delta V_{IP} = (F_P - F_1)/(F_P - F_0)$ ] normalizada con respecto a las plantas testigo y como una función del tiempo de tratamiento. Cada barra es el promedio de nueve repeticiones ( $n = 9$ )..... 134

**Figura V.19.** Patrón de la tasa de asimilación de  $CO_2$  en hojas de *A. salmiana* durante la imposición del cese de riego por 30 días (A), 109 días (B) y posteriormente a 29 días de riego de recuperación (C). Los datos son el promedio  $\pm$  e.e. ( $n = 15$ ). El periodo nocturno es indicado por la barra negra..... 136

**Figura V.20.** Patrón de la conductancia estomática ( $g_s$ ) en hojas de *A. salmiana* durante la imposición del cese de riego por 30 días (A), 109 días (B) y posteriormente a 29 días de riego de recuperación (C). Los datos son el promedio  $\pm$  e.e. ( $n = 15$ ). El periodo nocturno es indicado por la barra negra..... 137

**Figura V.21.** Patrón de la tasa transpiratoria ( $Tr$ ) en hojas de *A. salmiana* durante la imposición del cese de riego por 30 días (A), 109 días (B) y posteriormente a 29 días

de riego de recuperación (C). Los datos son el promedio  $\pm$  e.e. ( $n = 15$ ). El periodo nocturno es indicado por la barra negra..... 138

**Figura V.22.** Patrón de acidez titulable en hojas de *A. salmiana* durante la imposición del cese de riego por 30 días (A), 109 días (B) y posteriormente a 29 días de riego de recuperación (C). Los datos son el promedio  $\pm$  e.e. ( $n = 5$ ). El periodo nocturno es indicado por la barra negra..... 139

**Figura VI.1.** Relación entre el potencial de agua del suelo y el potencial de agua de la hoja (A), tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> (B), conductancia estomática (C), y transpiración en plantas de *C. annuum* (D). Los valores corresponden a plantas individuales ( $n = 36$ )..... 175

**Figura VI.2.** Relación entre el potencial de agua de la hoja y la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> (A), conductancia estomática ( $g_s$ ) (B), y transpiración ( $Tr$ ) (C) en plantas de *C. annuum*. Los valores corresponden a plantas individuales ( $n = 36$ )..... 176

**Figura VI.3.** Relación entre la conductancia estomática ( $g_s$ ) y la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> (A) y la tasa de transpiración ( $Tr$ ) (B) en plantas de *C. annuum*. Los valores corresponden a plantas individuales ( $n = 36$ )..... 177

**Figura VI.4.** Producciones cuánticas de la captura de energía, flujo de electrones, probabilidades de la energía de excitación capturada para mover electrones a lo largo del transporte de electrones lineal e índice de desempeño para la conservación de los fotones absorbidos por el FSII para la reducción de los aceptores finales del FSI en hojas de *C. annuum* con distinto potencial de agua foliar. A)  $TR_0/ABS$ , producción cuántica máxima para la fotoquímica primaria; B)  $ET_0/ABS$ , producción cuántica para el transporte de electrones; C)  $RE_0/ABS$ , producción cuántica para la reducción de los aceptores finales de electrones del lado aceptor del FSI; D)  $ET_0/TR_0$ , probabilidad de que un electrón se mueva más allá de  $Q_A^-$ ; E)  $RE_0/ET_0$ , probabilidad con la cual un electrón de los acarreadores intersistemas es transferido para reducir los aceptores finales de electrones en el lado aceptor del FSI; F) índice de desempeño  $PI_{total}$  para la conservación de los fotones absorbidos por el FSII para la reducción de los aceptores finales del FSI. Los valores corresponden a plantas individuales ( $n = 36$ )..... 179

**Figura VI.5.** Flujos de energía específicos por centro de reacción activo del FSII en hojas de *C. annuum* con distinto potencial de agua foliar. ABS,  $TR_0$ ,  $ET_0$  y  $DI_0$  denotan la energía absorbida (A), energía capturada (B), transporte de electrones (C) y disipación de la energía (D), respectivamente. Los valores corresponden a plantas individuales ( $n = 36$ )..... 180

**Figura VI.6.** Relación entre la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> y (A) la probabilidad de que un excitón capturado mueva un electrón hacia la cadena de transporte de electrones más allá de Q<sub>A</sub><sup>-</sup>, (B) la producción cuántica para el transporte de electrones, (C) la eficiencia con la cual un electrón de los acarreadores de electrones intersistemas se mueve para reducir los aceptores de electrones finales en el lado aceptor del FSI, (D) el aumento en la producción cuántica para la reducción de los aceptores de electrones finales en el lado aceptor del FSI, (E) con los centros de reacción reductores de Q<sub>A</sub> por clorofila antena del FSII, (F) la cantidad de centros de reacción activos del FSII por sección cruzada al tiempo 0, (G) el aumento en el índice de desempeño (potencial) para la conservación de la energía de los fotones absorbidos por el FSII para la reducción de los aceptores de electrones intersistemas y (H) con el aumento del índice de desempeño (potencial) para la conservación de la energía de los fotones absorbidos por el FSII para la reducción de los aceptores finales del FSI en plantas de *C. annuum*. Los valores corresponden a plantas individuales ( $n = 36$ )..... 183

**Figura VI.7.** Relación entre la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> y (A) el flujo de absorción por centro de reacción, (B) el flujo de energía capturada por centro de reacción, (C) el flujo de transporte de electrones por centro de reacción y (D) el flujo de energía disipada por centro de reacción al tiempo 0 en plantas de *C. annuum*. Los valores corresponden a plantas individuales ( $n = 36$ )..... 184

**Figura VI.8.** Relación entre la conductancia estomática ( $g_s$ ) y (A) el flujo de energía capturada por RC; (B) probabilidad con la cual un electrón de los acarreadores de electrones intersistemas es transferido para reducir los aceptores de electrones finales del lado aceptor del FSI; (C) la producción cuántica para la reducción de los aceptores de electrones finales en el lado aceptor del FSI; (D) centros de reacción reductores de Q<sub>A</sub> por Chl antena del FSII; (E) centros de reacción reductores de Q<sub>A</sub> por sección cruzada excitada; y (F) el índice de desempeño para la conservación de la energía de los fotones absorbidos por el FSII para la reducción de los aceptores finales del FSI en plantas de *C. annuum*. Los valores corresponden a plantas individuales ( $n = 36$ )..... 185

**Figura VII.1.** Modelo propuesto para explicar el efecto del estrés hídrico en la fotosíntesis tanto de la planta C<sub>3</sub> (*C. annuum*) como de la MAC (*A. salmiana*). Para la descripción de la gráfica ver el texto..... 204

## Lista de Cuadros

<b>Cuadro III.1.</b> Estadísticos del análisis de varianza (ANOVA) y de regresión logística de los efectos principales en las variables respuesta evaluadas en dos especies de <i>Agave</i> en cuatro niveles de humedad.....	40
<b>Cuadro III.2.</b> Peso del agua requerida por semilla para germinar, porcentaje de agua embebida y germinación a 45 DDS y a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .....	40
<b>Cuadro III.3.</b> Parámetros $b$ , $m$ , $T_{50}$ y estadísticos de la bondad de ajuste del modelo inversa normal que describe la germinación en el tiempo de dos especies de <i>Agave</i> en cuatro potenciales de agua.....	42
<b>Cuadro III.4.</b> Valores de los parámetros $A$ , $k$ , $d$ y estadísticos de la bondad de ajuste derivados del ajuste del modelo de Korf que describe el crecimiento de la raíz de dos especies de <i>Agave</i> en cuatro potenciales de agua.....	43
<b>Cuadro III.5.</b> Biomasa seca y contenido relativo de agua (CRA) de las plántulas y liberación de electrolitos por la raíz en dos especies de <i>Agave</i> en cuatro potenciales de agua.....	46
<b>Cuadro IV.1.</b> Tasa de carboxilación máxima de la Rubisco ( $V_{\text{cmax}}$ ), capacidad de regeneración de la RuBP mediada por la tasa máxima del transporte de electrones ( $J_{\text{max}}$ ), liberación de $\text{CO}_2$ en la luz ( $R_d$ ) y conductancia del mesófilo ( $g_m$ ) en plantas de <i>C. annuum</i> con estrés hídrico y posterior al riego de recuperación.....	73
<b>Cuadro IV.2.</b> Amplitud relativa de la fase I-P, $\Delta V_{\text{IP}} = 1 - V_{\text{I}} = (F_{\text{M}} - F_{\text{I}}) / (F_{\text{M}} - F_0)$ y flujo de energía específico ( $\text{RE}_0/\text{RC}$ ), en hojas de <i>C. annuum</i> , a diferentes potenciales de agua de la hoja ( $\Psi_{\text{L}}$ , MPa).....	80
<b>Cuadro V.1.</b> Contenido relativo de agua de la hoja (RWC), potencial de agua foliar ( $\Psi_{\text{L}}$ ) y tasa máxima del transporte de electrones fotosintético aparente ( $\text{ETR}_{\text{max}}$ ) en plantas de <i>A. salmiana</i> a los 27 y 102 días de suspendido el riego y después de 1 y 21 días de riego de recuperación.....	127
<b>Cuadro V.2.</b> Contenido de clorofila $a$ , $b$ ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) y $a/b$ de la hoja de <i>A. salmiana</i> a los 5, 45 y 114 días de suspendido el riego y a los 29 días de riego de recuperación...	140
<b>Cuadro V.3.</b> Área foliar y biomasa seca de hojas, tallo y raíz de <i>A. salmiana</i> a los 115 días de suspendido el riego y después de 29 días de riego de recuperación.....	141
<b>Cuadro VI.1.</b> Correlaciones entre los parámetros derivados del intercambio de gases y los parámetros de las relaciones hídricas con los de la prueba JIP en plantas de <i>C. annuum</i> con déficit de agua en el suelo.....	182

## Lista de Abreviaturas

A	tasa de asimilación de CO <sub>2</sub>
ATP	adenosín trifosfato
C <sub>3</sub>	metabolismo fotosintético en el que el primer producto estable es un compuesto de tres carbonos
C <sub>4</sub>	metabolismo fotosintético en el que el primer producto estable es un compuesto de cuatro carbonos
Chl	clorofila
Chl <i>a</i>	clorofila <i>a</i>
Chl <i>b</i>	clorofila <i>b</i>
C <sub>i</sub>	concentración intercelular de CO <sub>2</sub>
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CRA	contenido relativo de agua
ETR	tasa del transporte de electrones estimada de la fluorescencia
$F_0$	fluorescencia inicial (50 $\mu$ s)
$F_o$	fluorescencia mínima (en la oscuridad)
$F_s$	fluorescencia en estado estable (en la luz)
$F_t$	intensidad de la fluorescencia al tiempo t
$F_I$	intensidad de la fluorescencia a 30 ms
$F_J$	intensidad de la fluorescencia a 2 ms
$F_M$	intensidad de fluorescencia máxima
$F_m$	nivel de fluorescencia máxima (en la oscuridad)
$F_m'$	nivel de fluorescencia máxima (en la luz)
FNR	ferredoxina NADP <sup>+</sup> reductasa
$F_P$	$F_P = F_M$
FSI	fotosistema I
FSII	fotosistema II
$F_v$	fluorescencia variable de clorofila
$F_v/F_m$	eficiencia cuántica máxima o potencial del FSII
$\Delta F/F_m'$	producción de la fotosíntesis (en la luz)
$g_m$	conductancia del mesófilo
$g_s$	conductancia estomática al vapor de agua
H <sup>+</sup>	protón
J <sub>max</sub>	tasa máxima del transporte de electrones de curvas A/C <sub>i</sub>
EL	liberación de electrolitos
MAC	metabolismo ácido de Crasulácea
MPa	mega pascal
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducida)
NADP	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (oxidada)
nm	nanómetro
NPQ	extinción no fotoquímica de la Chl excitada
O <sub>2</sub>	molécula de oxígeno
OEC	complejo productor de oxígeno
OJIP	curva de la fluorescencia de la Chl <i>a</i> definida por los nombres de las etapas intermedias

P680	donador primario de electrones del FSII
P700	donador primario de electrones del FSI
PAM	Pulso de Amplitud Modulada
PC	plastocianina
PEA	aparato para medir fluorescencia "Plant Efficiency Analyser"
PEG8000	polietilen glicol 8000
PEP	fosfoenol piruvato
PEPC	fosfoenol piruvato carboxilasa
PQ	plastoquinona
$\Psi$	potencial de agua
$\Psi_s$	potencial de agua del suelo
$\Psi_L$	potencial de agua de la hoja
$Q_A$	quinona aceptora primaria de electrones del FSII
$Q_B$	quinona secundaria aceptora de electrones del FSII
$q_N$	coeficiente de extinción no fotoquímica
$q_P$	coeficiente de extinción fotoquímica
RC	centro de reacción
Rd	respiración estimada de curvas $A/C_i$
RMSE	raíz del cuadrado medio del error
Rubisco	ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa
RuBP	ribulosa bifosfato
RWC	contenido relativo de agua
$T_{50}$	tiempo al 50% de la germinación
$Tr$	tasa de transpiración de agua
u.a.	unidades arbitrarias
$V_{cmax}$	tasa máxima de carboxilación de la Rubisco estimada de curvas $A/C_i$

## I. Introducción General

En el planeta Tierra más del 70 % de la superficie está cubierta con agua. Sin embargo, casi toda (97 %) es agua salada de los océanos. No obstante, el 3 % restante representa una gran cantidad de agua, cerca de 40 millones de  $\text{km}^3$  (un  $\text{km}^3$  equivale a un millón de millones de litros de agua). La mayoría de ésta se mantiene, como agua dulce, en los glaciares y capas de hielo (2 % de toda el agua) y 0.7 % es agua subterránea. El agua dulce restante (0.3 %) está en lagos, suelo, atmósfera, ríos y dentro de los organismos vivos (Ruane *et al.*, 2008).

México anualmente recibe alrededor de 1488 miles de millones de  $\text{m}^3$  de agua en forma de precipitación. De esta agua, el 72.5 % se evapotranspira y regresa a la atmósfera, el 22.1 % escurre por los ríos y arroyos y el 5.4 % restante se infiltra al subsuelo y recarga los acuíferos, de tal forma que anualmente el país cuenta con 458 mil millones de  $\text{m}^3$  de agua dulce renovable (CNA, 2009). Sin embargo, la ocurrencia de la lluvia en el territorio nacional presenta contrastes notables. Así, el país se puede dividir en dos grandes zonas: 1) la norte, centro y noroeste donde se concentra 77 % de la población, se genera 87 % del producto interno bruto (PIB), pero únicamente tiene 31 % del agua renovable; y 2) la zona sur y sureste donde habita 23 % de la población, se genera 13 % del PIB y tiene 69 % del agua renovable. Por lo tanto, dos terceras partes del territorio nacional son áridas o semiáridas (CNA, 2009).

El agua que se recibe en forma de precipitación es esencial para la agricultura y puede clasificarse en dos categorías de agua dulce (Ruane *et al.*, 2008). La primera, ‘agua

verde', es la humedad generada en el suelo por la lluvia y disponible para la absorción por las raíces de las plantas; es la principal fuente de agua para la agricultura de temporal. La segunda, 'agua azul', es el agua de escorrentías almacenada en lagos, ríos, presas y acuíferos; es la principal fuente de agua para la agricultura de riego, además de ser importante como el recurso que sustenta los ecosistemas acuáticos en ríos y lagos; y es utilizada para propósitos domésticos o agua potable, en la industria o en hidroeléctricas. Particularmente, en lo que se refiere a los usos del agua en México, el volumen concesionado en diciembre del 2006, sin incluir la generación de energía hidroeléctrica fue de 77321 millones de m<sup>3</sup>. De este volumen, 77 % corresponde al uso agrícola, 14 % al público y 9% a las industrias que obtienen agua de ríos y acuíferos (CNA, 2009).

Lo anterior se refiere a los recursos hídricos nacionales; sin embargo, cuando los estados son examinados individualmente es notoria la variación amplia de la situación del agua entre ellos. Por ejemplo, la precipitación es muy escasa en Baja California, donde solamente se presentan 202 mm al año, valor doce veces menor a los 2410 mm que se presentan en el estado de Tabasco (CNA, 2009). Además, en varias regiones hidrológicas se está extrayendo agua a tasas que son claramente insostenibles. De esta manera, se considera que el agua utilizada para usos consuntivos respecto a la disponibilidad total es un indicador del grado de presión que se ejerce sobre el recurso hídrico; se considera que si el porcentaje es mayor a 40 se ejerce una presión fuerte sobre el recurso (CNA, 2009). El país en su conjunto experimenta una presión de 17 %, considerado moderado; sin embargo, la zona centro, norte y noreste del país experimenta un grado de presión de 47 %, que se considera una presión fuerte sobre el recurso agua.

Además, existen dos factores que juegan un factor importante en la disponibilidad de agua y que pueden exacerbar esa situación en el futuro. Uno es el aumento en la población, que en México se ha cuadruplicado en los últimos 55 años, al pasar de 25 millones de habitantes en el año 1950 a 103 millones en el año 2005. De acuerdo con datos de la Comisión Nacional de Población (CONAPO), entre 2007 y 2030 la población del país se incrementará en casi 14.9 millones de personas. Con lo que la disponibilidad natural media per cápita de agua nacional disminuirá de 4312 en el año 2007 a 3783 m<sup>3</sup> hab<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en el 2030 (CNA, 2009). Conjuntamente, Molden *et al.* (2007) estiman que 7130 km<sup>3</sup> de agua son utilizados anualmente para alimentar a la población mundial y se pronostica que sin mayores mejoras en el uso del agua o cambios en los patrones de producción, la cantidad de agua consumida por evapotranspiración en la agricultura aumentará entre 12000 y 13500 km<sup>3</sup> para alimentar la población mundial creciente para el año 2050 (de Fraiture *et al.*, 2007). Además, mientras que 76.5 % de la población nacional se estimó reside en áreas urbanas en el 2005, se predice que aumentará a 82 % en el 2030 (CNA, 2009), lo que causará una demanda mayor de agua para uso doméstico e industrial y la porción remanente para la agricultura disminuirá. También, como plantean Jury y Vaux (2005), el valor económico del agua para los usos urbanos e industriales es superior al agrícola (o para usos ambientales), por lo que el mercado conducirá a la reasignación forzada del recurso agua del sector agrícola y ambiental hacia el urbano.

El segundo factor es el cambio climático, que se espera tenga impacto en la agricultura y producción de alimentos a través de tres rutas principales: el calentamiento global, cambios en los patrones de precipitación e incremento en la concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera (FAO e IFAD, 2006). Los cambios en el ciclo del agua y en los patrones de

lluvia afectarán la humedad del suelo e incrementarán la erosión. En áreas propensas a la sequía, el número y duración de los eventos de sequía aumentarán. Respecto a México, las proyecciones de los Modelos de Circulación General Acoplados indican un decremento de la precipitación en la mayor parte del territorio (Montero y Pérez, 2008), esto puede provocar escasez de agua, como resultado de la precipitación insuficiente y sequías de distinta magnitud y duración. Por lo tanto, las plantas están comúnmente sujetas a periodos de déficit de agua en el suelo y la atmósfera durante su ciclo de vida (Chaves *et al.*, 2009). El estrés hídrico es entonces una de las principales condiciones ambientales que adversamente afectan y afectarán aún más el crecimiento de las plantas y rendimiento de los cultivos (Bartels y Nelson, 1994; Passioura, 2007).

La germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas son etapas críticas del desarrollo de las plantas que conduce al establecimiento de nuevos individuos en las comunidades vegetales (Fay y Schultz, 2009). Estos dos eventos son altamente sensitivos a la variabilidad ambiental y requieren condiciones favorables de humedad en el suelo, que raramente son estáticas. Como resultado, el potencial de agua del suelo ( $\Psi_s$ ) modula la germinación de las semillas y las especies difieren en el potencial de agua mínimo en el cual la germinación puede ocurrir (Daws *et al.*, 2008). En los ambientes áridos y semiáridos, el agua necesaria para la germinación está disponible solamente por un periodo corto de tiempo y en consecuencia, el establecimiento exitoso de las plantas depende de germinación rápida y uniforme de las semillas, y también de la habilidad de las semillas para germinar en condiciones de disponibilidad baja de agua (Fischer y Turner, 1978). Por lo tanto, diferencias en las características de las semillas y en la respuesta de la germinación

a la disponibilidad de agua se espera resulten en respuestas diferentes en la emergencia y sobrevivencia de las plántulas y así en adaptaciones distintas en los ambientes áridos y semiáridos (Tobe, 2009). De acuerdo con Mott (1974) y Evans y Etherington (1990), las especies de hábitats secos tienden a germinar sólo en condiciones de potenciales de agua relativamente altos, lo que les permite reducir el riesgo por mortandad de las plántulas en una sequía subsecuente. Un estudio en *Agave deserti* mostró que la germinación parece ocurrir en años en los que se presenta una combinación apropiada de temperatura y precipitación, lo que puede favorecer la sobrevivencia de las plántulas en espacios protegidos por arbustos y rocas (Franco y Nobel, 1988). Sin embargo, las relaciones entre las características de germinación y crecimiento inicial de las plantas y la adaptabilidad de las plantas en ambientes deficientes de agua no están entendidas completamente, por lo que dicho conocimiento en la producción de cultivos es importante ya que dicta las opciones de manejo agrícola.

Por lo tanto, entender cómo las plantas responden al estrés hídrico juega un papel importante en la estabilización del desempeño del cultivo durante el estrés (Chaves *et al.*, 2009) y genera la posibilidad de que dicho conocimiento pueda proveer nuevas estrategias para mejorar la tolerancia al estrés de plantas agrícolas importantes (Xiong *et al.*, 2002). Así, las preguntas: ¿De qué forma responden las plantas al estrés hídrico?, ¿Cuáles plantas pueden tolerar este estrés? y ¿Cómo las bases fisiológicas y moleculares de la tolerancia al estrés pueden ser utilizadas para mejorar la producción de los cultivos? son cuestionamientos importantes en nuestros días. Además, ¿cómo reducir el uso de agua agrícola y hacer al recurso hídrico sostenible?, es una pregunta a responder urgente e inmediatamente. Es una pregunta cuya respuesta solicita la interacción de enfoques

agronómicos, fisiológicos y biotecnológicos/genéticos, que requiere practicar la agronomía apropiada para crecer cultivos bien adaptados al ambiente, con un menor uso de agua tanto en la producción con riego como de temporal y con la necesidad de desarrollar cultivos que requieran menos agua para producir rendimiento suficiente, lo anterior podría lograrse a través del entendimiento de los mecanismos fisiológicos que determinan el crecimiento, pérdida de agua y la respuesta de la planta a la reducción en la disponibilidad de la misma.

La fotosíntesis y el crecimiento celular son procesos primarios afectados por el estrés hídrico (Chaves, 1991). El efecto puede ser directo, como en la disminución de la disponibilidad de CO<sub>2</sub>, causada por las limitaciones difusivas a través del estoma y el mesófilo (Flexas *et al.*, 2004, 2007), y alteraciones al metabolismo fotosintético (Lawlor y Cornic, 2002), o pueden surgir por efecto secundario (estrés oxidativo). Este último se presenta principalmente en condición de alteración múltiple (Chaves y Oliveira, 2004) y puede afectar la maquinaria fotosintética de las hojas drásticamente (Ort, 2001). Entender los mecanismos fundamentales en dichas respuestas puede apoyar en el diseño de nuevas herramientas para el manejo de los cultivos y genotipos para la agricultura moderna de precisión (Chaves y Oliveira, 2004). En particular, el entendimiento del funcionamiento de los procesos fotosintéticos y cómo la fotosíntesis es controlada por factores ambientales (por ejemplo el déficit de humedad o sequía) es una piedra angular en la ecología de plantas y ecosistemas. Por ejemplo, con el fin de evaluar el efecto del cambio climático en el desempeño de las plantas, en la competencia interespecífica y composición de especies, o en el ciclo de carbono, es necesario comprender entre otros, cómo la capacidad fotosintética es controlada y regulada por el ambiente en diferentes especies de plantas (Chapin III *et al.*, 2002). Es claro que se necesitan técnicas nuevas para la evaluación de los eventos

instantáneos de la fotosíntesis y de la conductancia estomática, para la selección y mejora de genotipos en respuesta a la sequía u otros tipos de factores ambientales. La emisión de fluorescencia de clorofila en plantas intactas puede ser medida rápida y fácilmente y se ha demostrado que está directamente relacionada con la actividad fotosintética (Baker y Rosenqvist, 2004)

En la presente tesis se investigó la respuesta del maguey (*Agave salmiana*) y chile pimiento morrón (*Capsicum annuum*) al déficit de agua desde un punto de vista fisiológico, fueron examinadas las relaciones fundamentales entre la toma de carbono, crecimiento y pérdida de agua. De manera general, en el Capítulo II se presenta una revisión de literatura, ahí se aborda el concepto de estrés abiótico en las plantas, se describe el proceso de fotosíntesis y los enfoques de fluorescencia de clorofila *a* utilizados para su estudio. En el Capítulo III se describe un estudio en el que se evaluó el efecto del potencial de agua del sustrato en la germinación de *Agave lechuguilla* y *A. salmiana*, crecimiento inicial de la raíz y estabilidad de sus membranas celulares para reconocer los requerimientos hídricos de estas suculentas de ambientes áridos y semiáridos. En el Capítulo IV se presenta un estudio en el que se cuantificaron características estomáticas, bioquímicas y fotoquímicas involucradas en la limitación de la fotosíntesis en respuesta al estrés hídrico y su recuperación posterior por la reactivación del riego en plántulas de chile pimiento morrón. El análisis de los resultados permitió proponer al aumento rápido de la fluorescencia de clorofila *a* como un método sencillo *in vivo* que permite la detección y cuantificación del estrés. En el Capítulo V se presenta un estudio enfocado a evaluar si el déficit de humedad en el suelo tiene un efecto en la activación de los mecanismos fotoquímicos y no fotoquímicos de tolerancia del maguey, y si el estrés hídrico se expresa como fotoinhibición

en el transcurso del día. Finalmente, en el Capítulo VI se presentan los resultados del estudio de los efectos del estrés hídrico en las reacciones primarias de la fotosíntesis, la relación entre los parámetros derivados de la prueba JIP y la asimilación de CO<sub>2</sub> en plantas de chile pimiento; también se discute la posibilidad de utilizar ciertos parámetros de la fluorescencia de la clorofila como guías para la implementación del riego. Se analiza la urgencia por aumentar el conocimiento de las bases fisiológicas de la regulación de la fotosíntesis en condiciones de déficit de agua, con el fin de ser capaces de mejorar la producción de las plantas en regiones áridas y semiáridas y poder realizar inferencias acerca de su potencial para la captura y secuestro de carbono en condiciones de estrés hídrico. Este conocimiento representa la etapa inicial crucial para la producción de biocombustibles (García-Moya *et al.*, 2010).

Es claro que la mejora del entendimiento de la fisiología y avances en la agronomía han generado aumento en la producción y eficiencia en el uso del agua en ciertos cultivos (Morison *et al.*, 2008), por lo que existe un gran potencial para mejoras futuras debidas al progreso en el conocimiento de las respuestas fisiológicas de las plantas al suministro de agua y a los avances considerables dentro de los últimos enfoques genéticos y moleculares si son ligados de manera apropiada con la fisiología ambiental.

## II. Revisión de Literatura

### II.1. Estrés abiótico

Estrés en términos físicos es definido como una fuerza mecánica por unidad de área aplicada a un objeto (Mahajan y Tuteja, 2005). En respuesta al estrés aplicado, un objeto se somete a un cambio en su dimensión, lo que se conoce como deformación. Debido a que las plantas son sésiles, es problemático medir la fuerza ejercida por un estrés y por lo tanto en términos biológicos es difícil definir el estrés. Además, una condición biológica que puede ser estresante para una planta puede ser lo óptimo para otra. La definición práctica de un estrés biológico es una fuerza adversa o condición que inhibe el funcionamiento normal y bienestar de un sistema biológico como las plantas.

El estrés abiótico limita la productividad de los cultivos (Araus *et al.*, 2002; Boyer, 1982) y juega un papel principal en determinar la distribución de las especies de plantas a través de los tipos de ambientes. El estrés abiótico y su efecto en las plantas en sistemas naturales y agrícolas es un tópico que está recibiendo gran atención debido a los impactos potenciales del cambio climático en los patrones de lluvia y temperaturas extremas, salinización de tierras agrícolas por la irrigación y la necesidad total de mantener o aumentar la productividad agrícola en tierras marginales (Verslues *et al.*, 2006). En el ambiente natural, una planta puede experimentar estrés por varios factores abióticos simultáneos o en tiempos diferentes a lo largo del crecimiento (Tester y Bacic, 2005). Algunos ejemplos comunes de factores de estrés abiótico que una planta puede enfrentar son: decremento de la disponibilidad de agua, temperaturas extremas incluyendo las que producen congelación, disminución en la disponibilidad de nutrientes en el suelo (o

contrariamente la acumulación de iones tóxicos durante la salinización), exceso de luz o aumento de la dureza del suelo (Verslues *et al.*, 2006).

### II.1.1. Sequía, estrés hídrico y tolerancia al estrés

La *sequía* es un término meteorológico que indica un largo periodo en el cual no hay lluvia suficiente para el crecimiento exitoso de los cultivos o para la reposición de los suministros hídricos. La expresión *estrés hídrico* es utilizada frecuentemente para indicar la compleja serie de efectos que son disparados en las plantas por la sequía. El término *estrés por sequía* es más apropiado para especificar cuando el estado de estrés se presenta en un periodo largo de tiempo. Sin embargo, dado que a menudo es difícil separar los dos fenómenos, las definiciones de estrés hídrico, estrés por sequía y déficit hídrico son utilizadas regularmente de manera intercambiable (Lombardini, 2006). La sequía lleva a un déficit hídrico en el suelo y en el tejido vegetal, lo que a su vez altera los procesos fisiológicos y puede tener consecuencias en el crecimiento, desarrollo y sobrevivencia de las plantas. El concepto de estrés no puede ser separado del de *tolerancia al estrés* (algunas veces indicado con el término menos apropiado de *resistencia al estrés*), el cual es la habilidad de la planta para sobrevivir en un ambiente desfavorable. Esta habilidad puede derivarse tanto de la *adaptación* como de la *aclimatación* a la condición de estrés. Ambos términos indican un aumento de la tolerancia y son en ocasiones utilizados indistintamente de manera errónea. La diferencia radica en la causa del aumento en la tolerancia: en las plantas aclimatadas es resultado de una condición o exposición previa al estrés, mientras que en las plantas adaptadas la tolerancia está fija en el genoma y se deriva de los procesos de selección que han ocurrido por generaciones (Lombardini, 2006).

## II.2. Relaciones Hídricas

El agua representa hasta 85 y 90 % de la biomasa fresca de la mayoría de las plantas herbáceas. En las plantas superiores, el agua es absorbida del suelo por las raíces y transportada hacia el vástago y hojas a través de los vasos del xilema. La fuerza conductora de éste movimiento la generan los gradientes de presión desarrollados por la presión de raíz y la transpiración, los cuales a su vez son formados principalmente por la diferencia en la concentración de vapor de agua entre la hoja y el aire de su rededor (Lombardini, 2006).

El estado hídrico de los tejidos vegetales, suelo y atmósfera es comúnmente medido en términos del potencial hídrico ( $\Psi_w$ ). Matemáticamente, el  $\Psi_w$  es el potencial químico del agua dividido por el volumen molar parcial (Kramer y Boyer, 1995):

$$\Psi_w = \frac{\mu_w - \mu_o}{\bar{V}_w}$$

donde  $\mu_w$  es el potencial químico del agua en la solución,  $\mu_o$  es el potencial químico del agua pura a la misma temperatura y  $\bar{V}_w$  es el volumen molar parcial del agua ( $\text{m}^3/\text{mol}$ ) lo que da como resultado energía en unidades de  $\text{J}/\text{m}^3$  que es equivalente a presión en  $\text{N}/\text{m}^2$  o MPa en el sistema internacional de unidades; en consecuencia, la energía libre del agua así como la turgencia de las células vegetales pueden ser expresadas en unidades de presión (como el pascal, Pa) y por lo tanto se puede realizar una valoración sencilla de la dirección del movimiento del agua en el sistema suelo-planta. Si el agua fluye hacia dentro o fuera de las células de la planta es dependiente del gradiente de  $\Psi_w$  entre la célula y sus alrededores. El  $\Psi_w$  de una célula con pared celular, como la célula vegetal, está dado por la ecuación:

$\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p$ ; donde  $\Psi_s$  es el potencial osmótico y  $\Psi_p$  es el potencial de presión (o de turgencia). Para que la célula tome agua del suelo ésta debe de tener un  $\Psi_w$  menor que la fuente de agua. La disminución del  $\Psi_w$  del suelo (disminución de la energía libre del agua) incrementa la dificultad para que la planta tome el agua y esto crea una serie de respuestas que permiten a la planta evitar la pérdida de agua, y que la toma de agua continúe en  $\Psi_w$  reducidos o que la planta tolere la reducción del contenido de agua del tejido. Un panorama general de estas respuestas incluye cambios en el flujo de agua y en las relaciones hídricas a nivel celular y de la planta (Verslues *et al.*, 2006).

Debido a la complejidad de las relaciones hídricas de la planta y el suelo, no es posible identificar un índice único del grado de déficit hídrico de la planta. Sin embargo, el  $\Psi_w$  de la hoja o el tallo, es probablemente el más utilizado como indicador del estrés de la planta, debido a que incluye los efectos de la demanda evaporativa, la disponibilidad de agua en el suelo y los flujos hidráulicos dentro del continuo suelo-planta-atmósfera (Andrews *et al.*, 1992). Mediante el uso de  $\Psi_w$  como un indicador del estrés, el déficit hídrico es cuantificado en términos de la medida en la que el contenido de agua del tejido cae por debajo del de turgencia total, la que es considerada como el contenido óptimo de agua para el crecimiento y desarrollo.

### *II.3. Fotosíntesis*

En la fotosíntesis oxigénica, los organismos liberan oxígeno después de la iluminación. La ecuación general de la fotosíntesis es como sigue:

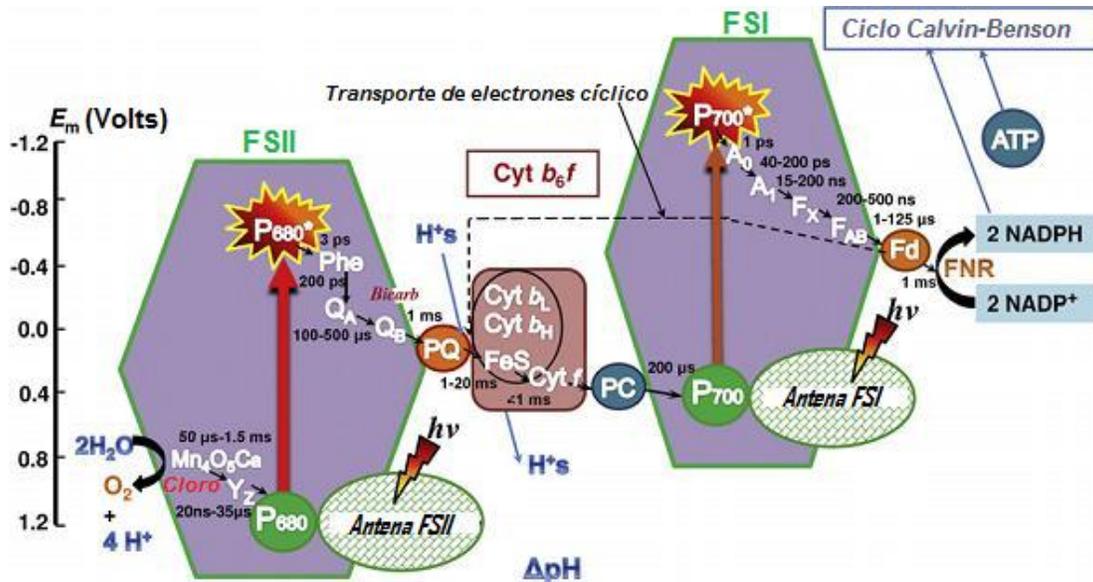
$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \sim 10\text{-}12 \text{ cuantos de luz} \rightarrow \text{O}_2 + \{\text{CH}_2\text{O}\} + \text{pérdida como calor y fluorescencia.}$

El proceso ocurre en dos etapas principales: (i) Los electrones son transferidos del agua al  $\text{NADP}^+$ , utilizando la luz absorbida por varios complejos pigmentos-proteínas. Los acarreadores de electrones y átomos de hidrógeno (o protones) están localizados en las membranas de los tilacoides. El resultado final es la liberación de  $\text{O}_2$  y producción de  $\text{NADP}^+$  reducido (NADPH) y ATP. (ii) El ATP y el NADPH son entonces utilizados, en la matriz del estroma, para convertir  $\text{CO}_2$  a carbohidratos  $\{\text{CH}_2\text{O}\}$  en una serie de reacciones catalizadas por enzimas hidrosolubles (para una revisión ver Martin *et al.* 2000). Este tipo de fotosíntesis se presenta en plantas (angiospermas, gimnospermas, pteridofitas y briofitas), algas verdes y otras algas multipigmentadas (por ejemplo, algas rojas, cafés, amarillas y diatomeas) y en procariotas (cianobacterias y proclorofitas) (Whitmarsh y Govindjee, 1999).

### *II.3.1. Reacciones de la fotosíntesis: fundamentos*

En la siguiente parte se proveen los fundamentos básicos de las reacciones relacionadas a la fotosíntesis, dado que existen varios aspectos del proceso que son relevantes para su interpretación. La fotosíntesis oxigénica involucra dos reacciones de luz que operan simultáneamente en los centros de reacción de los fotosistemas II y I (FSII y FSI). La Figura II.1 es un diagrama del esquema Z, ampliamente conocido, para la transferencia de electrones del agua hacia el  $\text{NADP}^+$ ; la energía luminosa absorbida por los dos fotosistemas es transformada a energía libre de Gibbs electroquímica que es utilizada

para oxidar el agua a oxígeno, reducir el  $\text{NADP}^+$  y producir ATP (para una revisión ver Govindjee, 2004).



**Figura II.1.** Esquema Z para el transporte de electrones en la fotosíntesis, del agua a la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato,  $\text{NADPH}^+$ . La fotosíntesis oxigénica usa dos reacciones de luz y dos fotosistemas (FSII, fotosistema II y FSI, fotosistema I) conectados en serie por medio del complejo citocromo  $b_6f$  ( $\text{Cyt } b_6f$ ). En el lado donador de electrones del FSII, se tiene el clúster tetranuclear manganeso-oxígeno-calcio,  $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ , y la  $\text{Y}_z$  tirosina-161 en la proteína D1 y los iones cloro. El centro de reacción del FSII que contiene clorofila es el P680; este es el donador de electrones primario del FSII; el  $\text{P680}^*$  es el estado electrónico excitado del P680. En el lado receptor de electrones del FSII se tiene una molécula de feofitina (Phe), el primer receptor de electrones primario del FSII,  $\text{Q}_A$ , una plastoquinona aceptora de un electrón enlazado fuertemente, y  $\text{Q}_B$ , una plastoquinona aceptora de dos electrones que se enlaza y desenlaza del FSII; un ion bicarbonato (bicarb) que está enlazado a un hierro que se sitúa entre  $\text{Q}_A$  y  $\text{Q}_B$ . La PQ en el esquema se refiere a un reservorio de moléculas de plastoquinona móviles. En el complejo  $\text{Cyt } b_6f$ , se tiene una proteína hierro-azufre (FeS), conocida como proteína FeS de Rieske, un  $\text{Cyt } f$ , un citocromo f y dos moléculas citocromo b (una de potencial bajo (L) y la otra alto (H)). La molécula plastocianina (PC) es una proteína con cobre que transfiere electrones del  $\text{Cyt } b_6f$  al FSI (las cianobacterias frecuentemente emplean  $\text{Cyt } c_6$  en lugar de la PC); se presenta más de una molécula de PC. En el FSI, está el P700, el donador de electrones primario del FSI, mientras que el  $\text{P700}^*$  es el estado electrónico excitado del P700. En el lado receptor de electrones del FSI, se tiene una  $\text{A}_0$ , una molécula especial de clorofila a;  $\text{A}_1$ , vitamina  $\text{K}_1$ ; y  $\text{F}_X$ ,  $\text{F}_A$ ,  $\text{F}_B$ , tres centros de hierro-azufre. Fd representa a la ferredoxina; existe más de una molécula de ferredoxina, FNR es una ferredoxina- $\text{NADP}^+$ -reductasa, y  $\text{NADP}^+$  es el nicotin-adenin dinucleótido fosfato. En este diagrama, la ATP sintasa no se muestra. También se muestran los tiempos medios estimados (o medidos) para el transporte de electrones entre los intermediarios. Tomado y modificado de Stirbet y Govindjee (2011).

### *II.3.1.1. Absorción de luz y captura*

El primer paso de la fotosíntesis es la absorción de fotones por las moléculas antena en una escala de tiempo de femtosegundos ( $10^{-15}$  s), resulta en formación de clorofilas excitadas (Chl\*). La función principal de la antena (el complejo de cosecha de luz) es transferir la energía de excitación a los centros de reacción fotosintéticos. Además, de la transferencia de los excitones de las clorofilas antena excitadas a los centros de reacción (inicio de la fotoquímica), parte de la energía luminosa absorbida es disipada como calor y emitida como fluorescencia. La separación de cargas se presenta en ambos complejos de los centros de reacción de PSI y PSII, involucrando a los pigmentos 700 y 680 respectivamente (P700 y P680). El proceso fotoquímico se termina en algunos picosegundos ( $10^{-12}$  s) y todas las demás reacciones pueden proceder en la oscuridad (Stirbet y Govindjee, 2011 y referencias incluidas).

### *II.3.1.2. Transporte de electrones fotosintético*

La oxidación del agua a  $O_2$  molecular en el complejo liberador de oxígeno (OEC) en el PSII, vía  $Y_z$  (tirosina -161 en la proteína D1), forma cargas positivas; la unidad clave de oxidación del agua es representada en la Figura II.1 como  $Mn_4O_5Ca$ . La carga negativa (el electrón) primeramente se sitúa en la molécula de feofitina (Phe), es pasado hacia la quinona primaria ( $Q_A$ ), y después a la quinona secundaria  $Q_B$ , que es un aceptor de dos electrones; la  $Q_B$  reducida es protonada posteriormente y cambia a plastoquinol ( $PQH_2$ ) e intercambia con una molécula PQ de un reservorio de moléculas de plastoquinona, PQs (3-9 PQ por PSII). La  $PQH_2$  transfiere un electrón al citocromo  $f$ , (Cyt  $f$ ), vía un centro fierro-azufre de Rieske (FeS), y el al Cyt  $b_L$  (a veces llamado Cyt  $b_p$ , para mostrar que está

situado en la parte electropositiva de la membrana, el lado del lumen); el Cyt *f* reducido reduce a la proteína plastocianina con cobre (PC), en el complejo Cyt *b<sub>6</sub>f*, el Cyt *b<sub>L</sub>* reducido, de potencial bajo, transfiere un electrón al Cyt *b<sub>H</sub>* (también llamado Cyt *b<sub>n</sub>*, dado que está situado en el lado electronegativo de la membrana). El Cyt *b<sub>H</sub>* reduce una molécula de PQ del reservorio de PQ, a su forma semiquinona (PQ<sup>-</sup>); un segundo electrón, extraído de otra molécula de PQH<sub>2</sub>, transferido al Cyt *b<sub>H</sub>* vía el Cyt *b<sub>L</sub>*, reduce PQ<sup>-</sup> a PQH<sub>2</sub> después de que dos protones le son añadidos. El transporte de electrones de una molécula de PQ reducida al complejo Cyt *b<sub>6</sub>f* y de regreso a una molécula PQ oxidada, como se describió antes, es conocido como el ciclo Q (Stirbet y Govindjee, 2011 y referencias incluidas). Sin embargo, estudios estructurales nuevos del Cyt *b<sub>6</sub>f* han revelado la presencia de un cuarto grupo hemo, de tipo *c*, y también una molécula de ferredoxina NADP<sup>+</sup> reductasa (FNR), ambos en el lado electronegativo de la membrana. Otros dos ciclos que posiblemente toman lugar en las plantas verdes han sido propuestos además del ciclo Q: (i) el Cyt *b<sub>L</sub>* transfiere sucesivamente dos electrones hacia un acarreador de dos electrones formado por el Cyt *b<sub>H</sub>* y el grupo hemo *c*, produciendo [Cyt *b<sub>H</sub>-c*]<sup>2-</sup>, que entonces reduce una molécula PQ del reservorio a PQH<sub>2</sub>; (ii) un acarreador de dos electrones [Cyt *b<sub>H</sub>-c*] recibe un electrón del Cyt *b<sub>L</sub>*, y otro de la molécula FNR, vía Fd<sup>-</sup>, y entonces reduce una molécula de PQ del reservorio a PQH<sub>2</sub> (es el caso del transporte de electrones cíclico alrededor del FSI). Los H<sup>+</sup> son liberados hacia el lumen durante la oxidación del agua y en la reoxidación del PQH<sub>2</sub> por el complejo Cyt *b<sub>6</sub>f*, como consecuencia del transporte de electrones lineal y debido a los ciclos alrededor del Cyt *b<sub>6</sub>f*. Las PCs (presentes en al menos 1 PC/FSI en hojas con una asimilación de carbono disminuida y hasta 5 PC/FSI en hojas con tasas altas de asimilación de carbono) están presentes en el lumen, y cuando están en estado reducido, actúan como donadoras de electrones al FSI. La carga positiva producida por el FSI es reducida por una

PC reducida, y la carga negativa reduce a la ferredoxina, Fd (5-7 moléculas de Fd por FSI) mediante una serie de reacciones redox que involucran al aceptor primario del FSI ( $A_0$ ), una molécula especial de clorofila *a*; vitamina  $K_1$ ; y  $F_X$ ,  $F_A$  y  $F_B$ , centros de hierro-azufre. La reducción de  $NADP^+$  por la Fd reducida es catalizada por la FNR. En hojas o muestras que han estado en la oscuridad la FNR debe ser activada, un proceso que en las plantas superiores toma varios segundos, pero en las algas, líquenes y corales necesitan solo unos 100 ms. La Fd puede actuar también como donador de electrones en otros procesos en el estroma, como en la reacción de Mehler o el ciclo agua-agua. El transporte de electrones cíclico alrededor del FSI compite con el transporte de electrones lineal para el ciclo Calvin-Benson. El papel fisiológico del flujo de electrones cíclico es contribuir a la formación del  $\Delta pH$  a través de las membranas del tilacoide, lo que conduce la síntesis de ATP (Stirbet y Govindjee, 2011).

### *II.3.1.3. Síntesis de ATP*

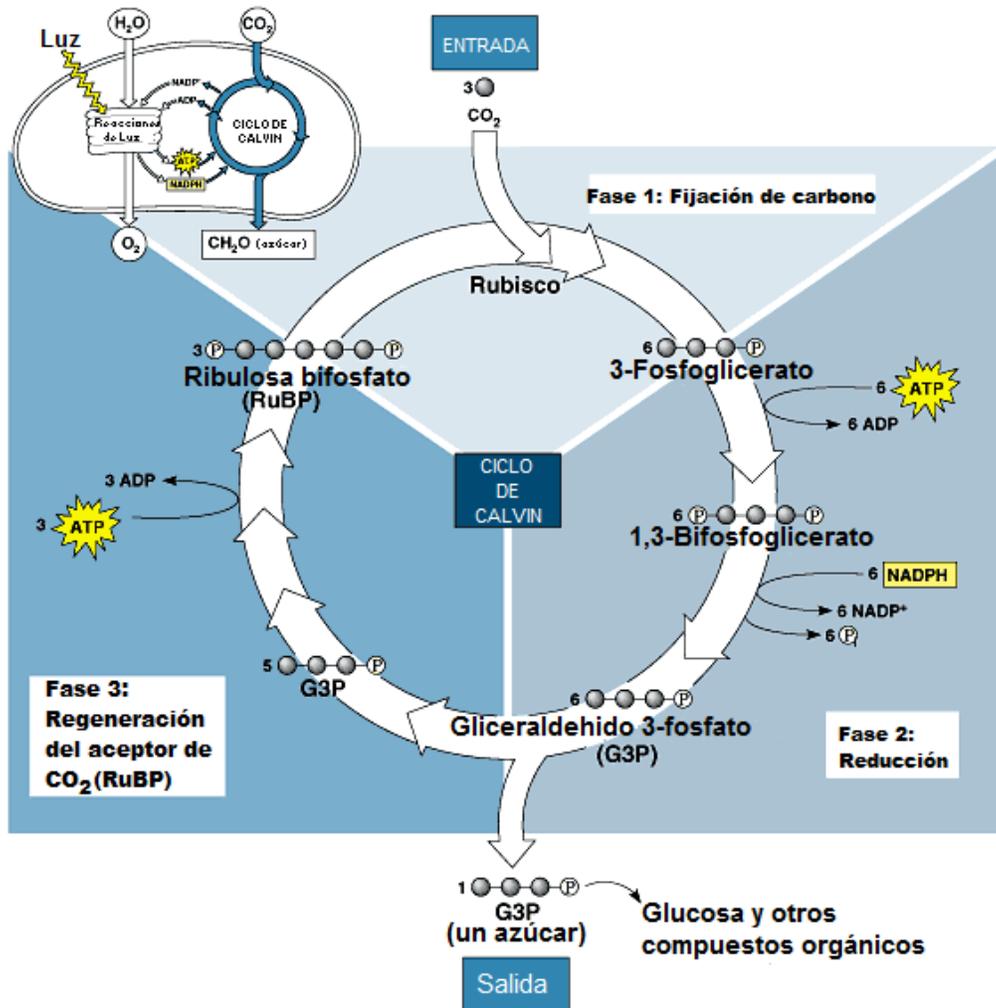
El complejo ATP sintetasa está compuesto de dos subunidades principales, la  $CF_0$  y  $CF_1$ . La subunidad  $CF_0$  atraviesa la membrana fotosintética y forma un canal protónico. La subunidad  $CF_1$  está adjunta a la punta de la subunidad  $CF_0$  en el lado estromal de la membrana. La subunidad  $CF_1$  está compuesta de distintas subunidades proteicas que contienen los sitios catalíticos para la síntesis de ATP (Junge *et al.*, 2009).

La síntesis de ATP se realiza a partir de adenosín difosfato (ADP) y fosfato inorgánico ( $P_i$ ), por la ATP sintetasa, con la fuerza protón motriz (*pmf*) construida a través

de la membrana del tilacoide. La *pmf* resulta de un potencial eléctrico ( $\Delta\psi$ ) a través de la membrana del tilacoide y un gradiente protónico ( $\Delta\text{pH}$ ). El  $\Delta\text{pH}$  proviene básicamente de: (i) los protones liberados hacia el lumen durante la oxidación de agua; (ii) la translocación protónica del lado del estroma hacia el lumen durante la reducción de la PQ a PQH<sub>2</sub>, y la oxidación de la PQH<sub>2</sub> por el complejo Cyt *b<sub>6</sub>f*; (iii) el ciclo Q del complejo Cyt *b<sub>6</sub>f*; y (iv) del transporte de electrones cíclico alrededor del FSI. Los protones son “conducidos fuera” del lumen tilacoidal a través del núcleo central de la enzima ATP sintetasa o CF<sub>O</sub>, causando cambios conformacionales (rotatorios) en la enzima, la cual cataliza la fosforilación de ADP y la liberación de ATP por la subunidad CF<sub>1</sub> en el lado del estroma (Junge *et al.*, 2009; Stirbet y Govindjee, 2011).

#### *II.3.1.4. El ciclo Calvin-Benson*

El poder reductor generado vía las llamadas reacciones de luz, NADPH, así como la energía disponible de la hidrólisis de ATP, es crítico para producir azúcares a partir del CO<sub>2</sub> en el ciclo de Calvin-Benson, un proceso que se lleva a cabo en el estroma, con la intervención de la Rubisco (ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa), una enzima clave en la asimilación fotosintética de CO<sub>2</sub>. Este ciclo, representa la única ruta conocida de fijación de CO<sub>2</sub> en las plantas. Por esta razón es una figura principal en la bioquímica de las plantas, aunque conocido con varios acrónimos, entre ellos la ruta de reducción de las pentosa fosfato, el ciclo de reducción fotosintética de carbono, la ruta Calvin-Benson-Bassham, el ciclo Benson-Calvin, el ciclo C<sub>3</sub>, entre otros (Martin *et al.*, 2000).

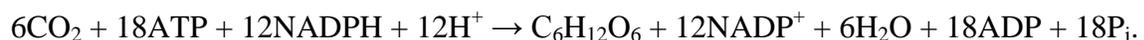


**Figura II.2.** El ciclo de Calvin-Benson. El ciclo puede dividirse en tres fases. La primera fase es la fijación de carbono o carboxilación, catalizada por la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco). La segunda es la fase reductiva, en la cual el glicerato-3-P es reducido a gliceraldehido-3-P (G3P) mediante la acción de la glicerato-3-P quinasa y la NADP-dependiente gliceraldehido-P deshidrogenasa. La tercera fase es la regeneración del aceptor ribulosa-1,5-bifosfato. En el inserto de la esquina superior izquierda se resalta la dependencia del ciclo de Calvin de los productos provenientes de las reacciones de luz. Tomado y modificado de Campbell *et al.* (2002).

La reacción completa puede ser descrita como la fijación de tres moléculas de CO<sub>2</sub> en un azúcar fosfato de tres carbonos, la triosa-P, con la incorporación de una molécula de

P<sub>i</sub>. Las reacciones del ciclo se realizan en el estroma y el ciclo incluye 13 reacciones catalizadas por once enzimas (Bowyer y Leegood, 1997).

El ciclo tiene tres fases (Fig. II.2): (i) la fijación de carbono que es la adición de CO<sub>2</sub> a la ribulosa 1,5-bifosfato (RuBP), con la formación de dos moléculas de glicerato-3-P, catalizada por la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco). (ii) Reducción de las dos moléculas de glicerato-3-P derivadas de la RuBP a gliceraldehído-3-fosfato con gasto de 2ATP y 2NADPH. Esta reacción es catalizada por la glicerato-3-P quinasa y la gliceraldehido-P-deshidrogenasa. Cinco de los seis átomos de carbono del glicerato-3-P debe ser reciclado para regenerar el sustrato aceptor, la RuBP. (iii) La regeneración del aceptor, RuBP, a partir de la triosa-P, mediante la cual cinco moléculas de tres carbonos son utilizadas para formar cinco moléculas de cinco carbonos. Así, cada molécula de ribosa-5-P es convertida a ribulosa-5-P la cual, a la vez es transformada a RuBP con un consumo de una molécula de ATP. Cada molécula de CO<sub>2</sub> fijado en el ciclo de Calvin requiere de 3 ATP y 2 NADPH que son provistos por el transporte de electrones fotosintético. En el ciclo de Calvin, el ATP y el NADPH provenientes de las reacciones de luz de la membrana fotosintética son utilizados para reducir el CO<sub>2</sub> a carbohidrato. Desde el punto de vista de la inversión de ATP por mol de CO<sub>2</sub> fijado, el ciclo de Calvin es bastante costoso. El proceso completo puede ser resumido en la siguiente reacción:



#### *II.4. Fluorescencia de clorofila a*

La fotosíntesis es uno de los procesos metabólicos más importantes en las plantas; por eso, medir su actividad también provee información acerca del “estado de salud” de la planta. En el estudio de la fotosíntesis, la fluorescencia de Chl *a* es una de las técnicas más ampliamente utilizadas, en estudios básicos y ecofisiológicos (Papageorgiou y Govindjee, 2004). Es una técnica no invasiva y muy sensitiva, aunque la fluorescencia de Chl *a* representa solamente entre 2 y 8 % de la energía absorbida (Lazár, 2006). Esta puede ser aplicada a cualquier tipo de muestra fotosintética desde una escala global hasta las unidades del FSII, sin la necesidad de preparaciones estandarizadas o complicadas.

El análisis de la fluorescencia de Chl *a* es relativamente sencillo. La energía luminosa absorbida por las moléculas de clorofila en una hoja puede seguir tres caminos: puede ser utilizada para conducir la fotosíntesis (fotoquímica), el exceso de energía puede ser disipado como calor o puede ser re-emitido como luz –fluorescencia de clorofila. Estos tres procesos se encuentran en competencia de manera que cualquier aumento en la eficiencia de uno puede disminuir los otros dos. Así, mediante la medición de la fluorescencia de Chl *a* se puede obtener información de los cambios en la eficiencia de la fotoquímica y de la disipación de calor (Maxwell y Johnson, 2000).

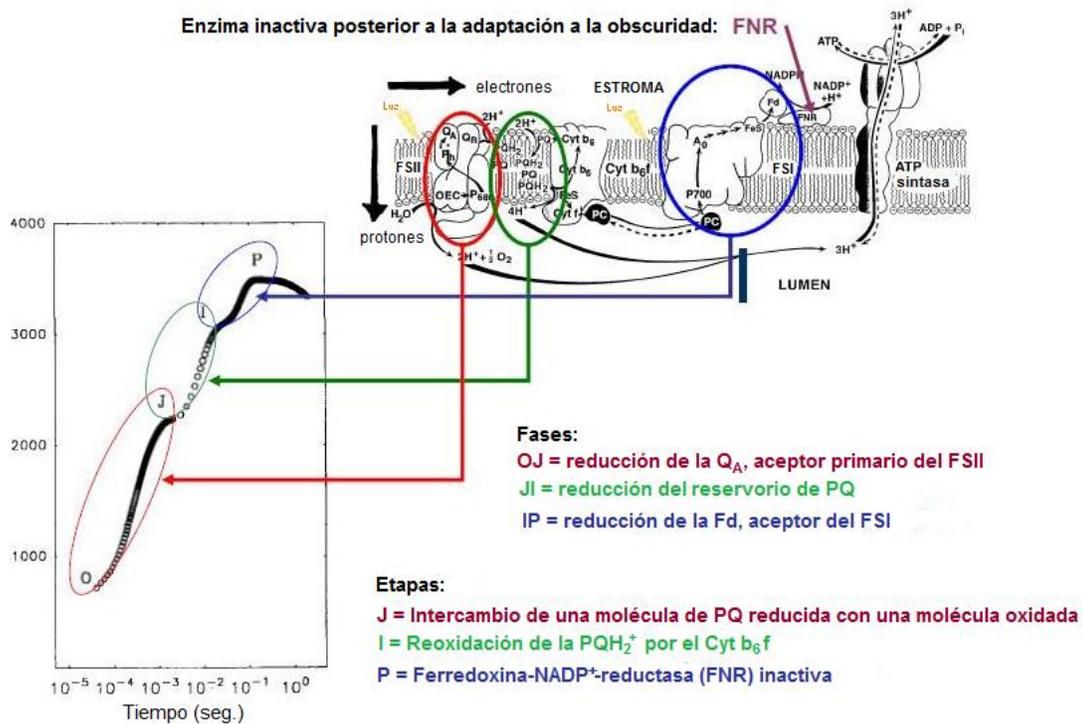
##### *II.4.1. Técnicas para medir la fluorescencia de clorofila a*

Existen dos técnicas utilizadas ampliamente para medir la fluorescencia de clorofilas, la técnica directa y la de modulación de la amplitud por pulso. En la primera la

traza de la fluorescencia de Chl *a* es la correspondiente a una muestra fotosintética, medida con iluminación continua. La misma fuente de luz (en general luz roja con longitud de onda de ~650 nm) se usa para la excitación de Chl *a* de la muestra fotosintética y la emisión de fluorescencia. Ésta es emitida a longitudes de onda mayores por lo que es posible separar la emisión de fluorescencia de la luz de excitación mediante filtros ópticos. En general, las mediciones se llevan a cabo en hojas adaptadas a la oscuridad y duran ~1 s.

El descubrimiento de la fluorescencia variable por Kautsky mostró que consiste de su aumento hasta un pico P ( $F_P$ ) y un decremento subsecuente hasta un estado estable ( $F_S$ ). En las plantas superiores y en algas la fluorescencia emitida a temperatura ambiente es originada predominantemente por las clorofilas antena del FSII. Los extremos reales del aumento rápido como  $F_0$  al origen O, cuando todos los centros de reacción (RC) del FSII están abiertos, y  $F_M$  la máxima  $F_P$  (alcanzada cuando todos los RCs están cerrados). Aunque el aumento de la fluorescencia sea medido con una resolución baja se ha demostrado que el aumento de  $F_0$  a  $F_M$  es multifásico, con pasos intermedios  $I_1$  e  $I_2$  (Schreiber *et al.*, 1986). La disponibilidad de un fluorímetro con luz directa (PEA – Plant Efficiency Analyzer, Hansatech Instruments), con tiempo prolongado de resolución, de 10  $\mu$ s, y el primer punto confiable (tomado como  $F_0$ ) a 50  $\mu$ s, permite grabar, en una escala logarítmica de tiempo, el aumento completo de la fluorescencia de O a P (Fig. II.3), con distintos pasos intermedios detectados precisamente – J (a 2 ms) e I (a cerca de 30 ms); la traza  $F_0 - F_J - F_I - F_P$  ( $F_M$ ) es, entonces, llamada *aumento rápido de la fluorescencia OJIP* (Strasser y Govindjee, 1991; Strasser *et al.*, 1995).

Con base en la *teoría del flujo de la energía en biomembranas* (Strasser, 1978), se ha desarrollado un análisis del aumento rápido de la fluorescencia OJIP, llamado *prueba-JIP* (para revisión ver Strasser *et al.*, 2004), el que liga los diferentes pasos y fases de las trazas con los estados redox del FSII y concomitantemente con las eficiencias en la transferencia de electrones en la cadena de intersistemas y hacia los aceptores de electrones finales del lado aceptor del FSI (Fig. II.3). El modelo, un “esquema Z” expresado por los flujos de energía, y la formulación matemática de la prueba-JIP se presentan en la Figura II.4 (para el glosario y definición de términos ver Anexo A1).



**Figura II.3.** Reducción de la cadena del transporte de electrones y su relación con la traza OJIP. Tomada y modificada de Ceppi (2010).

### II.4.1.1. Prueba JIP

La cascada de energía inicia con la absorción (ABS) por los pigmentos antena del FSII y finaliza con la reducción de los aceptores de electrones finales del lado aceptor de electrones del FSI (RE), conducido por el FSI (Fig. II.4). Los flujos de energía intermedios son los de captura (TR), definidos como los flujos de energía que conducen a la reducción de feofitina (Pheo) y  $Q_A$ , y el flujo de transporte de electrones (ET) que se refiere al transporte de electrones más allá de la  $Q_A^-$ . En cada paso el influjo de energía es bifurcado a un eflujo para la conservación energía, a través de la transferencia de electrones (flechas grises en Fig. II.4), y un eflujo para su disipación (flechas blancas; nótese que TR-ET es el flujo de energía que conduce a la acumulación de  $Q_A^-$ ).

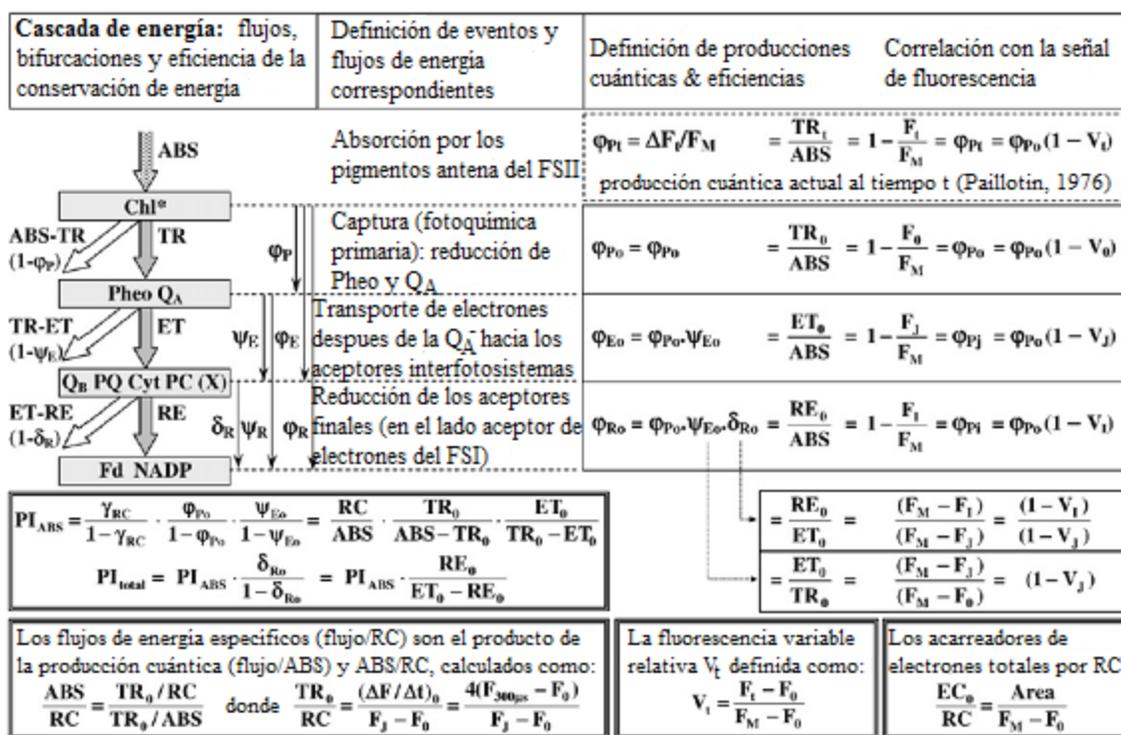


Figura II.4. Presentación esquemática de la prueba-JIP. Tomada y modificada de Strasser *et al.* (2010).

Las eficiencias, como fracciones del influjo de energía y transformadas a eflujos de energía que conducen a su conservación, son también identificadas (contiguas a las flechas entre los pasos secuenciales). En esa representación,  $\varphi$  se refiere a las producciones cuánticas (eficiencias basadas en la absorción; por ejemplo flujos por ABS),  $\psi$  representa eficiencias por TR y  $\delta$  la eficiencia por ET. Para cada bifurcación de energía, lo complementario de la eficiencia respectiva (como la fracción del influjo de energía que es transformada a eflujo de energía que no lleva a su conservación de la energía por la transferencia de electrones; flecha blanca) es indicada en paréntesis en el eflujo correspondiente.

La Figura II.4 también presenta las ecuaciones con las que las producciones cuánticas y las otras eficiencias al inicio de la iluminación (todos los RCs abiertos; subíndice “0”) son definidas y ligadas a la señal de fluorescencia, seleccionadas de las trazas de fluorescencia OJIP, nombradas  $F_0$ ,  $F_J$ ,  $F_I$  y  $F_M (=F_P)$ . Las ecuaciones con las cuales las producciones cuánticas están ligadas con la señal de fluorescencia son aplicaciones simples de la ecuación general de Paillotin (1976); acorde con esta ecuación, la producción cuántica en cualquier tiempo  $t$ , cuando la intensidad de fluorescencia es  $F_t$  (entre  $F_0$  y  $F_M$ ), es  $\varphi_{Pt} = 1 - F_t/F_M = \Delta F_t/F_M$  (nota: la ecuación  $\varphi_{Pt} = \Delta F_t/F_M$  es ahora conocida como la “ecuación de Genty”, después de ser retomada por Genty *et al.* en 1989). La ecuación general de Paillotin liga la producción cuántica a cualquier tiempo  $t$  con la producción cuántica máxima y lo complementario de la fluorescencia variable  $V_t$  a ese tiempo, como  $\varphi_{Pt} = \varphi_{P0} (1 - V_t)$ . La fórmula por la que  $V_t$  es definida en base a las señales de fluorescencia,  $V_t = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$ , está dada al final de la figura, junto con la fórmula

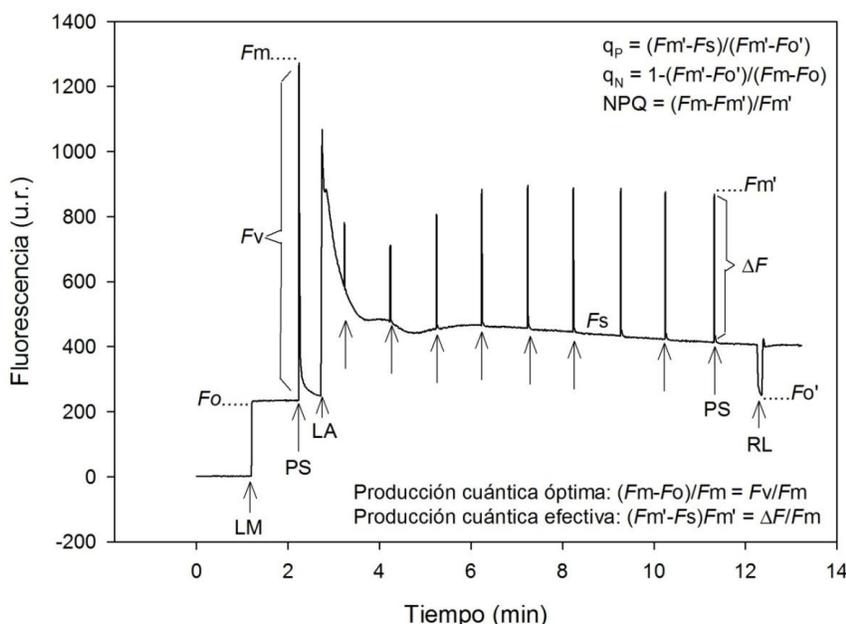
que define los acarreadores de electrones totales por centro de reacción ( $EC_0/RC$ ), los flujos de energía específicos (flujos de energía por RC; unidades arbitrarias) y los índices de desempeño  $PI_{ABS}$  y  $PI_{total}$ .

#### *II.4.1.2. Fluorimetría de modulación de la amplitud por pulso (PAM) y la técnica de análisis de extinción*

La fluorimetría de modulación de la amplitud por pulso (PAM por sus siglas en inglés) es utilizada principalmente en estudios de adaptación a la luz y en estado estable (Fig. II.5). En el caso de la fluorimetría PAM la luz para la excitación de la muestra fotosintética (luz actínica) es distinta de la luz utilizada para detectar la fluorescencia (luz de medición). La fluorescencia es detectada por una luz modulada no actínica que consiste de pulsos muy cortos (de  $\mu s$ ). Para cerrar los RCs del FSII se aplican pulsos intensos de luz. Estos son llamados pulsos de saturación con longitud (200-800 ms) similar a los pulsos de luz estándar utilizados para inducir las trazas OJIP, pero con intensidad  $>7000 \mu mol$  fotones  $m^{-2} s^{-1}$ . La ventaja de la fluorimetría PAM sobre la técnica de fluorescencia directa es que la *producción* de fluorescencia es detectada y no la intensidad (la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la intensidad de la luz de excitación por lo que esta puede cambiar varios órdenes de magnitud).

La fluorimetría PAM está íntimamente relacionada a la técnica de pulso de saturación. Esta técnica fue desarrollada para separar el efecto de los procesos de extinción fotoquímico y no fotoquímico en la producción de la fluorescencia de Chl *a* en el estado

adaptado a la luz. De acuerdo a este concepto, el amortiguamiento fotoquímico está relacionado al estado redox de la  $Q_A$  (durante la adaptación a la luz algunos RC pueden re-abrirse), mientras que el amortiguamiento no fotoquímico representa procesos no relacionados al flujo de electrones.



**Figura II.5.** Análisis de extinción de la fluorescencia por el método de pulso de saturación en una hoja de *A. salmiana* adaptada a la oscuridad. Se muestran los niveles de fluorescencia típicos y la definición de los parámetros de fluorescencia básicos.  $F_o$ , producción de fluorescencia en una muestra adaptada a la oscuridad;  $F_m$ , producción de fluorescencia máxima de una muestra adaptada a la oscuridad producto de un pulso de saturación de luz;  $F_v$ , aumento de la producción de fluorescencia durante un pulso de saturación de luz;  $F_s$ , producción de fluorescencia observada a cualquier tiempo durante la iluminación;  $F_m'$  producción de fluorescencia máxima de una muestra iluminada alcanzada por un pulso de saturación de luz;  $F_o'$ , producción de fluorescencia mínima observada poco después de un oscurecimiento y reoxidación del lado aceptor del FSII mediante exposición al rojo lejano;  $q_p$ , coeficiente de extinción fotoquímico;  $q_N$ , coeficiente de extinción no fotoquímico; NPQ, parámetro de extinción no fotoquímico; LM, luz de medición; LA, luz actínica, PS, pulso de saturación.

Cuando se usa la técnica de pulso de saturación, se dan varios pulsos de saturación de luz durante la adaptación a la luz para seguir la cinética de  $F_m'$  o el NPQ (el parámetro de extinción no fotoquímico). Posteriormente de 10 a 15 min de adaptación a la luz, la luz actínica es apagada e iluminada con luz en el rojo lejano durante 1 a 3 s, lo que permite que  $F_o'$  pueda ser determinada.  $F_m'$  y  $F_o'$  son utilizadas para calcular el coeficiente de extinción fotoquímico (qP) y el no fotoquímico (qN). La fluorimetría PAM es ampliamente utilizada hoy en día, especialmente en la investigación ecofisiológica. Esta puede ser útil en la valoración del daño inducido por el estrés a los organismos fotosintéticos. Una revisión de este enfoque es presentada por Maxwell y Johnson (2000) y Schreiber (2004).

### **III. Efecto de la disponibilidad de agua en la germinación y crecimiento inicial de la raíz de *Agave lechuguilla* y *Agave salmiana* (Agavaceae)**

#### **III.1. Resumen**

La reproducción sexual de las plantas de *Agave lechuguilla* y *Agave salmiana* produce un gran número de semillas. Sin embargo, las plántulas provenientes de semillas son muy raras en campo. Se sabe que la germinación de las semillas y el crecimiento de la plántula son momentos críticos en el desarrollo de la planta en condiciones de disponibilidad de agua limitada. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de potenciales de agua bajos en la germinación de las semillas, crecimiento inicial de la raíz y estabilidad de la membrana de *A. lechuguilla* y *A. salmiana* para establecer los requerimientos de agua de estas plantas suculentas de zonas semiáridas y áridas. Se evaluó la imbibición, germinación, crecimiento inicial de la raíz, la materia seca de las plántulas, el contenido relativo de agua y la estabilidad de las membranas de la raíz en cuatro potenciales de agua ( $\Psi_w$ ) de -0.03, -0.48, -1.19 y -2.04 MPa a  $25 \pm 4$  °C en la oscuridad. La hipótesis probada fue que ambas especies de *Agave* presentan una germinación y crecimiento inicial de la raíz exitosa en condiciones limitantes de humedad. Los resultados mostraron que en ambas especies la disminución del  $\Psi_w$  redujo la toma de agua por la semilla y el porcentaje de germinación en comparación con el testigo (-0.03 MPa). El tiempo para alcanzar la germinación máxima y el 50% de la germinación aumentó conforme se restringió la humedad. La longitud final de la raíz y la tasa de crecimiento fue mayor para *A. salmiana* en comparación con *A. lechuguilla* y disminuyó en los  $\Psi_w$  de -1.19 y -2.04 MPa. Ambas especies de *Agave* aumentaron la liberación de electrolitos por la raíz en el  $\Psi_w$  de -1.19 MPa, lo que sugiere una pérdida en la integridad y estabilidad de la membrana en respuesta al déficit de agua. Estos resultados indican que la reducción en la germinación y en el crecimiento inicial de la raíz en ambas especies de *Agave* es una característica adaptativa común para contender con la limitación de disponibilidad de agua durante las primeras etapas de desarrollo. Por lo tanto, estas dos especies están restringidas a germinar en periodos en el tiempo y espacio cuando el agua está disponible en cantidad y duración pero con una probabilidad reducida de éxito.

### III.2. Abstract

Sexual reproduction in both *Agave lechuguilla* and *A. salmiana* plants produces a large number of seeds. However, sexually derived seedlings are rare under field conditions. It is known that seed germination and seedling growth are critical stages of plant development under low water availability. The aim of this study was to test the effect of low water potential on seed germination, seedling root growth and root membrane stability of *A. lechuguilla* and *A. salmiana* to establish water requirements for these arid and semi-arid succulents. Seed imbibition, germination, initial root growth, seedling dry mass, relative water content, and root membrane stability were tested at four water potentials ( $\Psi_w$ ) of -0.03, -0.48, -1.19 and -2.04 MPa at  $25 \pm 4$  °C in the dark. It was hypothesized that both *Agave* species will have a successful seed germination and root growth in conditions of limiting humidity. In both species the lower  $\Psi_w$  reduced seed water uptake and germination percentage compared to control (-0.03 MPa). The time to reach maximal seed germination and 50% of germination increased as water availability was restricted. The final root length and root growth rate were higher for *A. salmiana* than for *A. lechuguilla* and lowered at  $\Psi_w$  of -1.19 and -2.04 MPa. Both *Agave* species increased root electrolyte leakage at  $\Psi_w$  of -1.19 MPa, which suggest a loss in membrane integrity and stability in response to water deficit. These results indicate that the reduction in germination and initial root growth in both *Agave* species is an adaptive common feature to deal with low water availability during the first stages of development. Hence, these two species are constrained to germinate on periods of space and time where water is available in quantity and duration but with a low succes probability.

### III.3. Introducción

Las poblaciones de plantas se regeneran a través de dos mecanismos principales: reproducción sexual, que involucra la producción de semillas, y crecimiento vegetativo, que involucra la producción de brotes o clones (Arizaga y Ezcurra, 2002). Varias especies del género *Agave* presentan ambos mecanismos de propagación. Sin embargo, el

establecimiento exitoso *in situ* de las plántulas derivadas de semillas representa una proporción baja del total de las semillas (Arizaga y Ezcurra, 2002). En *Agave deserti* la propagación es principalmente vegetativa, mientras que el establecimiento de plántulas provenientes de semilla es un evento extremadamente raro (Nobel, 1992). No obstante, el establecimiento de las semillas es necesario para el mantenimiento de la diversidad genética de las poblaciones naturales (Harper, 1977). Así, la germinación y el establecimiento de plántulas de *Agave* provenientes de semilla parece producirse en algunos años favorables, por la combinación de temperaturas y precipitación pluvial adecuadas, y en sitios protegidos de depredadores y de altos niveles de irradianza (a la sombra de arbustos o rocas) (Franco y Nobel, 1988).

La sequía es una de las principales causas de mortandad de plántulas (Moles y Westoby, 2004) y en los ambientes áridos y semiáridos la humedad del suelo es uno de los principales factores que modulan la germinación, sobrevivencia y establecimiento de las plantas (Jordan y Nobel, 1979; Dubrovsky, 1996). La germinación debe coincidir con los periodos en los que hay suficiente humedad en el suelo que aseguren el crecimiento de la raíz y alcance una mayor profundidad, donde generalmente hay mayor humedad (Köchy y Tielbörger, 2007). Por lo que, en esos ambientes con humedad limitada, el desarrollo acelerado de un sistema radical funcional es crítico para el establecimiento exitoso de las plántulas (Berta *et al.*, 1995).

México tiene 150 de las 200 especies de *Agave* conocidas y cerca del 69% son endémicas de este país (García, 2002). El uso de diversas especies de este género es actual, y en la mayoría de los casos se remonta a las épocas precolombina y prehistórica. El *Agave lechuguilla* Torrey es una planta de las zonas áridas y semiáridas de México y sur de Estados Unidos, es de gran importancia económica por su fibra desde hace 8 000 años o más (Reyes-Agüero *et al.*, 2000), mientras que de *Agave salmiana* Otto Ex Salm-Dyck se obtienen bebidas, es el caso del exudado conocido como aguamiel y que es recolectado de los tallos raspados de plantas maduras, dicho exudado también puede ser fermentado para producir ‘pulque’ (Nobel, 1990); además, los tallos de esta especie son utilizados para producir una bebida destilada, el mezcal. El objetivo de este estudio fue investigar el efecto del déficit de humedad en la germinación y crecimiento inicial de la raíz de dos especies de *Agave* y relacionar la respuesta con las características de humedad necesarias para su establecimiento. Se seleccionaron dos especies de *Agave* para determinar el efecto de cuatro condiciones de humedad que pueden presentarse en las zonas áridas y semiáridas del centro de México. La hipótesis planteada es que las dos especies de *Agave* están adaptadas para llevar a cabo la germinación y crecimiento inicial de la raíz exitosamente en condiciones de humedad limitante para otras especies.

### **III.4. Materiales y Métodos**

#### *III.4.1. Material vegetal*

Semillas de *A. lechuguilla* fueron recolectadas de inflorescencias completas provenientes del área natural protegida Sierra de Guadalupe, D.F. (99°07'O, 19°37'N, elevación 2400 msnm) y de *A. salmiana* de San Lorenzo Nenamicoyan, Estado de México

(99° 26'O, 19° 52'N, elevación 2,562 msnm) durante los años 2008 y 2009. En el laboratorio, las semillas fueron lavadas con agua y sumergidas en una solución comercial de hipoclorito de sodio (1% v/v) para su esterilización superficial. Posteriormente las semillas fueron secadas con toallas de papel y almacenadas en la oscuridad a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) hasta su utilización.

#### *III.4.2. Tratamientos y diseño experimental*

La disponibilidad de humedad fue evaluada en cuatro niveles o potenciales de agua ( $\Psi_w$ ): -0.03 (capacidad de campo, CC), -0.48, -1.19 y -2.04 MPa (déficits de humedad), respectivamente, con agua desionizada (CC) o una concentración de 200, 300 y 400 g de PEG 8000 (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, USA) por litro. El PEG 8000 fue disuelto en agua desionizada mediante agitación constante a 25°C por 24 h. El  $\Psi_w$  del medio fue verificado con un osmómetro de presión de vapor (Wescor Inc., Utah, USA, modelo 5520) calibrado con estándares de NaCl Opti-Mole (Wescor Inc., Utah, USA).

Se realizaron cuatro repeticiones de cada tratamiento, una repetición estuvo formada por una caja petri de 14 cm de diámetro que contenían un papel filtro Whatman No. 1 (Whatman International Ltd., Maidstone, England) humedecido con 6.25 mL de una de las soluciones y 25 semillas de alguna de las especies de *Agave*. El peso de cada unidad experimental fue registrado diariamente, y mantenido constante con agua desionizada que fue agregándose diariamente a cada una de ellas. Las cajas petri fueron mantenidas en una germinadora a  $25 \pm 4$  °C en oscuridad, excepto por los minutos en los que se realizaron las mediciones de las variables en condiciones de laboratorio. El experimento se realizó en un

arreglo factorial (2x4) completamente al azar con dos factores, especie (con dos niveles) y humedad disponible en el medio (con 4 niveles). Con excepción de la germinación acumulada en el tiempo, las variables evaluadas fueron analizadas con un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias Tukey con  $\alpha=0.05$ , con el procedimiento GLM de SAS versión 9.1 (SAS Institute, NC, USA).

#### *III.4.3. Imbibición*

Se registró la masa inicial individual de 12 semillas de cada tratamiento, y se cuantificó el incremento del peso de cada una con una balanza analítica (Scientech Inc., USA), hasta su germinación o hasta que se dio por terminado el experimento. La masa de las semillas fue usada para calcular el porcentaje de agua embebida por las semillas respecto a su propia masa.

#### *III.4.4. Germinación*

Las semillas fueron revisadas diariamente, durante 45 d, y el tiempo para la germinación fue registrado. Se consideró germinada la semilla cuando la raíz había alcanzado al menos 1 mm de longitud. La longitud fue medida con un vernier digital (Mitutoyo, Japón). Los datos de la germinación acumulada fueron analizados con modelos de regresión logística, para obtener el mejor ajuste, con el procedimiento LOGISTIC del paquete estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute, NC, USA). Dado un modelo, la  $X^2$  y la desviación divididas entre sus grados de libertad deben ser  $\approx 1$ , cuando son mayores la suposición de variación binomial no es válida y se dice que los datos presentan sobredispersión, éste fenómeno comúnmente observado en datos de germinación fue

corregido con el método de Williams (SAS, 2004). Las diferencias entre los efectos principales se realizaron mediante pruebas de comparación múltiple con la función CONTRAST disponible en el procedimiento logístico de SAS, con  $\alpha=0.05$  (SAS, 2004).

#### *III.4.5. Ajuste de la función inversa normal*

El tiempo para alcanzar la germinación máxima ( $m$ ) y el 50% de la germinación ( $T_{50}$ ) fue obtenido a partir de la curva de germinación acumulada en el tiempo ajustada a la distribución Gaussiana inversa (O'Neill *et al.*, 2004) con el procedimiento CUMDISTRIBUTION de Genstat (Genstat 6.2, IACR-Rothamsted, UK). El error estándar del parámetro  $m$  y la  $T_{50}$  fue estimado y utilizados para realizar las comparaciones múltiples ( $t$ -tests), con el comando DISTR.T de Excel (Office Excel 2007, Microsoft, USA) y determinar así las diferencias significativas entre los valores de  $m$  y  $T_{50}$ , con  $\alpha=0.05$  (Motulsky y Christopoulos, 2003).

#### *III.4.6. Crecimiento longitudinal de la raíz*

Se evaluó diariamente la elongación de la raíz de 12 plántulas de cada tratamiento, seleccionadas al azar, con un vernier digital (Mitutoyo, Japón), hasta que detuvo su crecimiento. La función de Korf fue utilizada para describir el crecimiento longitudinal de la raíz:

$$y = A e^{-k/t^d}$$

donde  $A$  es la asíntota de la longitud final,  $k$  es un parámetro relacionado con la tasa de crecimiento,  $t$  el tiempo (días) y  $d$  un parámetro de forma (Palahí *et al.*, 2004). Este modelo provee parámetros geométricos que pueden ser ligados a la dinámica de crecimiento de la raíz. Los datos de crecimiento longitudinal de la raíz en el tiempo fueron ajustados mediante el procedimiento PROC MODEL del paquete estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute, NC, USA). El error estándar de los parámetros fue utilizado para realizar las comparaciones múltiples ( $t$ -tests), con el comando DISTR.T de Excel (Office Excel 2007, Microsoft, USA) para determinar las diferencias significativas entre los parámetros de cada tratamiento con  $\alpha=0.05$  (Motulsky y Christopoulos, 2003).

#### III.4.7. Bondad de ajuste de los modelos

Como una medida de la bondad de ajuste del modelo a los datos, se examinaron dos estadísticos: la raíz del cuadrado medio del error (RMSE), el cual analiza la exactitud de las estimaciones en las mismas unidades que la variable dependiente, y el coeficiente de determinación (también referido como pseudo- $R^2$  cuando es aplicado en regresión no lineal), el cual muestra la proporción de la variación total de la variable dependiente que es explicada por el modelo. Aunque existen varios inconvenientes asociados con el uso de  $R^2$  en la regresión no lineal, la utilidad general de una medida global de lo adecuado del modelo parece solventar algunas de sus limitaciones (Ryan, 1997). La expresión de estos estadísticos es la siguiente:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - p}}$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

donde  $y_i$ ,  $\hat{y}_i$  y  $\bar{y}$  son los valores observados, los predichos y los valores promedio de la variable dependiente, respectivamente,  $n$  es el número total de observaciones y  $p$  es el número de parámetros del modelo.

#### III.4.8. Biomasa seca final y estado hídrico de las plántulas

La biomasa acumulada fue cuantificada en doce plántulas de cada tratamiento, cosechadas 45 d después del inicio del ensayo (DDIE), colocadas en una estufa a 70°C, y pesadas 72 h después en una balanza analítica (Scientech Inc., USA). Por otra parte, como una medida del estado hídrico de las plántulas se midió el contenido relativo de agua (CRA) de acuerdo con lo descrito por Beadle *et al.* (1993); para esto, se obtuvo la biomasa fresca ( $W_f$ ) de 12 plántulas individuales de cada tratamiento, se colocaron en 20 mL de agua desionizada durante 24 h, se obtuvo el peso de la biomasa turgente ( $W_t$ ), después se secaron en una estufa, a 70°C y se registró el peso de la biomasa seca ( $W_d$ ). El contenido relativo de agua se calculó con la siguiente ecuación:

$$CRA (\%) = \left[ \frac{(W_f - W_d)}{(W_t - W_d)} \right] 100$$

#### III.4.9. Liberación de electrolitos

Las membranas celulares de las plantas forman parte de las primeras regiones subcelulares afectadas por los diferentes factores inductores de estrés abiótico, por lo que el

mantenimiento de su integridad y estabilidad en esas condiciones es una medida indirecta de la tolerancia de factores como la sequía (Bajji *et al.*, 2001). Por esta razón, se recolectaron los primeros 40 mm de raíz, a partir del ápice, de 12 plántulas de cada tratamiento, se registró su peso y se lavaron con agua desionizada para eliminar los residuos de PEG. Enseguida, las raíces fueron colocadas en recipientes con 15 mL de agua desionizada y mantenidas en agitación constante, a temperatura del laboratorio, durante 3 h. En ese tiempo la conductividad eléctrica del medio líquido ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) fue medida, con un conductímetro (Horiba B-173, Kyoto, Japón), en intervalos de 30 min. La conductividad registrada al término de las 3 h es referida como  $C_0$ . Posteriormente, el material vegetal fue congelado durante 24 h, al término de este tiempo las muestras fueron colocadas en agitación constante con agua desionizada a temperatura ambiente del laboratorio y se registró la conductividad referida como  $C_T$ . La conductividad del agua desionizada antes de la inmersión de la raíz fue medida y referida como  $C_W$ . El porcentaje de electrolitos (EL) fue calculado como lo describió Aroca *et al.* (2005):

$$EL = \left[ \frac{(C_0 - C_W)}{(C_T - C_W)} \right] 100$$

#### *III.4.10. Normalidad y homoscedasticidad*

La normalidad y homogeneidad de la varianza de las variables dependientes fueron determinadas con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene respectivamente, con el programa estadístico SAS (versión 9.1, SAS Institute, NC, USA, SAS, 2004). En los casos en los que la normalidad y homogeneidad de la varianza no se cumplió, la transformación

de los datos se realizó con Box-Cox (Box y Cox, 1964), en Minitab versión 14.1 (Minitab Inc., USA), y luego se realizaron los análisis correspondientes.

### III.5. Resultados

#### III.5.1. Imbibición y germinación

*Agave lechugilla* presentó semillas significativamente menores que *A. salmiana* ( $4.9 \pm 0.02$ -y  $8.0 \pm 0.57$  mg por semilla, respectivamente) y un contenido de humedad inicial de  $9.0 \pm 0.1$  y  $9.2 \pm 0.2$  % respectivamente. El análisis factorial detectó un efecto significativo en el porcentaje de imbibición máxima (Cuadro III.1) en el factor especie ( $P < 0.0001$ ), en promedio *A. salmiana* presentó una absorción máxima de 65.4% en comparación con *A. lechuguilla* con 58.7%. Podemos decir que la absorción de agua por ambas especies fue similar. En ambas especies los  $\Psi_w$  menores disminuyeron significativamente ( $P < 0.0001$ ) la cantidad de agua absorbida (Cuadro III.1), respecto a los tratamientos con  $-0.03$  MPa (Cuadro III.2), con una imbibición máxima de 48.6 y 60.15% en el  $\Psi_w$  de  $-2.04$  MPa para *A. lechuguilla* y *A. salmiana* respectivamente.

Las diferencias en la imbibición de las especies en los distintos  $\Psi_w$  se reflejaron en la germinación total (Cuadro III.1) y en la tasa de germinación (Figura III.1). Así, después de 44 d la germinación de ambas especies fue afectada significativamente por la reducción en el potencial de agua del medio (Cuadro III.2). Cuando las semillas se mantuvieron en la condición de  $\Psi_w$  más alto ( $-0.03$  MPa) se alcanzaron los mayores porcentajes de

germinación en ambas especies y fue significativamente mayor en *A. lechuguilla* (95%) en comparación con *A. salmiana* (63%) (Cuadro III.1 y III.2).

**Cuadro III.1.** Estadísticos del análisis de varianza (ANOVA) y de regresión logística de los efectos principales en las variables respuesta evaluadas en dos especies de *Agave* en cuatro niveles de humedad.

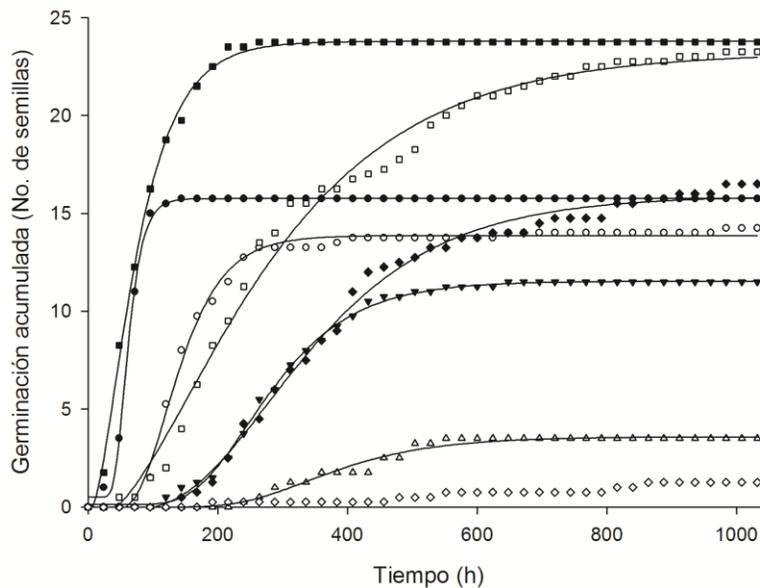
Respuesta	ANOVA			
	Efecto	df	F	p-value
Imbibición	Especie	1	17.47	<0.0001
	$\Psi_w$	3	17.37	<0.0001
	Especie $\times\Psi_w$	3	1.22	0.3082
Biomasa seca	Especie	1	310.55	<0.0001
	$\Psi_w$	3	11.78	<0.0001
	Especie $\times\Psi_w$	3	1.13	0.3436
CRA	Especie	1	0.56	0.4586
	$\Psi_w$	3	7.01	0.0004
	Especie $\times\Psi_w$	3	2.31	0.0851
EL	Especie	1	1.15	0.3007
	$\Psi_w$	2	8.49	0.0034
	Especie $\times\Psi_w$	2	2.17	0.1488
Regresión Logística				
	Efecto	G.L.	X <sup>2</sup>	p-value
Germinación	Especie	1	18.3479	<0.0001
	$\Psi_w$	3	121.9407	<0.0001
	Especie $\times\Psi_w$	3	24.9859	<0.0001

Contenido relativo de agua (CRA) y liberación de electrolitos (EL).

**Cuadro III.2.** Peso del agua requerida por semilla para germinar, porcentaje de agua embebida y germinación a 45 DDS y a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Especie	$\Psi_w$ (MPa)	Imbibición (%)	Germinación (%)
<i>A. lechuguilla</i>	-0.03	67.87 $\pm$ 1.67 ab	95 $\pm$ 2.52 a
	-0.48	62.42 $\pm$ 2.47 abc	93 $\pm$ 3.41 a
	-1.19	55.99 $\pm$ 2.45 cd	66 $\pm$ 7.75 b
	-2.04	48.62 $\pm$ 2.07 d	5 $\pm$ 1.91 c
<i>A. salmiana</i>	-0.03	71.49 $\pm$ 1.91 a	63 $\pm$ 5.51 bd
	-0.48	67.17 $\pm$ 1.73 ab	57 $\pm$ 4.72 bde
	-1.19	62.96 $\pm$ 2.90 abc	46 $\pm$ 2.58 e
	-2.04	60.15 $\pm$ 2.54 bc	14 $\pm$ 3.83 cf

Medias  $\pm$  el E.E.,  $n=12$ , excepto en germinación donde  $n=25$ . Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas dentro de la misma columna con  $P<0.05$ .



**Figura III.1.** Germinación acumulada observada y ajustadas al modelo de distribución inversa normal (— línea continua) de *A. lechuguilla* a -0.03 (■), -0.48 (□), -1.19 (◆) y -2.04 (◇) MPa y *A. salmiana* a -0.03 (●), -0.48 (○), -1.19 (▼) y -2.04 (△) MPa ( $n = 4$ ). Para el tratamiento de *A. lechuguilla* con -2.04 MPa no se logró el ajuste del modelo.

Los parámetros estimados del modelo, el error estándar y los estadísticos de la bondad de ajuste a la distribución Gaussiana se muestran en el Cuadro III.3. De los ajustes realizados, el de *A. lechuguilla* en el  $\Psi_w$  de -0.48 MPa fue el que presentó el menor ajuste indicado por los estadísticos de bondad de ajuste (RMSE y  $R^2$ ). No obstante, la mayoría de los modelos ajustados explican más del 75% de la variación total. Adicionalmente, las curvas predichas se sobrepone notablemente con las descritas por los valores observados (valores de RMSE pequeños), lo que indica que la tasa de germinación disminuyó conjuntamente con la caída en el  $\Psi_w$  del medio en ambas especies (Figura III.1).

**Cuadro III.3.** Parámetros  $b$ ,  $m$ ,  $T_{50}$  y estadísticos de la bondad de ajuste del modelo inversa normal, el cual describe la germinación en el tiempo de dos especies de *Agave* en cuatro potenciales de agua. El error estándar se muestra entre paréntesis.

<b>Especie</b>	<b><math>\Psi_w</math> (MPa)</b>	<b><math>b</math></b>	<b><math>m</math></b>	<b><math>T_{50}</math> (h)</b>	<b>RMSE</b>	<b><math>R^2</math></b>
<i>A. lechuguilla</i>	-0.03	146 (28.9)	82.2 (8.65) d	64.5 (5.61) d	0.3537	0.8749
	-0.48	458.7 (90.6)	337.1 (61.91) ab	248.8 (31.63) b	0.6794	0.5376
	-1.19	1227 (336)	443.5 (58.83) a	376.8 (39.93) a	0.4859	0.7642
	-2.04	-	-	-	-	-
<i>A. salmiana</i>	-0.03	338.7 (78.4)	61.5 (4.58) e	56.4 (3.83) d	0.4599	0.7889
	-0.48	939 (255)	156.0 (11.04) c	144.1 (10.13) c	0.2093	0.9551
	-1.19	1442 (389)	304.9 (28.59) b	276.1 (23.71) b	0.3749	0.8592
	-2.04	4786 (2614)	395.8 (40.41) ab	380.2 (37.13) a	0.2806	0.9213

Valores de  $T_{50}$  seguidos de letras distintas son significativamente distintos con  $P < 0.05$ .

El tiempo para alcanzar la germinación máxima ( $m$ ) y el 50% de la germinación ( $T_{50}$ ) por cada tratamiento (Cuadro III.3) fue obtenido de las ecuaciones del ajuste a la inversa normal. El parámetro  $m$  y  $T_{50}$  aumentaron con la disminución del  $\Psi_w$  del medio (Cuadro III.3). Así,  $m$  aumentó 4.1 y 5.4 veces en comparación con el testigo (-0.03MPa) en *A. lechuguilla* y 2.5, 4.9 y 6.4 veces en *A. salmiana*, similarmente el  $T_{50}$  de *A. lechuguilla* aumentó 3.8 y 5.8 veces con el  $\Psi_w$  de -0.48 y -1.19 MPa respectivamente, en comparación con el testigo, mientras que en *A. salmiana* aumentó 2.5, 4.8 y 6.7 veces en los  $\Psi_w$  de -0.48, -1.19 y -2.04 MPa respecto al testigo. El  $T_{50}$  fue significativamente igual entre las especies con el  $\Psi_w$  mayor, mientras que  $m$  si fue significativamente diferente entre las especies en dicho  $\Psi_w$ .

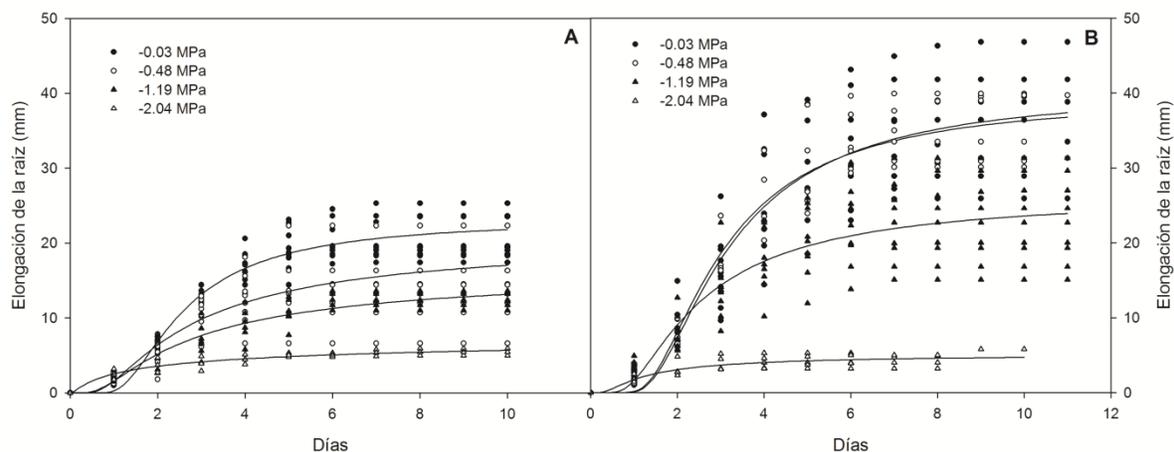
### III.5.2. Crecimiento inicial de la raíz

La función de Korf es un modelo utilizado para describir el crecimiento de las plantas a través del tiempo (Li *et al.*, 2000; Palahí *et al.*, 2004). Entre todos los tratamientos los de menor  $\Psi_w$  de ambas especies fueron los que mostraron los ajustes más bajos (Cuadro III.4). La comparación de las curvas ajustadas y las obtenidas experimentalmente muestra una tendencia similar de los datos (Figura III.2). Así, el modelo de Korf presentó un buen ajuste de los datos observados en los distintos  $\Psi_w$  pues explica gran parte de la variación total (Cuadro III.4 ver  $R^2$ ).

**Cuadro III.4.** Valores de los parámetros  $A$ ,  $k$ ,  $d$  y estadísticos de la bondad de ajuste derivados del ajuste del modelo de Korf que describe el crecimiento de la raíz de dos especies de *Agave* en cuatro potenciales de agua. El error estándar se muestra entre paréntesis.

Espece	$\Psi_w$ (MPa)	$A$ (mm)	$k$ (mm día <sup>-1</sup> )	$d$	RMSE	$R^2$
<i>A. lechuguilla</i>	-0.03	23.09 (1.36) b	4.49 (1.02) ab	1.89 (0.31) a	2.1737	0.9088
	-0.48	20.60 (5.94) bc	2.56 (0.41) bc	1.13 (0.45) ab	2.8409	0.7231
	-1.19	16.49 (2.40) c	2.35 (0.27) c	1.01 (0.25) b	1.5637	0.8415
	-2.04	8.59 (1.23) d	1.23 (0.75) cd	0.47 (0.57) b	0.7117	0.6770
<i>A. salmiana</i>	-0.03	39.40 (2.92) a	5.67 (2.16) ab	1.84 (0.42) ab	6.1416	0.7821
	-0.48	40.38 (2.51) a	6.03 (1.70) a	1.81 (0.31) a	3.8761	0.9066
	-1.19	26.48 (2.44) b	2.81 (0.67) abc	1.38 (0.34) ab	4.6074	0.6737
	-2.04	5.18 (0.89) e	1.09 (0.21) d	1.05 (0.51) ab	0.8246	0.5699

Valores dentro de la misma columna seguidos por letras distintas son significativamente diferentes con  $P < 0.05$ .



**Figura III.2.** Curvas del crecimiento longitudinal de la raíz modeladas con la ecuación de Korf sobre los valores observados en el tiempo en *A. lechuguilla* (A) y *A. salmiana* (B) en cuatro  $\Psi_w$  del medio.

El parámetro  $A$  derivado del modelo de Korf indica el tamaño final (asintótico) del crecimiento longitudinal de la raíz (Li *et al.*, 2000). Los  $\Psi_w$  mayores a  $-0.5$  MPa generaron el mayor crecimiento de la raíz (Cuadro III.4); y éste decreció con el  $\Psi_w$  del medio. A su vez, *A. salmiana* presentó una raíz de mayor talla, dado que en las mismas condiciones de germinación alcanzó 3.9 cm de longitud, mientras que *A. lechuguilla* alcanzó únicamente 2.3 cm. El parámetro  $k$  es inversamente proporcional a la tasa de crecimiento inherente (Li *et al.*, 2000), por lo que dicho parámetro refleja la tasa de crecimiento de la raíz. Así, *A. salmiana* presentó las mayores tasas de crecimiento con 5.67 y 6.03  $\text{mm d}^{-1}$  en los  $\Psi_w$  de  $-0.03$  y  $-0.48$  MPa respectivamente, en comparación *A. lechuguilla* presentó una tasa máxima de 4.49  $\text{mm d}^{-1}$  (Cuadro III.4). En ambas especies, los  $\Psi_w$  menores disminuyeron la tasa de crecimiento de la raíz con los descensos más evidentes en el  $\Psi_w$  de  $-2.04$  MPa (Cuadro III.4). El parámetro  $d$  es un exponente en la ecuación de atenuación que dicta la forma de la curva y la posición del punto de inflexión (Li *et al.*, 2000). Entre más alto es el

valor, más lento es el crecimiento y el punto de inflexión aparece tardíamente (Li *et al.*, 2000). En ambas especies, los  $\Psi_w$  menores disminuyeron el valor del parámetro  $d$  con un decremento marcado en *A. lechuguilla* a -2.04 y -1.19 MPa, lo que propició que el punto de inflexión apareciera en los primeros días; es decir, el crecimiento se atenuó en los días iniciales (Figura III.2). Esto se refleja en la forma de la curva y en que se alcanza la longitud máxima en menor tiempo (Figura III.2).

### III.5.3. Biomasa seca y estado hídrico de las plántulas

La biomasa seca total de la plántula al término del periodo experimental mostró efectos significativos en el nivel de especie y  $\Psi_w$  del medio (Cuadro III.1). La biomasa seca total fue 55% mayor en *A. salmiana* respecto a *A. lechuguilla* ( $P < 0.0001$ ). La disminución del  $\Psi_w$  provocó un decremento de la biomasa seca final de las plántulas de ambas especies (Cuadro III.5). Por otra parte, el CRA de las plántulas testigo (-0.03 MPa) de ambas especies fue superior a 85%, mientras que las plántulas crecidas en los otros  $\Psi_w$  mostraron una disminución del CRA al final del periodo experimental (Cuadro III.5).

### III.5.4. Liberación de electrolitos por la raíz

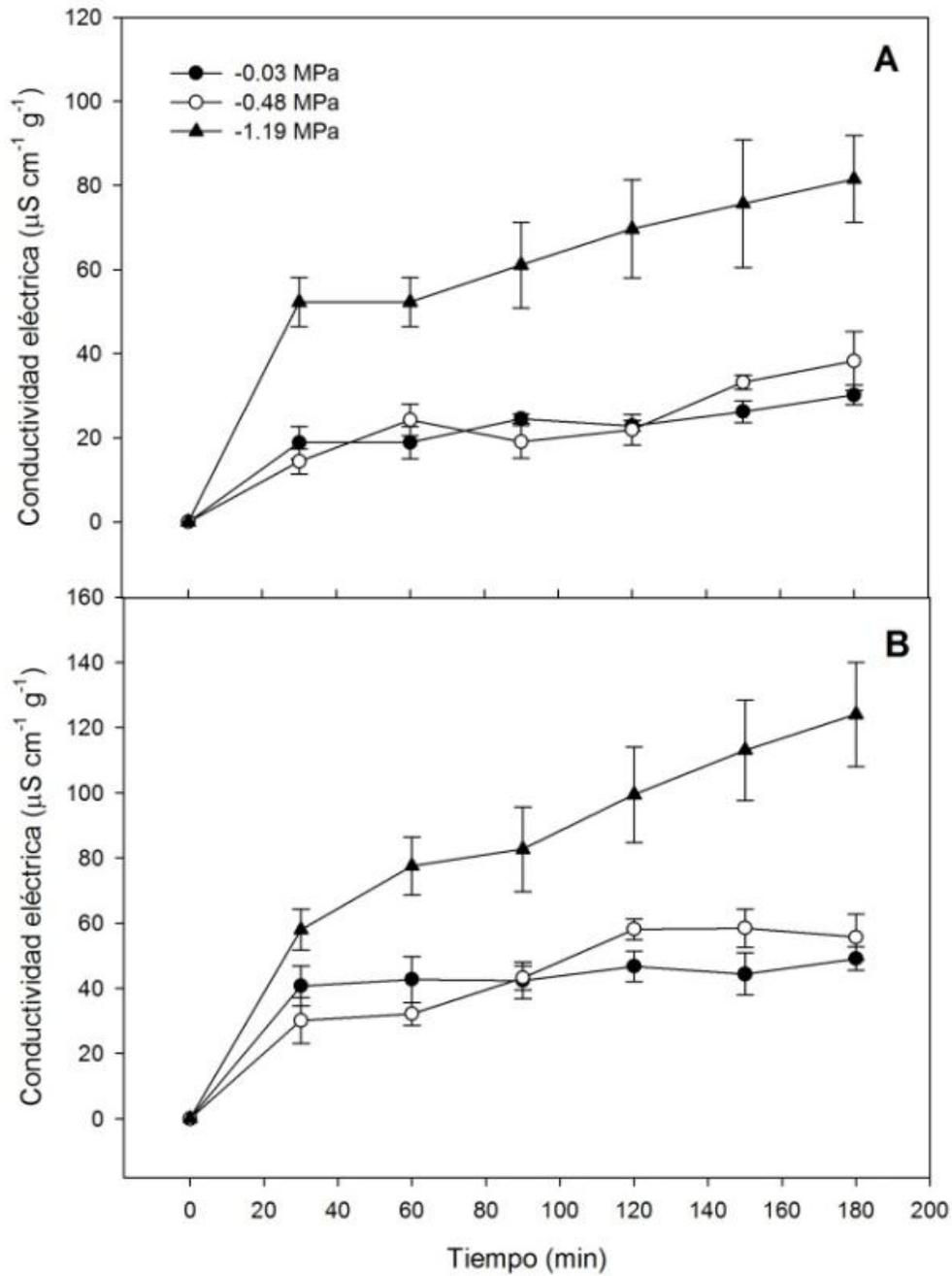
La respuesta de ambas especies al déficit de humedad y el hecho de que el estrés hídrico puede dañar las membranas celulares (Bajji *et al.*, 2001; Bryant *et al.*, 2001) nos llevó a investigar el efecto del déficit de humedad en la funcionalidad de estas estructuras celulares (Bajji *et al.*, 2001). La Figura III.3 ilustra la liberación de electrolitos por las raíces de *Agave* en los distintos  $\Psi_w$  con un marcado incremento en el  $\Psi_w$  de -1.19 MPa en

ambas especies. Debido a la germinación insuficiente y crecimiento limitado de la raíz en el  $\Psi_w$  de -2.04 MPa en ambas especies, la biomasa para realizar el ensayo de esos tratamientos fue insuficiente, por lo que no se presentan sus resultados. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en la liberación de electrolitos (EL) sólo en el  $\Psi_w$  de -1.19 MPa en ambas especies (Cuadro III.5).

**Cuadro III.5.** Biomasa seca y contenido relativo de agua (CRA) de las plántulas y liberación de electrolitos (EL) por la raíz en dos especies de *Agave* en cuatro potenciales de agua.

<b>Especie</b>	<b><math>\Psi_w</math> (MPa)</b>	<b>Biomasa seca (mg)</b>	<b>CRA (%)</b>	<b>EL (%)</b>
<i>A. lechuguilla</i>	-0.03	3.80 ± 0.16 c	86.51 ± 2.97 a	14.89 ± 2.05 b
	-0.48	3.59 ± 0.19 c	78.32 ± 2.91 ab	20.38 ± 2.27 b
	-1.19	2.97 ± 0.16 c	73.43 ± 3.42 ab	27.38 ± 1.19 a
	-2.04	2.66 ± 0.24 c	63.50 ± 11.87 b	-
<i>A. salmiana</i>	-0.03	7.98 ± 0.34 a	85.65 ± 1.56 a	12.98 ± 6.02 b
	-0.48	7.89 ± 0.29 a	70.84 ± 2.43 b	20.04 ± 4.34 b
	-1.19	7.46 ± 0.46 a	78.53 ± 2.74 ab	38.18 ± 6.38 a
	-2.04	5.75 ± 0.40 b	74.25 ± 5.27 ab	-

Los valores representan las medias ± el E.E. ( $n = 12$ ). Las letras indican diferencias estadísticamente significativas dentro de la misma columna con  $P < 0.05$ .



**Figura III.3.** Liberación de electrolitos en el tiempo por las raíces de *A. lechuguilla* (A) y *A. salmiana* (B) en tres distintos  $\Psi_w$ . Se muestra el promedio  $\pm$  E.S. ( $n=4$ ).

### III.6. Discusión

Las diferencias en las características físicas (tamaño, peso, humedad), fisiológicas (viabilidad y vigor), sanitarias (hongos) de las semillas y en la respuesta de la germinación a la disponibilidad de agua resultan en patrones distintos en la emergencia y sobrevivencia de las plántulas y por ende en la adaptación a nichos específicos en los ambientes áridos y semi-áridos. La germinación de la semilla inicia con la imbibición de agua y es afectada por la disponibilidad de la misma (Bradford, 1990). En el presente experimento los  $\Psi_w$  muy negativos disminuyeron la imbibición de agua por las semillas de ambas especies (Cuadro III.2). La imbibición es generalmente un proceso trifásico, con una toma inicial rápida de agua, seguida por una fase estacionaria y finalmente el aumento del contenido de agua, el que coincide con el crecimiento de la raíz (Bradford, 1990). En términos de la regulación de la germinación, se ha observado que la longitud de la segunda fase es extendida por el déficit hídrico (Bradford, 1990), ya que el daño imbibicional es resultado de una inhabilidad de las membranas celulares para reorganizarse a la misma velocidad de hidratación que el resto de las estructuras seminales (Bewley y Black, 1994). Además de la ampliación de la segunda fase, hubo diferencias en el porcentaje de imbibición entre las especies estudiadas (Cuadro III.1). En contraste, la imbibición en el  $\Psi_w$  mayor (capacidad de campo) fue significativamente igual entre las dos especies (Cuadro III.2), lo cual puede ser efecto de la composición química y permeabilidad de la cubierta de la semilla (Peña-Valdivia *et al.*, 2002).

La limitación en el contenido de agua del medio y la subsecuente modificación de la imbibición de agua por la semilla, tuvieron un efecto en la germinación de las semillas

(Cuadro III.2). La germinación de las semillas es una fase crítica en el ciclo de vida en la mayoría de las especies vegetales, inclusive de las especies xerófilas y suculentas (Nobel, 1984). En *Agave* el establecimiento de las plántulas representan las fases más vulnerables del ciclo de vida (Arizaga y Ezcurra, 2002). Así, las condiciones ambientales restrictivas ejercen efectos reguladores en la dinámica de germinación de las semillas y establecimiento de las plántulas, por lo que son calificadas como la fuerza motriz de la dinámica poblacional (Valverde *et al.*, 2004). En las condiciones de este estudio, se observó que las especies de *Agave* investigadas requirieron  $\Psi_w$  altos ( $>-0.5$  MPa) para alcanzar la mayor germinación, en concordancia con lo que ha sido reportado por De la Barrera y Nobel (2003) para otras especies suculentas. No obstante, la germinación final de las especies de *Agave* evaluadas en los  $\Psi_w$  menores a  $-0.5$  MPa contrastó con la de otras especies como *Pisum sativum* L. (Okçu *et al.*, 2005) y *Triticosecale* Witm., cv. Presto (Yağmur y Kaydan, 2008). *A. lechuguilla* y *A. salmiana* presentaron una germinación final de 66 y 46% a  $-1.19$  MPa, mientras que se reporta que *P. sativum* cv. Bolero y Utrillo a  $-0.8$  MPa solo germinaron el 8 y 5% respectivamente en PEG, y en triticales a  $-1.44$  MPa con PEG no se registra germinación, mientras que *A. salmiana* y *A. lechuguilla* presentaron el 14 y 5% de germinación respectivamente a un  $\Psi_w$  de  $-2.04$  MPa. Una de las alteraciones relacionadas al estrés imbibicional, en leguminosas y cereales es la reducción en la tasa de germinación (Vertucci, 1989), en el presente estudio el efecto de los distintos  $\Psi_w$  usados en la imbibición de las semillas de *Agave* contribuyó a la baja germinación. Esto concuerda con las restricciones ambientales reportadas por Jordan y Nobel (1979) quienes encontraron una correlación positiva fuerte entre años lluviosos inusuales y el establecimiento de plántulas de *A. deserti* provenientes de semilla. Por esto, la limitación en el contenido de humedad

del suelo en las regiones donde crecen ambas especies puede contribuir a que la germinación y sobrevivencia de las plántulas provenientes de semilla sea un evento muy raro en campo y que esté asociada a años inusualmente húmedos como en otras especies de *Agave* (Jordan y Nobel, 1979). El porcentaje de germinación fue significativamente mayor en *A. lechuguilla* (95%) respecto a *A. salmiana* (63%). Peña-Valdivia *et al.* (2006) reporta que la germinación de semillas intactas de *A. salmiana*, recolectadas en cuatro regiones de San Luis Potosí, México varió entre 44 y 95% y que dichas diferencias se debieron al tiempo de recolección de las semillas, temperatura y tiempo de almacenamiento. Alternativamente, de manera común se considera que las semillas negras son equivalentes a semillas fértiles, sin embargo Escobar-Guzmán y colaboradores (2008) señalaron la presencia de semillas negras pero sin embrión de *A. tequilana* y *A. americana*, por lo que no germinan y alteran la descripción del proceso. Es posible que uno o ambos factores hayan afectado los resultados de *A. salmiana*, por lo que con ninguno de los  $\Psi_w$  se alcanzó una germinación mayor a 63% (Figura III.1).

La identificación del mejor ajuste de la germinación puede proveer información de los factores que controlan la tasa y el nivel de germinación bajo varias condiciones. Los tratamientos con el parámetro  $m$  y  $T_{50}$  menores fueron aquellos con el mayor  $\Psi_w$ , ya que además fueron los primeros en iniciar la germinación y alcanzar el 50% de germinación y germinación máxima en los primeros 4 d en ambas especies. Este comportamiento en las fases iniciales de ambas especies concuerda cercanamente con su distribución actual espacial y temporal en el campo. Primero, la germinación y emergencia de ambas especies está restringida a las temporadas húmedas como en otras especies de *Agave* (Jordan y

Nobel, 1979) y cactus (De la Barrera y Nobel, 2003). Segundo, los resultados concuerdan con lo postulado por Freeman (1973) quien argumenta que la falta de requerimientos especializados para la germinación (temperatura, humedad y pH) puede ser una barrera para el establecimiento exitoso de las plántulas en condiciones áridas. Así, la germinación indiscriminada cuando las condiciones de humedad son favorables por un periodo corto de tiempo puede llevar a la muerte a las plántulas antes de que se establezcan. Por otra parte, las características de germinación de *A. lechuguilla* y de *A. salmiana* parecen reflejar el potencial de cada una de ellas para responder a las condiciones ambientales típicas de su distribución. *A. lechuguilla* abarca 1300 km de Texas y Nuevo México, y hacia el sur hasta Guanajuato, Hidalgo y Querétaro, se presenta en 100 000 km<sup>2</sup> de suelos rocosos derivados de piedra caliza que son inadecuados para el cultivo y en regiones donde la lluvia anual es de 200 a 800 mm (Gentry, 1982). Se localiza desde el norte de San Luis Potosí a través de la Altiplanicie Central Mexicana; en los estados de Coahuila, Chihuahua, D.F., Nuevo León, Durango, Hidalgo, México, Querétaro, Tamaulipas y Zacatecas (García-Mendoza y Galván, 1995; García-Mendoza, 2002). Por su parte *A. salmiana* se distribuye en el centro de México y está adaptada a hábitats como laderas, colinas rocosas y pendientes con suelos de textura media (Salvador *et al.*, 2005). *A. lechuguilla* está concentrada en los ambientes extremos de los desiertos del norte, mientras que *A. salmiana* se encuentra en ambientes semi-áridos. No obstante, ambas especies parecen poseer un efectivo sistema de reproducción vegetativa (hijuelos y rizomas) que les permiten tolerar la pérdida de reproducción sexual, similar a lo reportado para *A. macroacantha* (Arizaga y Ezcurra, 2002). En adición, las respuestas en la germinación de ambas especies permiten el establecimiento de las plántulas, aunque con una baja probabilidad de éxito, en pequeñas

ventanas de oportunidad en el tiempo y espacio en las cuales las condiciones ambientales son idóneas en cantidad y duración (Freeman, 1973).

Una vez que la radícula ha atravesado cualquier tejido que la rodea y está creciendo, la germinación se ha completado y el crecimiento de la plántula comienza. El uso de modelos de crecimiento para describir la dinámica de elongación de la raíz puede proveer información acerca de los factores que controlan la tasa y la medida en que el crecimiento de la raíz es modificado. El crecimiento de la raíz de un grupo de plántulas puede ser analizado estadísticamente mediante la cuantificación de la variación en los valores específicos de los parámetros entre los grupos analizados (Motulsky y Christopoulos, 2003). Los resultados mostraron que el crecimiento de la raíz disminuyó en ambas especies en los  $\Psi_w$  más negativos (Fig. III.2, Tabla III.4). Estos resultados ponen en evidencia la importancia de la disponibilidad de agua para el desarrollo de la plántula en los estados posteriores a la germinación. Sin embargo, una reducción moderada en el contenido de humedad del medio en ambas especies (-0.48 MPa), no afectó significativamente el crecimiento final de la raíz, pues se alcanzaron longitudes similares a los tratamientos testigo (-0.03 MPa). El crecimiento de la raíz de plántulas de *A. salmiana* en  $\Psi_w$  menores a -0.03 MPa ha sido atribuido parcialmente a la acumulación de prolina en la raíz (Peña-Valdivia y Sánchez-Urdaneta, 2009). Sin embargo, mientras que para *A. salmiana* la tasa de elongación fue similar entre los tratamientos con -0.03 y -0.48 MPa, en *A. lechuguilla* el tratamiento con -0.48 MPa que alcanzó una longitud final similar al testigo, lo hizo con una tasa de elongación menor (Fig. III.2, Tabla III.3). Esto puede interpretarse como una reacción adaptativa de esta especie para enfrentar el estrés hídrico durante el crecimiento

inicial. Parcialmente, las diferencias en el crecimiento de la raíz entre las especies pueden estar relacionadas con el tamaño de la semilla, pues *A. salmiana* presentó semillas más pesadas que *A. lechuguilla*. Las plántulas que se desarrollan de semillas grandes generalmente cuentan con más reservas cotiledonales (Fenner y Kitajima, 1999), por lo que son relativamente más independientes de los recursos externos que las semillas pequeñas. Los resultados del presente estudio y los reportados por Peña-Valdivia y Sánchez-Urdaneta, (2009) aportan evidencia de que el crecimiento longitudinal de la raíz de *A. lechuguilla* y *A. salmiana* se ve poco afectado en condiciones de baja disponibilidad de agua, hasta con -0.65 MPa. Es evidente que la plasticidad de la raíz está bajo control genético (Sharp *et al.*, 2004) y las distintas especies no muestran la misma habilidad de crecimiento de la raíz. Sin embargo, la plasticidad está ligada a las especies y a los mecanismos fundamentales, los que aún permanecen sin esclarecerse.

La acumulación de materia seca final incluyendo la reserva cotiledonal fue significativamente diferente entre las especies (Tabla III.1 y III.5), *A. salmiana* presentó un peso de semilla 1.6 veces mayor que *A. lechuguilla*. Dicha respuesta puede ser explicada por el tamaño de la semilla y las reservas del cotiledón dado que éstas afectan fuertemente el crecimiento de la plántula (Leishman y Westoby, 1994). El CRA fue utilizado como una medida del estado hídrico del tejido vegetal; el decremento en el  $\Psi_w$  inducido con PEG8000 tendió a disminuir el contenido de humedad de las plántulas en ambas especies (Cuadro III.5). El metabolismo de las plántulas es también dependiente del estado hídrico del tejido (Teulat *et al.*, 1997), así este factor está implicado en el crecimiento diferencial de las plántulas de *Agave* en distintas condiciones de humedad. Se conoce que el estrés

hídrico puede causar pérdida de la estabilidad e integridad en las membranas celulares de las plantas (Bajji *et al.*, 2001). La disminución en el  $\Psi_w$  causó un aumento en la liberación de electrolitos a -1.19 MPa (Cuadro III.5), lo que indica una pérdida de la estabilidad de la membrana celular en respuesta al estrés hídrico (Bryant *et al.*, 2001). Estos resultados concuerdan con los reportados por Sánchez-Urdaneta *et al.* (2004), quienes encontraron un aumento en el índice de daño de las membranas de las raíces de *A. salmiana* cuando las plántulas permanecieron en  $\Psi_w$  entre -0.65 y -2.35 MPa. Así, en ambas especies de *Agave*, el estrés hídrico parece modificar la estabilidad de las membranas celulares de las raíces a un  $\Psi_w$  de -1.19 MPa.

### III.7. Conclusiones

En suma, la disminución en la germinación y crecimiento inicial de la raíz en ambas especies es un rasgo adaptativo común para hacer frente a la baja disponibilidad de agua en las etapas iniciales, lo que sugiere que el éxito en términos de su establecimiento en campo depende tanto de la cantidad de agua disponible como de la frecuencia de la precipitación, por lo que se encuentran confinadas a germinar en periodos de tiempo y espacio en los cuales hay agua disponible en cantidad y duración. No obstante, la germinación fue menos sensible a la disminución del potencial de agua en ambas especies de *Agave* en comparación con otras plantas cultivadas, lo que indica que las semillas pueden presentar rasgos especiales que les permiten favorecer el crecimiento celular en potenciales de agua bajos. Además, el aumento en el tiempo para alcanzar la germinación máxima y el 50% de la germinación en condiciones de humedad restringida posibilita el reclutamiento de una parte de las plántulas formadas al aumentar las condiciones de humedad. Ambas especies

mostraron una disminución en las tasas de elongación y crecimiento final de la raíz con la reducción en la disponibilidad de agua, lo que da evidencia de cambios en la morfología de la raíz. Parcialmente, las diferencias en el crecimiento de la raíz entre las especies pueden estar relacionadas con el tamaño de la semilla, pues *A. salmiana* presentó semillas más pesadas que *A. lechuguilla* y la modificación de la estabilidad e integridad de las membranas celulares de la raíz en respuesta a la disponibilidad de agua. Sin embargo, futuras investigaciones son necesarias para ligar la plasticidad de la raíz con los mecanismos fundamentales específicos de cada especie. Finalmente, los resultados presentados aquí claramente indican que la disponibilidad de agua debe tomarse en cuenta si se pretende incrementar la variabilidad genética de ambas especies de *Agave* al permitir el establecimiento de algunas plantas provenientes de semilla y que éstas alcancen la reproducción sexual en campo.

## **IV. Cambios en la fotoquímica del FSII, intercambio de gases y crecimiento del chile pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) por estrés hídrico y recuperación**

### **IV.1. Resumen**

La limitación del crecimiento en las plantas impuesto por la baja disponibilidad de agua se debe principalmente a la reducción en el balance de carbono, el cual es en gran medida dependiente de la fotosíntesis. El objetivo del presente estudio fue examinar cómo la fotosíntesis es regulada durante el estrés hídrico y en la recuperación en un ambiente controlado. Se hicieron mediciones de las relaciones hídricas del suelo y hoja, intercambio de gases, aumento polifásico de la fluorescencia OJIP y del crecimiento en plantas de chile pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) sometidas a suspensión de riego y posteriormente al riego de recuperación. Los resultados mostraron que el potencial de agua del suelo ( $\Psi_s$ ) y hoja ( $\Psi_L$ ) disminuyó de -0.16 y -0.53 a -1.1 y -1.7 MPa respectivamente durante el estrés hídrico y se recuperaron después del riego. Durante el estrés hídrico la conductancia estomática ( $g_s$ ) disminuyó a 114 y hasta 13  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en las plantas con estrés hídrico moderado y severo respectivamente, de manera similar la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) y la transpiración ( $Tr$ ) disminuyeron durante el estrés hídrico; después de dos días de riego de recuperación las variables anteriores se recuperaron con valores similares al testigo. La tasa de carboxilación máxima de la Rubisco ( $V_{\text{cmax}}$ ) y la capacidad de regeneración de la ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP) mediada por la tasa de transporte de electrones máxima ( $J_{\text{max}}$ ) disminuyeron durante el estrés hídrico moderado y severo. En contraste, el estrés hídrico y el riego de recuperación no tuvieron efecto en la producción cuántica máxima de la fotoquímica primaria  $\phi_{\text{Po}} = F_v/F_m$ . Sin embargo, el estrés hídrico ocasionó una inactivación de los centros de reacción del fotosistema II (FSII) y una disminución en el transporte de electrones más allá de la plastoquinona reducida ( $Q_A^-$ ), así como un decremento en el tamaño del almacén y reducción de los aceptores de electrones en el FSI. El aumento de la fluorescencia durante los primeros 300  $\mu\text{s}$  (banda L) indicó un rezago en la pérdida de la conectividad energética entre las unidades del FSII en los primeros días de la recuperación mientras que el aumento durante los primeros 2 ms (banda K) ofreció información del desarrollo de una limitación en el lado donador del FSII durante el estrés

hídrico. Las plantas se recuperaron completamente después de 10 d de riego, evidenciado por lo valores similares de los parámetros de la prueba JIP con las plantas testigo. Los resultados demostraron que el movimiento de los acarreadores de electrones que llevan a la reducción de los aceptores de electrones finales fue disminuido por el estrés hídrico y junto con la regulación estomática y la bioquímica fotosintética impone una limitación importante en la asimilación de carbono. Finalmente, la recuperación de la fotosíntesis después del riego fue limitada principalmente por el cierre estomático y la restauración gradual de la cadena del transporte de electrones fotosintético.

#### IV.2. Abstract

The limitation of plant growth imposed by low water availability is mainly due to reductions of plant carbon balance, which is largely dependent on photosynthesis. The aim of the present study was to examine how photosynthesis is regulated during water stress and recovery in growth chambers. Measurements of soil and leaf water relations, gas exchange, polyphasic OJIP fluorescence rise and growth were made in leaves of C<sub>3</sub> bell pepper (*Capsicum annuum* L.) plants subjected to sustain water-withholding and re-watering. Soil ( $\Psi_s$ ) and leaf water potential ( $\Psi_L$ ) decreased from -0.16 and -0.53 to -1.1 and -1.7 MPa respectively during water stress and recovered after re-watering. During water stress stomatal conductance ( $g_s$ ) declined to 114 and up to 13 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> in moderately and severely water-stressed plants, respectively, similarly net CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A$ ) and transpiration ( $Tr$ ) decreased under water stress and all of them were almost recovered two days after re-watering. Maximum carboxylation rate of Rubisco ( $V_{cmax}$ ) and ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) regeneration capacity mediated by maximum electron transport rate ( $J_{max}$ ) decreased from moderate to severe water stress. By contrast, water stress and re-watering had no effect on the maximum quantum yield of primary photochemistry  $\phi_{Po} = F_v/F_m$ . However, water stress of plants resulted in an inactivation of photosystem II (PSII) reaction centers and a decline in electron transport beyond the reduced plastoquinone ( $Q_A^-$ ), and a decrease in both the pool size and the reduction of end electron acceptors at the PSI. The fluorescence rise during the first 300  $\mu$ s (L-band) showed a delayed lost on the energetic connectivity between PSII units over the first days of recovery whereas changes

in the rise during the first 2 ms (K-band) offered information on developing limitations on the donor side of PSII during water stress. Water stressed plants were fully recovered after 10 d of re-watering, as evidenced by the similar levels of the JIP-test parameters to the control. The results demonstrated that the movement of electron carriers leading to the reduction of end electron acceptors was reduced by water stress and together with stomatal regulation and photosynthetic metabolism imposed an important limitation on carbon assimilation. Finally, photosynthesis recovery after re-watering was mostly limited by both stomatal closure and slow restoration of the photosynthetic electron transport chain.

### **IV.3. Introducción**

La mayoría de los escenarios de cambio climático sugieren un aumento de la aridez en varias áreas del planeta (IPPC, 2007). La agricultura es uno de los principales usuarios del recurso agua en el mundo, por lo que el aumento de zonas semi-áridas y áridas en conjunción con el incremento de la población harán que el agua sea un recurso cada vez más escaso y sobreexplotado, con un efecto directo en el crecimiento, sobrevivencia y rendimiento potencial de los cultivos (Chaves *et al.*, 2009). Por lo tanto, entender la respuesta de las plantas a condiciones de déficit de agua es un factor clave para mejorar las prácticas de manejo y producción agrícola y para predecir el futuro de la vegetación natural ante un escenario de cambio climático con condiciones de sequía (Chaves *et al.*, 2003).

Las plantas responden al estrés por sequía mediante mecanismos adaptativos que permiten a los sistemas fotoquímicos y bioquímicos confrontar el estrés (Chaves *et al.*, 2003, 2009). Los efectos inhibitorios de la sequía en la fotosíntesis pueden ser asociados a una disponibilidad baja de CO<sub>2</sub>, causada por las limitaciones de su difusión a través del estoma y del mesófilo de la hoja (Flexas *et al.*, 2004), a las alteraciones en el metabolismo

de la asimilación de carbono (Lawlor, 2002; Lawlor y Cornic, 2002), o al conjunto de todas ellas. La suma de las limitaciones tanto estomáticas como del mesófilo representan las limitantes difusivas de la hoja (Hu *et al.*, 2010). La inhibición de las actividades metabólicas se presentan en periodos prolongados de sequía (Parry *et al.*, 2002). Las limitaciones bioquímicas o metabólicas (no estomáticas) de la fotosíntesis en condiciones de estrés por sequía han sido asociadas a la eficiencia baja de carboxilación (*CE*), por la disminución en la velocidad máxima de carboxilación ( $V_{cmax}$ ) de la Rubisco (ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa-oxigenasa), disminución de la capacidad de regeneración de la ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP) mediada a través de la tasa máxima del transporte de electrones ( $J_{max}$ ), y una disminución de la actividad del fotosistema (FS) II (Peña-Rojas *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2010).

El modelo de fotosíntesis de Farquhar *et al.* (1980) es un modelo mecanístico y bioquímico que provee un método práctico utilizado ampliamente para describir las tasas de asimilación de CO<sub>2</sub> en estado estable (condiciones fijas de luz, CO<sub>2</sub>, temperatura y humedad) de las hojas (Farquhar *et al.*, 2001) y cuantificar las limitaciones bioquímicas principales de la fotosíntesis C<sub>3</sub> en estado estable *in vivo* de la hoja fotosintética mediante el cambio en la asimilación de CO<sub>2</sub> por unidad de área foliar (*A*) en respuesta a distintas concentraciones de CO<sub>2</sub> intercelular (*C<sub>i</sub>*) medido con un sistema de intercambio de gases (Long y Bernacchi, 2003). Una de las premisas básicas del modelo de Farquhar *et al.*, (1980), modificado por Sharkey *et al.* (1985), es que la fotosíntesis en estado-estable es limitada por: 1) la  $V_{cmax}$ ; 2) la tasa de regeneración de RuBP, la que se supone está limitada por  $J_{max}$ ; y 3) el consumo de las triosas fosfato (*TPU*). Una vez conocidos estos tres

factores, la tasa fotosintética foliar puede ser calculada dado un flujo de luz, concentraciones de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y temperatura (Chen *et al.*, 2008).

El FSII es fundamental para la fotosíntesis de las plantas superiores con y sin estrés por factores ambientales (Baker, 1991) y se ha demostrado que el estrés por falta de agua genera pérdida de las proteínas D1 y D2 del FSII (He *et al.*, 1995). Una forma de estudiar los efectos del estrés por deshidratación en la fotoquímica de la fotosíntesis es la medición de la fluorescencia de clorofila (Chl) *a* (Maxwell y Johnson, 2000). La fluorescencia de la Chl *a* emitida por las plantas superiores, algas, líquenes y bacterias fotosintéticas después de su iluminación permite obtener información de la estructura y funcionamiento del aparato fotosintético (Strasser *et al.*, 2010). El descubrimiento de la fluorescencia variable por Kautsky mostró que ésta consiste de un aumento en la fluorescencia hasta un pico P ( $F_P$ ) y un subsecuente decremento hasta un estado estable ( $F_S$ ). En las plantas superiores y las algas la fluorescencia emitida a temperatura ambiente proviene predominantemente de las clorofilas antena del FSII. Los extremos reales del aumento rápido son  $F_0$  en el origen O, cuando todos los centros de reacción (RC) del FSII están abiertos y  $F_M$  o máxima  $F_P$ , emitida cuando todos los RCs están cerrados. El aumento de  $F_0$  a  $F_M$  es multifásico, con pasos intermedios  $I_1$  e  $I_2$  (Schreiber *et al.*, 1986). La disponibilidad de un fluorímetro de luz directa (Plant Efficiency Analyzer, PEA, Hansatech Instruments), con un tiempo alto de resolución de 10  $\mu$ s y el primer punto confiable (tomado como  $F_0$ ) a 50  $\mu$ s, permite registrar en una escala logarítmica de tiempo, el aumento completo de la fluorescencia de O a P, con distintos eventos intermedios detectados con precisión, J (a 2 ms) e I (en menos de 30 ms); la traza  $F_0 - F_J - F_I - F_P$  ( $F_M$ ) es entonces llamada aumento rápido de la

fluorescencia *OJIP* (Strasser *et al.*, 1995). Con base en la teoría del flujo de la energía en biomembranas, se ha desarrollado un análisis del aumento rápido de la fluorescencia *OJIP*, conocida como prueba *JIP* (Strasser *et al.*, 2004), que liga los pasos y fases con los estados redox del FSII y concomitantemente con las eficiencias en la transferencia de electrones en la cadena interfotosistemas y hacia los aceptores de electrones finales del lado aceptor del FSI (Tsimilli-Michael y Strasser, 2008).

En México se siembran aproximadamente 5800 hectáreas de chile pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.), con rendimientos en campo que pueden llegar hasta 50 t ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (Reséndiz-Melgar *et al.*, 2010). La exportación hacia los Estados Unidos de Norteamérica y Canadá aumentó a 240000 toneladas en 2006 (Castellanos y Borbón, 2009), lo que lo hace un cultivo rentable. Además, el chile pimiento morrón añade sabor y aroma, tiene valor medicinal y es una excelente fuente de vitamina A y C con contenido calórico bajo (Villalón, 1981; Andrews, 1995). El chile pimiento morrón es considerado uno de los cultivos más sensitivos al déficit de agua en el suelo (González-Dugo *et al.*, 2007). Especialmente, el estrés por sequía durante las etapas iniciales de crecimiento puede causar reducción del tamaño de la planta, del número de brotes y frutos (Rylski y Spigelman, 1982). Así, el conocimiento presente acerca de las limitaciones fisiológicas de la fotosíntesis durante la aclimatación y desarrollo del estrés hídrico y de la recuperación después del riego es escaso pero crucial para mejorar el entendimiento de la respuesta de las plantas a la sequía y para el desarrollo de horarios de riego en la agricultura. El objetivo del presente estudio fue cuantificar la respuesta de varios factores estomáticos, bioquímicos y fotoquímicos involucrados en la regulación de la fotosíntesis en respuesta al estrés hídrico y su recuperación posterior al riego en plantas de *C. annuum* y así proveer ideas sobre los

cambios metabólicos fundamentales en las hojas con estrés y durante la recuperación. Las hipótesis fueron: (i) cuando la presión de excitación excede la capacidad de asimilación de CO<sub>2</sub> durante el estrés hídrico se inducen modificaciones en diferentes sitios de la cadena de transporte de electrones fotosintético; (ii) aunque las tasas de asimilación de CO<sub>2</sub> se han restablecido después del riego existen modificaciones residuales en el transporte de electrones fotosintético y (iii) la fotosíntesis durante el riego de recuperación está limitada principalmente por aspectos difusivos más que fotoquímicos y bioquímicos.

#### **IV.4. Materiales y Métodos**

##### *IV.4.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento*

Semillas de *C. annuum* del cv. Cannon (Zeraim Gedera LTD., Israel) fueron germinadas en charolas germinadoras con turba como sustrato. Las plántulas con 27 d de edad se trasplantaron en contenedores de 250 mL con suelo y se mantuvieron en una cámara de crecimiento con ambiente semi-controlado (Thermo Scientific, USA) con fotoperiodo de 12 h y 382  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de radiación fotosintéticamente activa (PAR) a nivel de las plantas. Se utilizó una solución nutritiva preparada con Ultrasol Multipropósito 18-18-18 con elementos menores (Sociedad Química y Minera de Chile S.A., Chile) aplicada con el agua de riego.

##### *IV.4.2. Tratamientos, diseño experimental y análisis estadístico*

Veintitrés días después del trasplante (DDT) se formaron dos grupos de plantas elegidas al azar. Un grupo, el testigo, se mantuvo con un contenido de agua volumétrico

( $\theta_v$ ) del 45 al 30% y el otro se mantuvo sin regar hasta alcanzar un  $\theta_v$  del 20% (estrés medio) y del 5% (estrés severo), posteriormente se regaron a capacidad de campo y se evaluó su recuperación. El estudio se realizó con un diseño completamente al azar y los datos fueron sujetos a análisis de varianza con mediciones repetidas con el procedimiento PROC MIXED de SAS (SAS 9.1, SAS Institute Inc., NC) y prueba de separación de medias mediante la prueba de Tukey con  $\alpha = 0.05$ . Se realizaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas en los datos previo al análisis de varianza mediante la prueba de Anderson-Darling y Levene respectivamente, si no se cumplían los supuestos se utilizó la transformación de Johnson.

#### *IV.4.3. Evaluación del estado hídrico del suelo y la hoja*

Durante el periodo experimental el contenido de agua volumétrico del suelo ( $\theta_v$ ) se midió diariamente en los primeros 8 cm de sustrato con un reflectómetro de tiempo HH2 moisture Meter adjunto a un sensor WET (Delta-T Devices). Previamente, se determinaron en el laboratorio distintos niveles del  $\theta_v$  del rango de capacidad de campo a 5% de humedad mediante la adición de volúmenes conocidos de agua a volúmenes conocidos de sustrato seco y en cada uno se midió la constante dieléctrica aparente con el reflectómetro de tiempo para obtener la curva de calibración específica para el suelo utilizado (Anexo A2). Al mismo tiempo, se midió el potencial de agua ( $\Psi_w$ ) en dichos niveles de humedad con cámaras psicrométricas tipo C-52 (Wescor Inc., Utah, USA) y se relacionó con la reflectometría de tiempo mediante el ajuste de una curva hiperbólica inversa (Anexo A3), de esta forma se obtuvo un estimado indirecto del  $\Psi_w$  del suelo ( $\Psi_s$ ) en cualquier momento. Por otra parte, discos foliares de 0.5 cm de diámetro fueron colocados en

cámaras psicrométricas tipo C-52 (Wescor Inc., Utah, USA) y equilibradas por 2 h a temperatura constante, con cinco repeticiones por tratamiento, en las cuales se midió el potencial de agua de la hoja ( $\Psi_L$ ) mediante la técnica de punto de rocío con el HR 33 Dewpoint Microvoltmeter (Wescor Inc., Utah, USA).

#### *IV.4.4. Intercambio de gases y curvas $A/C_i$*

Se realizaron curvas de asimilación de  $\text{CO}_2$  en respuesta a la concentración interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) en la hoja de cinco plántulas por tratamiento mediante el uso de un sistema abierto y portátil de análisis de gases en el espectro infrarrojo (Ciras-1, PP Systems, UK) adjunto a una cámara foliar estándar (PLC-B, PP Systems, UK) a una PAR de  $1050 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , temperatura de la hoja de  $27^\circ\text{C}$  y humedad relativa de 70%. Las curvas de respuesta  $A/C_i$  se generaron utilizando el protocolo descrito por Long y Bernacchi (2003). La cámara foliar fue inicialmente ajustada a una concentración de  $370 \mu\text{mol mol}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  durante cinco minutos para asegurar la activación de la Rubisco en estado estable. Después las curvas  $A-C_i$  fueron construidas registrando la respuesta de  $A$  con las distintas concentraciones ambientales de  $\text{CO}_2$  en la cámara ( $C_a$ ). Las mediciones se iniciaron a una  $C_a$  de  $370 \mu\text{mol mol}^{-1}$  y posteriormente el  $\text{CO}_2$  en la cámara se disminuyó a 300, 250, 200, 150, 100 y  $50 \mu\text{mol mol}^{-1}$ . Posteriormente se regresó a  $370 \mu\text{mol mol}^{-1}$  para asegurar que la asimilación original se recuperara y si era así entonces  $C_a$  se aumentó paso a paso a 450, 550, 650, 800, 1000 y  $1200 \mu\text{mol mol}^{-1}$ . Las curvas  $A/C_i$  fueron utilizadas para estimar la conductancia del mesófilo ( $g_m$ ), la velocidad de carboxilación máxima de la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco;  $V_{\text{cmax}}$ ), la tasa de transporte de electrones ( $J_{\text{max}}$ ) y la tasa de liberación de  $\text{CO}_2$  respiratorio ( $R_d$ ) mediante el programa desarrollado por

Sharkey *et al.* (2007) basado en un método de ajuste alternativo de las curvas  $A/C_i$  (Ethier y Livingston, 2004) que toma en cuenta la transferencia de la conductancia de  $\text{CO}_2$  a través de una versión de hipérbola no-rectangular del modelo de Farquhar *et al.* (1980). En el modelo, las reacciones bioquímicas de la fotosíntesis se consideran que son limitadas por las propiedades de la Rubisco, la regeneración del sustrato ribulosa bifosfato (RuBP) o por la limitación del uso de la triosa-fosfato. Cuando  $A$  es limitada por la Rubisco, la respuesta de  $A$  a la concentración de  $\text{CO}_2$  [ $\text{CO}_2$ ] puede ser descrita por la siguiente ecuación:

$$A = V_{cmax} \left[ \frac{C_c - \Gamma^*}{C_c + K_C(1 + O/K_O)} \right] - R_d$$

Donde  $V_{cmax}$  es la velocidad máxima de la Rubisco para la carboxilación,  $C_c$  es la presión parcial de  $\text{CO}_2$  en el sitio de la Rubisco,  $K_C$  es la constante de Michaelis de la Rubisco para el  $\text{CO}_2$ ,  $O$  es la presión parcial del oxígeno en el sitio de la Rubisco y  $K_O$  es la constante de inhibición de la Rubisco para el oxígeno. El símbolo  $\Gamma^*$  es la [ $\text{CO}_2$ ] a la cual la oxigenación se produce al doble de la tasa de carboxilación causando que la toma de  $\text{CO}_2$  fotosintético sea compensada por la liberación de  $\text{CO}_2$  fotorespiratorio.  $R_d$  es la liberación de  $\text{CO}_2$  respiratorio (respiración en el día) y se cree es principalmente respiración mitocondrial.

Cuando  $A$  es limitada por la regeneración de RuBP:

$$A = J \frac{C_c - \Gamma^*}{4C_c + 8\Gamma^*} - R_d$$

Donde  $J$  es la tasa del transporte de electrones. Esta ecuación asume cuatro electrones por carboxilación y ocho por oxigenación.

Cuando  $A$  es limitada por la TPU, simplemente:

$$A = 3TPU - R_d$$

Donde, TPU es la tasa de uso de las triosas fosfato pero puede ser cualquier salida de carbono del ciclo de Calvin incluyendo el uso directo de glicina o serina fotorespiratoria. En el programa utilizado para analizar las curvas  $A-C_i$ ,  $C_C$  es calculado con  $[C_i - (A/g_m)]$  y  $g_m$  así como los demás parámetros son estimados de los datos observados mediante ajuste no lineal y minimizando la suma de cuadrados de las desviaciones del modelo.

#### *IV.4.5. Aumento rápido de la fluorescencia de clorofila a*

Las mediciones de la fluorescencia de clorofilas *a* (Chl *a*) fueron realizadas en hojas maduras a temperatura ambiente con un fluorómetro portátil PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments Ltd., UK) de alta resolución (10  $\mu$ s). Se realizaron ocho mediciones por tratamiento. Las hojas fueron adaptadas a la oscuridad por 1.0 h con clips foliares antes de iniciar las mediciones. La medición consistió de un solo pulso de luz de 1.0 s ( $600 \text{ W m}^{-2}$ , una intensidad de excitación suficiente para asegurar el cierre de todos los centros de reacción del FSII) provisto por un arreglo de seis diodos emisores de luz (pico a 650 nm). La emisión de fluorescencia de la Chl *a* inducida por el pulso de luz fue medida y digitalizada entre los 10  $\mu$ s y 1.0 s por el instrumento.

#### *IV.4.6. Parámetros biofísicos del FSII derivados de las ecuaciones de la prueba JIP*

Se pueden derivar varios parámetros del aumento polifásico de la fluorescencia de Chl *a* OJIP que proveen información acerca de los flujos fotosintéticos. Se ha propuesto un modelo, la prueba JIP, para el análisis del aumento polifásico OJIP y se ha demostrado que

es una herramienta importante en el monitoreo de la integridad fotosintética de la planta. De la traza de fluorescencia medida durante el primer segundo de iluminación, se seleccionan seis puntos en el tiempo (0.05, 0.10, 0.30, 2.0, 30.0 ms y  $F_M$ ) que son utilizados para el cálculo de varias expresiones fenomenológicas y biofísicas que describen a la muestra fotosintética en un estado fisiológico dado (para una descripción detallada de las fórmulas utilizadas ver Anexo A1) y se calcularon los siguientes parámetros que se refieren al tiempo cero (inicio de la inducción de la fluorescencia): (a) los flujos de energía específica por centro de reacción (RC) para la absorción (ABS/RC), captura ( $TR_0/RC$ ), transporte de electrones ( $ET_0/RC$ ) y reducción de los aceptores finales en el lado aceptor del FSI ( $RE_0/RC$ ); (b) las proporciones de flujo o producciones, por ejemplo, la producción cuántica máxima de la fotoquímica primaria ( $\phi_{P_0} = 1 - (F_0/F_M) = F_V/F_M$ ).  $\phi_{P_0}$  corresponde a la eficiencia con la cual un fotón absorbido puede ser capturado por los centros de reacción del FSII ( $TR_0/ABS$ ). Este ha sido frecuentemente utilizado como una medida de la eficiencia máxima de la fotoquímica del FSII (Baker, 1991; Krause y Weis, 1991). La probabilidad de que un excitón capturado mueva un electrón hacia la cadena del transporte de electrones más allá de la  $Q_A^-$  ( $\psi_{E_0} = ET_0/TR_0$ ), la producción cuántica del transporte de electrones ( $\phi_{E_0} = ET_0/ABS$ ), la producción cuántica para la reducción de los aceptores finales del FSI por fotón absorbido ( $\phi_{R_0} = RE_0/ABS$ ) y la eficiencia con la cual un electrón puede moverse del intersistema de aceptores de electrones reducido hacia los aceptores de electrones finales del FSI ( $\delta_{R_0} = RE_0/ET_0$ ); (c) el índice de desempeño  $PI_{ABS}$  es uno de los parámetros de la fluorescencia de clorofila que provee información útil y cuantitativa acerca del estado de las plantas y su vitalidad. La expresión para el índice de desempeño es

derivada en analogía a la ecuación de Nernst que es utilizada para determinar el potencial redox de un sistema:

$$PI_{ABS} = \left[ \frac{\gamma_o}{1 - \gamma_o} \right] \left[ \frac{\varphi_{Po}}{1 - \varphi_{Po}} \right] \left[ \frac{\psi_o}{1 - \psi_o} \right]$$

El símbolo  $\gamma$  representa la tasa de clorofilas de los centros de reacción y la clorofila total del FSII. La expresión  $\gamma_o/(1 - \gamma_o)$  es proporcional a los parámetros estimados por la prueba JIP igual a la tasa de centros de reacción y la absorbancia (RC/ABS). Por lo tanto

$$\frac{\gamma_o}{(1 - \gamma_o)} \sim \frac{Chl_{RC}}{Chl_{antena}}$$

$$\frac{RC}{ABS} = \left[ \frac{(F_{2ms} - F_{50\mu s})}{4(F_{300\mu s} - F_{50\mu s})} \right] \frac{F_V}{F_M}$$

$\Psi_o = (1 - V_J)$  es la fracción de electrones transportados más allá de de la  $Q_A^-$  por excitón capturado por los centros de reacción (RC) del FSII. Este es la probabilidad de que la energía de un excitón capturado sea utilizada en el transporte de electrones más allá de la  $Q_A$ . (d) El  $PI_{total}$  es el producto del índice de desempeño y la probabilidad de que un electrón pueda moverse de los aceptores de electrones interfotosistemas reducidos hacia los aceptores finales de electrones del FSI y se define como sigue (Tsimilli-Michael y Strasser, 2008):  $PI_{total} = PI_{ABS} \cdot \delta_{Ro}/(1 - \delta_{Ro})$ . (e) La fase IP  $(=F_t - F_0)/(F_1 - F_0) - 1 = (F_t - F_1)/(F_1 - F_0)$ , donde  $F_t$  es la intensidad de fluorescencia al tiempo  $t$  posterior al inicio de la iluminación actínica. Se ha sugerido que la amplitud de la fase IP es considerada como una medida de la cantidad de los aceptores finales reducidos en el lado aceptor del FSI y que la fase IP representa el paso último y más lento de la cadena de transporte de electrones fotosintéticos (Schansker *et al.*, 2005), por lo que para evaluar la fase IP se utilizó una medida de la amplitud relativa de la fase I-P,  $\Delta V_{IP} = 1 - V_I = (F_M - F_1)/(F_M - F_0)$ . Adicionalmente, se realizó el estudio

extendido de las trazas OJIP mediante el cálculo de la fluorescencia y su análisis en el rango de recambio individual  $F_0$  (medido a 50  $\mu\text{s}$ ) a  $F_J$  (medido a 2 ms), visualizando las bandas L (entre los 100-200  $\mu\text{s}$ ) y K (entre los 200-400  $\mu\text{s}$ ) mediante la sustracción o cálculo de las diferencias entre las trazas de fluorescencia tratadas y testigo (Strasser *et al.*, 2004).

#### *IV.4.7. Crecimiento*

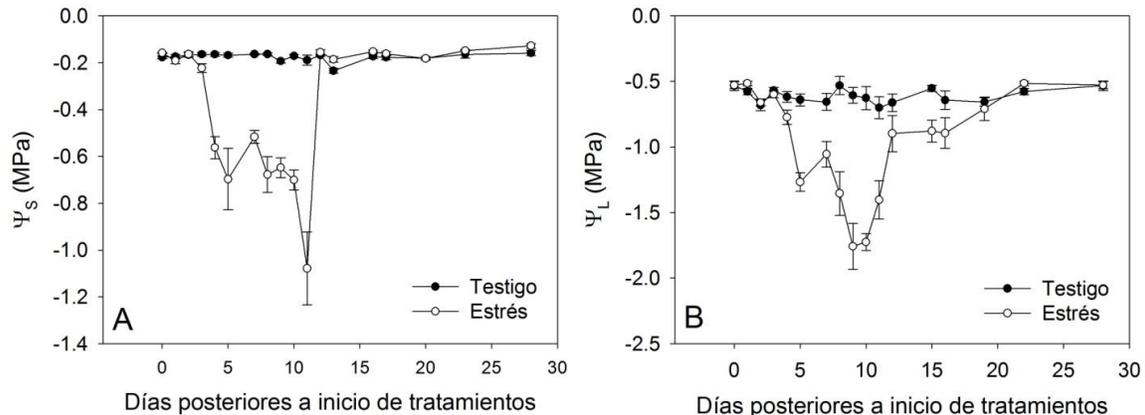
Se realizó una cosecha final a los 55 DDT para la estimación de los patrones de asignación de biomasa y área foliar de cinco plantas por tratamiento. Las plantas fueron divididas en hojas, tallo y raíz, se midió el área foliar mediante la utilización de un integrador de área foliar (LI3000, LI-COR) y posteriormente se secaron en una estufa de aire forzado hasta peso constante. Finalmente se registraron sus pesos en gramos mediante el uso de una balanza digital.

### **IV.5. Resultados**

#### *IV.5.1. Estado hídrico del suelo y planta*

Al inicio de la suspensión del riego (Fig. IV.1 A), el  $\Psi_S$  fue cercano a cero y con el progreso del déficit de humedad disminuyó hasta -1.1 MPa mientras que en el testigo se mantuvo en -0.19 MPa en promedio. Después del riego durante el periodo de recuperación, el  $\Psi_S$  regresó a los niveles del tratamiento testigo. Por otra parte, el potencial de agua de las hojas ( $\Psi_L$ ) de las plantas testigo se mantuvo en promedio en -0.61 MPa durante el periodo experimental (Fig. IV.1 B), mientras que el tratamiento con estrés disminuyó hasta -1.7

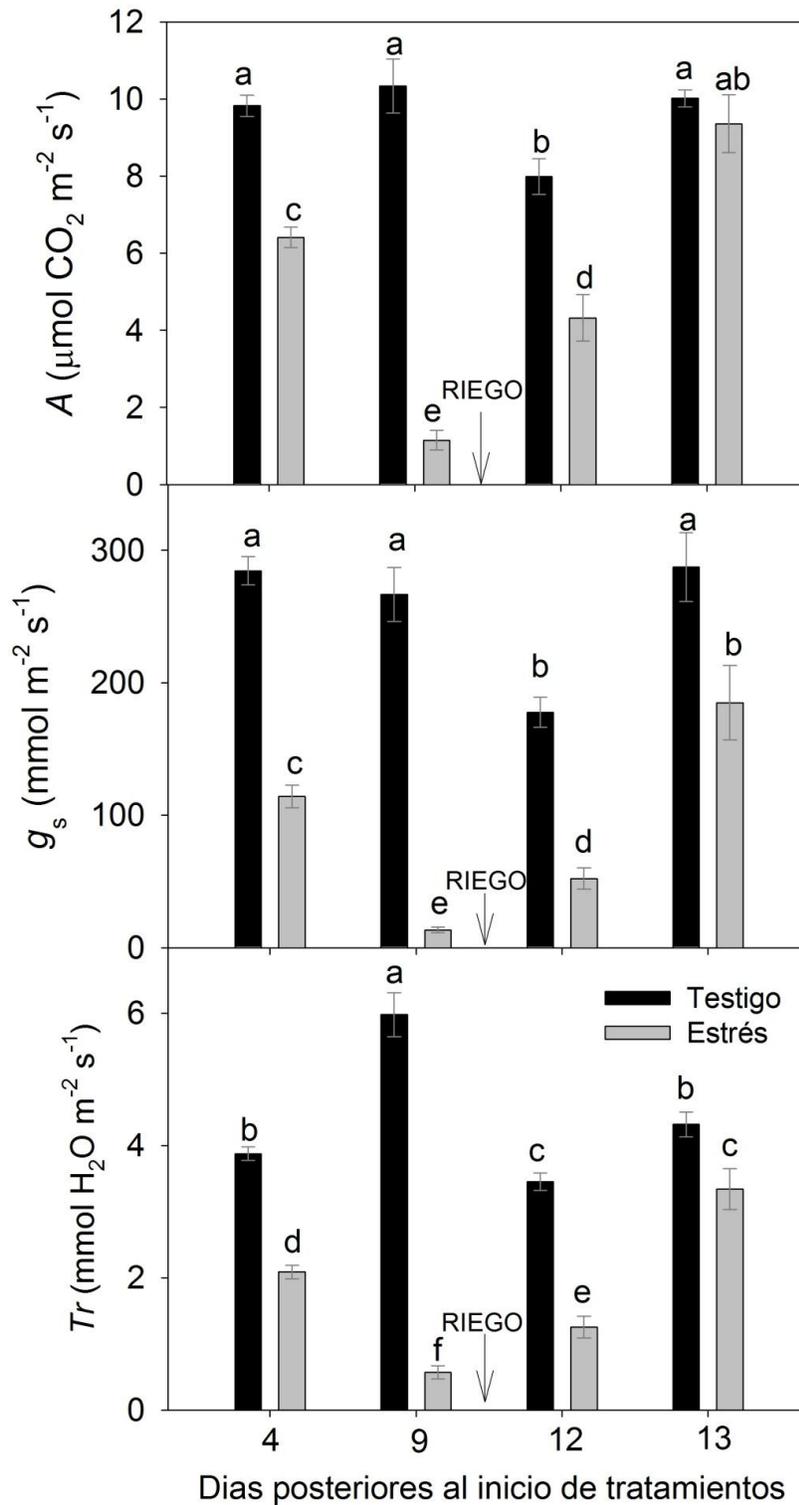
MPa en el día 10 y alcanzó los niveles del testigo hacia los días finales posteriores al riego de recuperación.



**Figura IV.1.** Efecto de la suspensión del riego en el potencial hídrico del suelo (A) y de la hoja (B) en plantas de *C. annuum*. Los puntos son el promedio  $\pm$  e.e. ( $n = 6$ ).

#### IV.5.2. Cambios en las características del intercambio de gases durante el estrés hídrico y recuperación

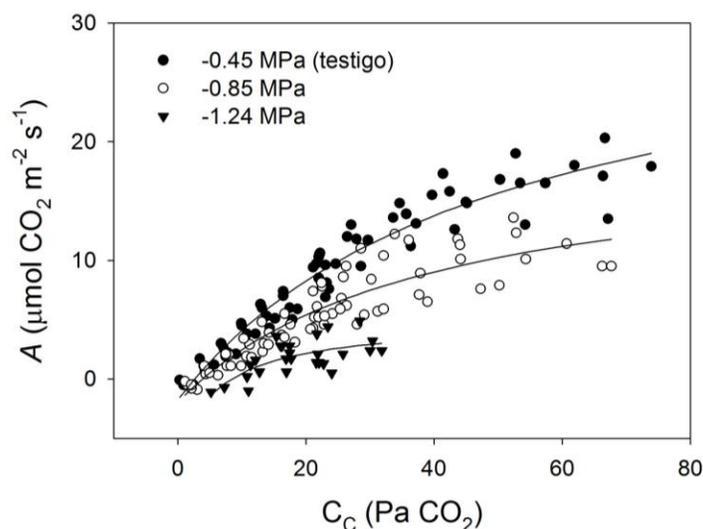
El estrés hídrico causó una disminución significativa en  $A$ ,  $g_s$  y  $Tr$  después de 4 y 9 d de iniciada la suspensión del riego, en comparación con las plantas testigo (Fig. IV.2). La  $A$  de la hoja presentó el 65 y 11% del nivel de las plantas testigo a los 4 y 9 d de estrés. La  $g_s$  de la hoja disminuyó un 60 y 95% en comparación con las plantas testigo, mientras que la  $Tr$  de la hoja disminuyó un 46 y 90% en comparación con las plantas testigo a los 4 y 9 d de estrés respectivamente. Posteriormente al riego de recuperación, las variables del intercambio de gases se recuperaron gradualmente durante los primeros dos días de riego (Fig. IV.2), pero el grado de recuperación entre los dos días fue distinto. La  $A$  de la hoja se restauró al 54 y 93% del testigo en el día uno y dos posterior al riego respectivamente. A su vez la  $g_s$  se restauró al 29 y 64% del nivel de las plantas testigo y la  $Tr$  al 36 y 77% del nivel de las plantas testigo.



**Figura IV.2.** Efecto de estrés hídrico en las variables de intercambio de gases ( $A$ , tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$ ;  $g_s$ , conductancia estomática;  $Tr$ , transpiración). Los datos son el promedio  $\pm$  e.e. ( $n = 10$ ).

#### IV.5.3. Análisis de la cinética al aumento en la concentración de $\text{CO}_2$ durante el estrés hídrico y recuperación

Los cambios en la  $A$  en función de las concentraciones intercelulares de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) fueron utilizadas para determinar las limitaciones bioquímicas de la fotosíntesis en condiciones de estrés y posterior al riego de recuperación. El estrés hídrico redujo progresivamente tanto la pendiente inicial de las curvas de  $A$  versus  $C_C$  como la  $A$  en las concentraciones altas de  $C_C$  (Fig. IV.3). Los valores de  $V_{\text{cmax}}$ ,  $J_{\text{max}}$ ,  $R_d$  y  $g_m$  fueron estimados ajustando el modelo de Farquhar mediante técnicas de regresión no lineal y se presentan en el Cuadro IV.1. No se observó una disminución significativa en la  $V_{\text{cmax}}$  a los 4 d de estrés ( $\Psi_L$  de  $-0.85$  MPa) pero sí a los 9 d ( $\Psi_L$  de  $-1.24$  MPa) con un decremento del 52% del nivel de las plantas testigo. Para  $J_{\text{max}}$ , los valores disminuyeron 36 y 57% en comparación con el testigo a los 4 y 9 d de estrés respectivamente. La  $R_d$  de la hoja sobrepasó significativamente en dos veces el nivel de las plantas testigo a los 9 d de estrés hídrico.



**Figura IV.3.** Tasa de asimilación neta de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) en relación a la concentración subestomática de  $\text{CO}_2$  ( $C_C$ ) en hojas de *C. annuum* en tres niveles de estrés hídrico definidos por el potencial de agua de la hoja. Los datos son las observaciones de cinco repeticiones en cada potencial de agua.

**Cuadro IV.1.** Tasa de carboxilación máxima de la Rubisco ( $V_{\text{cmax}}$ ), capacidad de regeneración de la RuBP mediada por la tasa máxima del transporte de electrones ( $J_{\text{max}}$ ), liberación de  $\text{CO}_2$  en la luz ( $R_d$ ) y conductancia del mesófilo ( $g_m$ ) en plantas de *C. annuum* con estrés hídrico y posterior al riego de recuperación. Todas las variables fueron obtenidas de curvas de respuesta al  $\text{CO}_2$ .

Variable	$\Psi_L$ (MPa)	$V_{\text{cmax}}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$J_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$R_d$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$g_m$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ )
Testigo	-0.45	40.3 ± 3.1 ab	67.4 ± 3.6 ab	0.6 ± 0.3 bc	15.3 ± 5.8 ab
Estrés 4	-0.85	27.0 ± 2.3 b	43.1 ± 5.0 cde	0.4 ± 0.1 c	16.2 ± 5.5 ab
Testigo	-0.54	51.5 ± 15.6 a	65.8 ± 13.4 ab	0.7 ± 0.3 bc	20.0 ± 4.7 a
Estrés 9	-1.24	24.6 ± 7.0 b	28.1 ± 8.1 e	2.2 ± 0.7 a	11.1 ± 5.5 ab
Recuperación					
Testigo	-0.58	32.4 ± 4.2 ab	55.4 ± 8.0 abc	0.2 ± 0.1 c	11.5 ± 7.0 ab
Día 1	-1.08	23.4 ± 10.4 b	45.2 ± 9.8 bcd	1.5 ± 0.5 ab	20.3 ± 4.4 a
Testigo	-0.54	33.4 ± 3.1 ab	57.9 ± 6.2 abc	0.2 ± 0.1 c	10.1 ± 5.1 ab
Día 2	-0.67	48.4 ± 4.5 ab	78.7 ± 8.2 a	0.6 ± 0.2 bc	2.1 ± 0.8 b

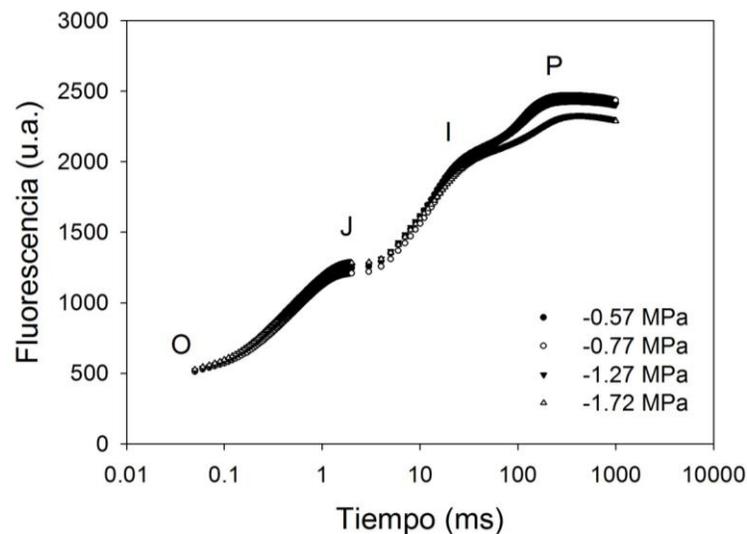
Letras distintas dentro de la misma columna muestran las diferencias significativas con  $P < 0.05$ . Los valores son el promedio ± e.e.,  $n = 5$ .

Posteriormente al riego de recuperación, la  $V_{\text{cmax}}$  y  $J_{\text{max}}$  aumentaron gradualmente a los niveles de las plantas testigo e inclusive en el día dos posterior al riego fueron mayores a los de las plantas testigo (Cuadro IV.1). Por su parte, la  $R_d$  disminuyó hasta alcanzar valores similares a los de las plantas testigo en los dos días posteriores al riego (Cuadro IV.1).

#### IV.5.4. Cambios en la fluorescencia de clorofila *a* en respuesta al estrés hídrico y recuperación

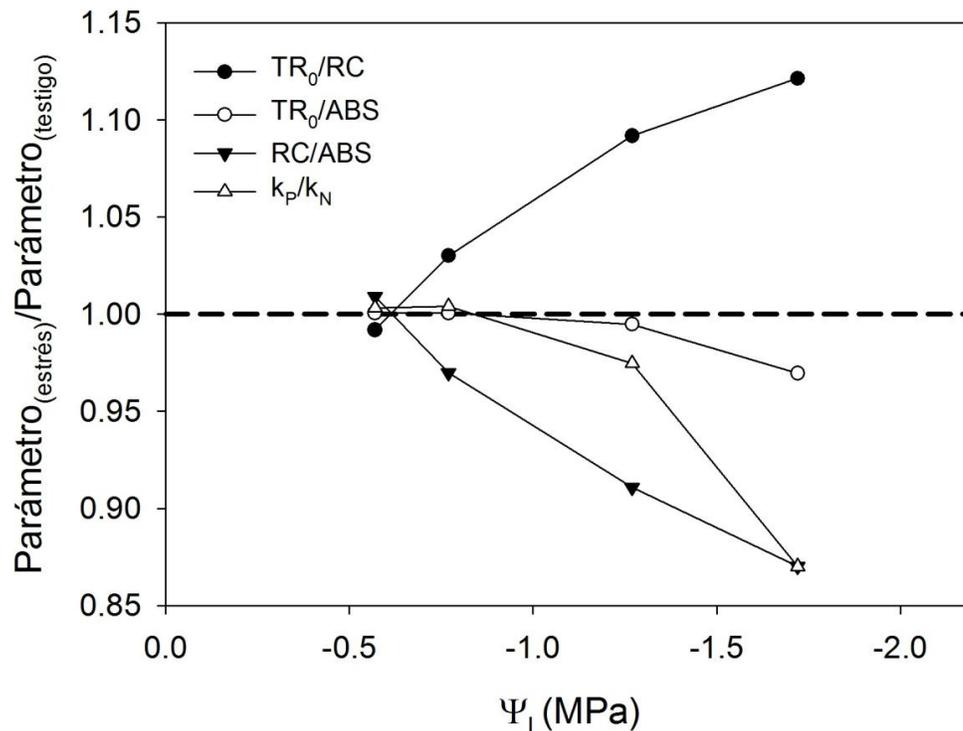
Todas las hojas examinadas exhibieron un aumento polifásico en la fluorescencia de la Chl *a* durante el primer segundo de iluminación posterior a la adaptación a la oscuridad al ser graficadas en una escala de tiempo logarítmica de los 50  $\mu$ s a 1.0 s (Fig. IV.4). Los diferentes pasos de la traza de fluorescencia polifásica son marcados en orden alfabético de la parte más lenta a la parte rápida de la traza. La fluorescencia inicial de Chl *a* en el nivel O refleja la producción de fluorescencia mínima cuando todas las moléculas de  $Q_A$  están en el estado oxidado. El paso más marcado a 2.0 ms es llamado el paso J. El aumento de la fluorescencia hasta J provee información acerca de los eventos individuales de cambio de las reacciones primarias de la fotoquímica, principalmente la reducción de la  $Q_A$ . Durante el intervalo de tiempo de 2 a ~200 ms se presentan múltiples separaciones de carga y los componentes redox de la cadena de transporte de electrones se reducen. Las diferentes fases de éste proceso se muestran hacia arriba en el aumento de la fluorescencia en los pasos J, I y P. El paso con la mayor intensidad de fluorescencia es llamado P (pico) y corresponde al estado en el cual todas las moléculas de  $Q_A$  están en estado reducido. El paso intermedio I y el final P reflejan la existencia de centros de PQ reducidos lenta y rápidamente, así como de diferentes estados redox de los centros de reacción del FSII (Strasser *et al.*, 1995). De manera general se acepta que el aumento rápido de la fluorescencia refleja la acumulación de la forma reducida del aceptor de electrones primario quinona ( $Q_A$ ), en otras palabras el cierre de los centros de reacción (RCs) del FSII, lo cual es el resultado neto de la reducción de  $Q_A$  debida a la actividad del FSII y la reoxidación de la  $Q_A^-$  debida a la actividad del FSI (Strasser *et al.*, 2010). Cuando la muestra fotosintética es mantenida en la oscuridad, la  $Q_A$  es prácticamente oxidada de forma completa (por lo que todos los RCs están abiertos) y la

producción de fluorescencia es mínima; debido al alto tiempo de resolución del instrumento, la intensidad de fluorescencia registrada al inicio de la iluminación (al paso O; 50  $\mu$ s) se considera emitida con la producción mínima y por lo tanto denotada como  $F_0$ . La intensidad máxima  $F_P$  depende del estado redox alcanzado por la  $Q_A$  y adquiere su valor máximo posible ( $F_M$ ) si la iluminación es lo suficientemente fuerte para causar el cierre de todos los RCs (Strasser *et al.*, 2010). Las trazas de fluorescencia OJIP en hojas de *C. annuum* se muestran en la Figura IV.4. La secuencia de las trazas de arriba hacia abajo de la figura siguen la disminución en el  $\Psi_L$ . El efecto principal fue una disminución del nivel P ( $F_P$ ), principalmente a la disminución del  $\Psi_L$  a -1.72 MPa, mientras que  $F_0$  no exhibió cambios (Fig. IV.4). La respuesta de  $F_0$  y  $F_P$  no solo pueden ser atribuidas al comportamiento correspondiente de la producción de fluorescencia, dado que la absorción por sección cruzada excitada sufre cambios conforme se deshidrata, debido a cambios en la orientación del cloroplasto, turgencia, geometría de la muestra y contenido de clorofila (Strasser *et al.*, 2010).



**Figura IV.4.** Cambios en la cinética de inducción de fluorescencia de Chl *a* polifásica (OJIP) en hojas de *C. annuum* con riego adecuado (● -0.57 MPa) y con distintos niveles de estrés hídrico (○ -0.77, ▼ -1.27, △ -1.72). Cada curva es el promedio ( $n = 8$ ).

Las fases OJIP de las trazas de fluorescencia representadas en la Figura IV.4 fueron analizadas por la prueba JIP. La Figura IV.5 y IV.6 presentan los parámetros derivados después de que fueron normalizados utilizando como referencia los valores correspondientes al  $\Psi_L$  de las plantas testigo. En la Figura IV.5 se muestran los parámetros seleccionados que se refieren a la capacidad fotoquímica del FSII y que son presentados en relación al  $\Psi_L$  de los niveles medidos; la observación general es que conforme el potencial de agua decrece los parámetros exhiben una disminución, excepto para  $TR_0/RC$  el cual contrariamente aumenta.



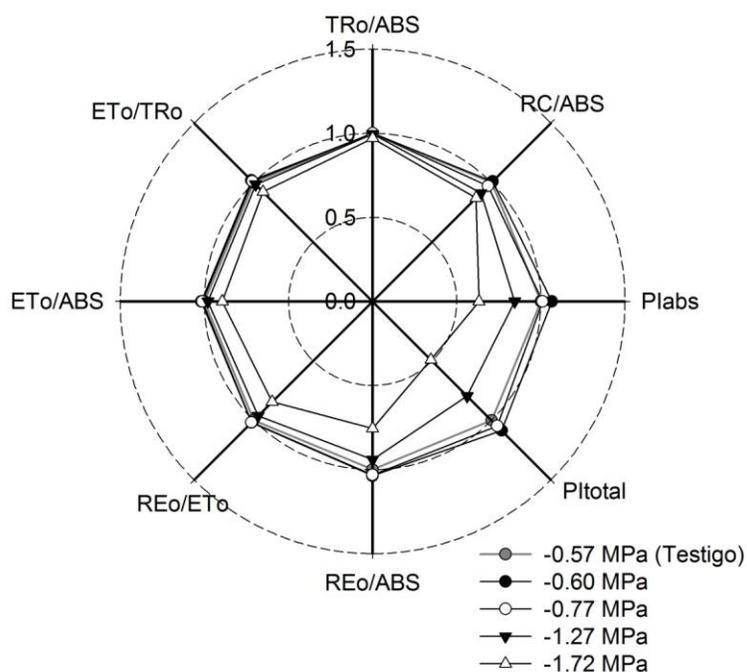
**Figura IV.5.** Parámetros que cuantifican la estructura de la maquinaria fotosintética en hojas de *C. annuum* adaptadas a la oscuridad (1 h) a diferentes potenciales de agua de la hoja ( $\Psi_L$ ). Los parámetros derivados de la prueba JIP aplicada a las trazas de aumento rápido de la fluorescencia (OJIP), fueron normalizados utilizando como referencia los valores correspondientes al tratamiento testigo.

La fórmula para la producción cuántica máxima de la fotoquímica primaria,  $\phi_{P_0} = (F_M - F_0)/F_M$ , es válida para muestras donde todos los RCs están activos reduciendo  $Q_A$  y por

lo tanto, en condiciones de una fuerte iluminación con luz actínica se encuentran cerrados en el paso P ( $F_P = F_M$ ). Sin embargo, diferentes tipos de estrés pueden causar una transformación de los RCs a “sumideros de calor”, donde la energía de excitación es disipada como calor en lugar de ser transformada en energía fotoquímica; por lo tanto la producción de fluorescencia de dichas unidades es la misma que la de los RCs abiertos (Strasser *et al.* 2010, 2004; Tsimilli-Michael y Strasser, 2008). Concomitantemente,  $F_P$  es menor que  $F_M$  y el  $\phi_{P_0}$  calculado expresa entonces el promedio de las verdaderas unidades activas  $\phi_{P_0}$  del FSII y de las inactivas  $\phi_{P_0}=0$ . El análisis de la prueba JIP involucra el cálculo (en unidades arbitrarias) del flujo de captura por centro de reacción activo ( $TR_0/RC$ ) y por lo tanto, el cálculo de  $RC/ABS = (TR_0/ABS)/(TR_0/RC)$ ; nótese que, en la prueba JIP, la abreviación RC es utilizada solo para los centros de reacción activos. Esto permite distinguir cuando una disminución observada en un tratamiento del  $\phi_{P_0}$  calculado es debida solo al aumento en la velocidad de desexcitación no fotoquímica de la constante  $k_N$  (extinción en la antena) o a la inactivación de una fracción de los centros de reacción o ambos. Los tres parámetros mencionados arriba están presentados en la Figura IV.5, junto con el cociente  $k_P/k_N$  (donde  $k_P$  es la constante de desexcitación fotoquímica). La razón  $k_P/k_N$  es igual a la proporción  $F_V/F_0$  (donde  $F_V=F_M-F_0$ ; fluorescencia variable máxima); aunque este no posee información adicional (nótese que  $\phi_{P_0}=k_P/(k_P+k_N)$ , por ejemplo  $\phi_{P_0}$  es determinada por las mismas constantes), éste es un parámetro más sensitivo y provee un criterio adicional para los cambios que se presentan en la estructura del FSII, como sigue: dado que  $k_P$  corresponde al promedio de las unidades activas (verdaderas  $k_P$ ) e inactivas ( $k_P=0$ ) del FSII, la razón  $k_P/k_N$  puede ser proporcional a los RC/ABS si no hay un cambio

en  $k_N$  (Tsimilli-Michael y Strasser, 2008b) y divergir de la proporcionalidad si  $k_N$  también cambia.

En la Figura IV.5 se muestra que la disminución del  $\Psi_L$  resulta en una inactivación de los centros de reacción. Conforme el  $\Psi_L$  cae la disminución de los RCs activos (RC/ABS) es más pronunciada que el de  $\varphi_{Po} = TR_0/ABS$  y en consecuencia  $TR_0/RC$  (el único parámetro funcional en la gráfica; los otros tres son parámetros estructurales) aumenta en dichos niveles, lo que indica que la absorción por las unidades activas aumenta. La comparación de  $k_P/k_N$  con RC/ABS muestra que  $k_N$  aumenta de manera significativa a un  $\Psi_L$  de -0.77 MPa (desviación de la curva  $k_P/k_N$  de la curva de RC/ABS).



**Figura IV.6.** Eficiencias para todo el flujo de energía en cascada – desde la absorción a la reducción de los aceptores finales de electrones del FSI – e índices de comportamiento en hojas de *C. annuum* adaptadas a la oscuridad (1 h) a diferentes potenciales de agua de la hoja ( $\Psi_L$ , MPa). Los parámetros derivados de la prueba JIP aplicada a las trazas de aumento rápido de la fluorescencia (OJIP), fueron normalizados utilizando como referencia los valores correspondientes al tratamiento testigo.

La Figura IV.6 representa las eficiencias (parámetros estructurales) para la cascada de energía completa – desde la absorción a la reducción del aceptor de electrones final en el lado aceptor del FSI – y los índices de desempeño (potenciales regidos por los parámetros estructurales) en los niveles de  $\Psi_L$  evaluados. Se puede observar que todos los parámetros son afectados por la caída en el  $\Psi_L$  aunque en distinto grado.

En el Cuadro IV.2 se muestra el efecto del estrés hídrico en la fase I-P,  $\Delta V_{IP} = 1 - V_I = (F_M - F_I) / (F_M - F_0)$  y cuyo análisis de datos es independiente del modelo. En el caso de los  $\Psi_L$  de -0.60 a -1.27 MPa no hubo diferencias con las plantas testigo, encontrándose un decremento significativo en la contribución de la fase I-P a la fluorescencia variable en el  $\Psi_L$  de -1.72 (Cuadro IV.2). Como se ha demostrado con anterioridad (Schansker *et al.*, 2003), la fase I-P sigue a la re-reducción de la  $PC^+$  y el  $P700^+$  y depende de la disponibilidad en la reserva de los aceptores de electrones en el lado aceptor del FSI. Basado en el trabajo de Paillotin (1976), es posible definir la producción cuántica con la cual los electrones reducen los aceptores finales de electrones del FSI ( $RE_0/ABS = \phi_{R_0}$ ) (Strasser *et al.*, 2010). En la Figura IV.6 se muestra el comportamiento de dicho parámetro en condiciones de estrés, el cual disminuyó ligeramente a  $\Psi_L$  de -1.27 y marcadamente a -1.72 MPa. La eficiencia con la cual un electrón puede moverse de los aceptores de electrones reducidos interfotosistemas hacia los aceptores finales de electrones del FSI ( $RE_0/ET_0 = \delta_{R_0}$ ) disminuyó con la caída del  $\Psi_L$  (Fig. IV.6). El transporte de electrones de la  $Q_A^-$  hacia los aceptores de electrones del FSI ( $RE_0/RC$ ) disminuyó en las hojas con estrés (Cuadro IV.2). Puede notarse que una pérdida de los aceptores finales puede simplemente representar una pérdida de centros de reacción del FSI en respuesta al estrés hídrico.

**Cuadro IV.2.** Amplitud relativa de la fase I-P,  $\Delta V_{IP} = 1 - V_I = (F_M - F_I)/(F_M - F_0)$  y flujo de energía específico ( $RE_0/RC$ ), en hojas de *C. annuum*, a diferentes potenciales de agua de la hoja ( $\Psi_L$ , MPa).

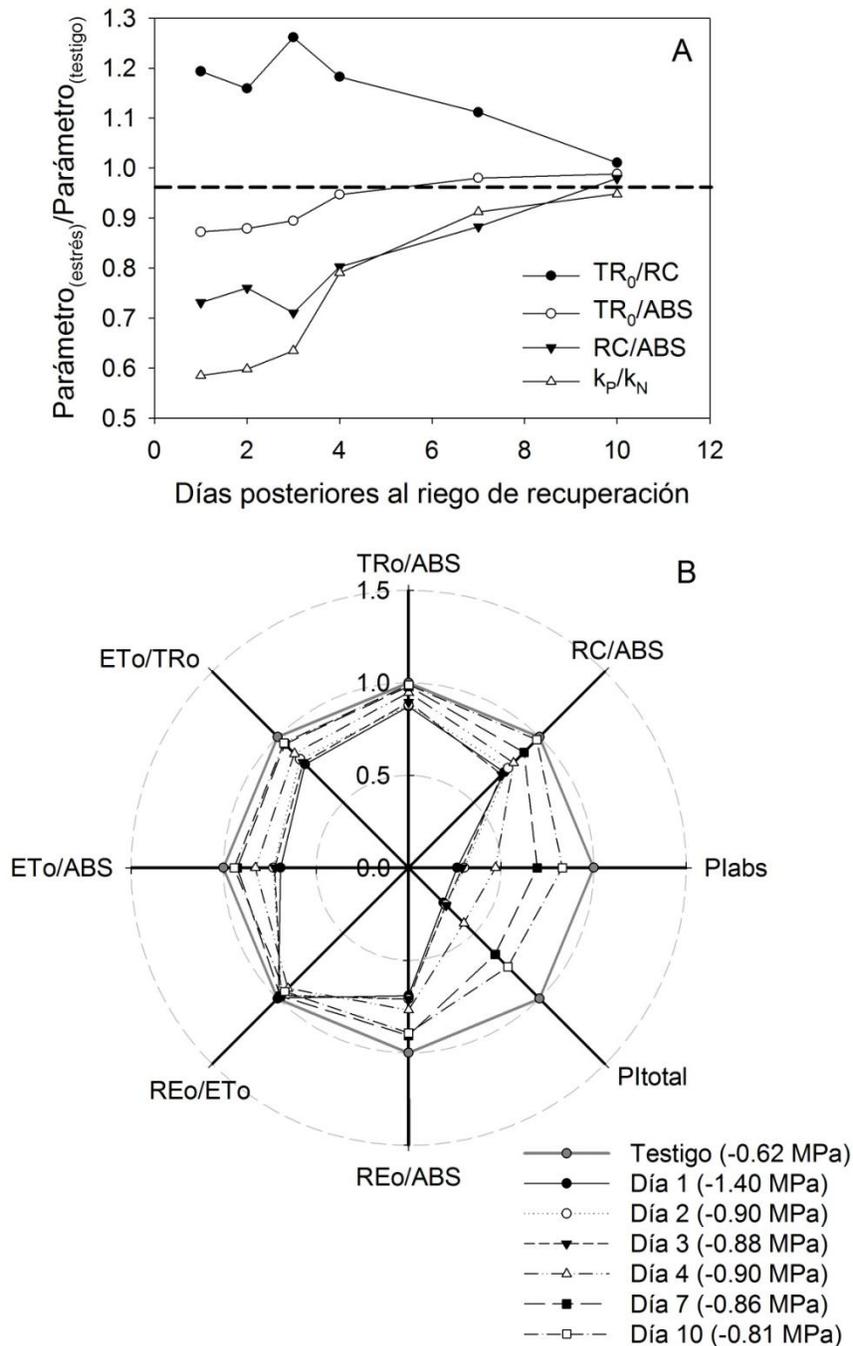
Variable	$\Psi_L$ (MPa)	$\Delta V_{IP}$	$RE_0/RC$
Testigo	-0.57	0.212 ± 0.03 efgh	0.33 ± 0.03 fgh
Estrés	-0.60	0.220 ± 0.03 cdefg	0.34 ± 0.04 efg
Testigo	-0.62	0.229 ± 0.03 cdef	0.34 ± 0.04 defg
Estrés	-0.77	0.236 ± 0.04 bcde	0.36 ± 0.06 cdef
Testigo	-0.64	0.222 ± 0.03 cdefg	0.33 ± 0.04 fgh
Estrés	-1.27	0.212 ± 0.03 defgh	0.34 ± 0.05 defg
Testigo	-0.63	0.241 ± 0.03 bcd	0.36 ± 0.05 cdef
Estrés	-1.72	0.190 ± 0.03 hi	0.31 ± 0.04 gh
Recuperación			
Testigo	-0.70	0.249 ± 0.02 bc	0.36 ± 0.03 cdef
Día 1	-1.40	0.194 ± 0.03 ghi	0.34 ± 0.05 defg
Testigo	-0.66	0.255 ± 0.04 ab	0.38 ± 0.05 abcde
Día 2	-0.90	0.198 ± 0.03 fgh	0.34 ± 0.05 defg
Testigo	-0.55	0.264 ± 0.01 ab	0.39 ± 0.03 abc
Día 3	-0.88	0.207 ± 0.03 fgh	0.37 ± 0.05 abcde
Testigo	-0.64	0.274 ± 0.21 a	0.41 ± 0.02 ab
Día 4	-0.90	0.221 ± 0.03 cdefg	0.39 ± 0.06 abc
Testigo	-0.66	0.239 ± 0.02 bcde	0.37 ± 0.02 bcde
Día 7	-0.86	0.221 ± 0.01 cdefgh	0.38 ± 0.03 abcde
Testigo	-0.62	0.262 ± 0.02 ab	0.41 ± 0.03 a
Día 10	-0.81	0.238 ± 0.02 bcde	0.38 ± 0.03 abcd

Letras distintas dentro de la misma columna muestran las diferencias significativas con  $P < 0.05$ . Los valores son el promedio ± e.e.,  $n = 8$ .

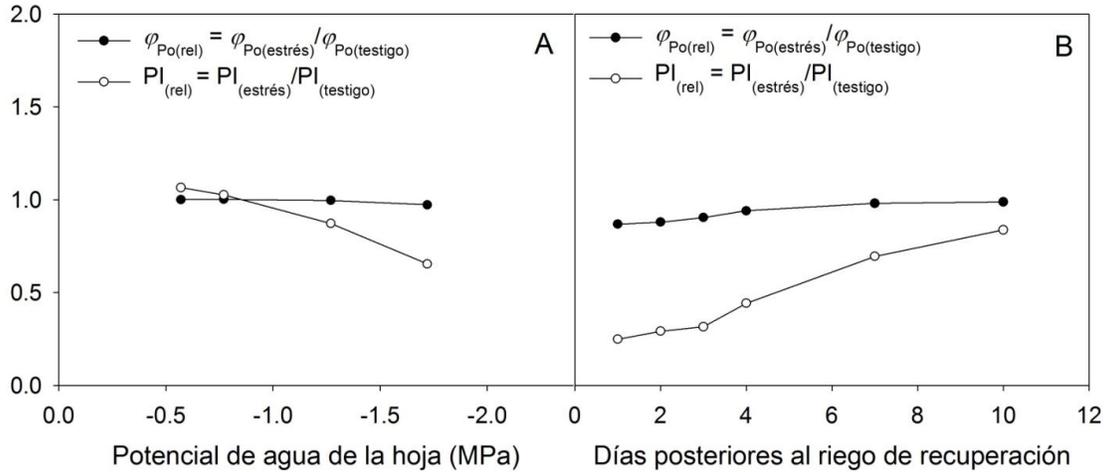
El flujo de energía específico ( $RE_0/RC$ ), la producción cuántica ( $RE_0/ABS$ ) y  $RE_0/ET_0$  se refieren al flujo de electrones de los aceptores de electrones reducidos interfotosistemas hacia los aceptores finales de electrones del FSI y refleja la fase I-P de las trazas OJIP. Una reducción clara en estos parámetros fue observada en las plantas con estrés hídrico (Cuadro IV.2 y Fig. IV.6).

El riego de recuperación de las plantas de *C. annuum* al final del tratamiento de suspensión de riego restauró gradualmente el  $\Psi_L$  (Fig. IV.1). Con la rehidratación de las hojas, las señales se recuperaron a valores cercanos a las plantas testigo, por ejemplo las trazas OJIP – tanto en amplitud como en forma – y por lo tanto todos los parámetros de la prueba JIP (Fig. IV.7 A y B).

El efecto del estrés hídrico en la proporción relativa de  $F_v/F_M$  y el índice de desempeño ( $PI_{ABS}$ ) en hojas de *C. annuum* y posteriormente al riego de recuperación se muestra en la Figura IV.8 A y B. Se observó que el estrés hídrico tuvo un efecto ligero en la producción cuántica máxima de la fotoquímica primaria del FSII ( $\phi_{P_0} = F_v/F_M$ ), confirmando una alta estabilidad en la eficiencia fotoquímica potencial del FSII durante el estrés. La  $F_v/F_M$  relativa varió de entre 1 a 0.97 a -0.57 y -1.7 MPa respectivamente y se incrementó de 0.87 a 0.99 durante los 10 d siguientes de riego de recuperación.



**Figura IV.7.** Parámetros que cuantifican la estructura de la maquinaria fotosintética en hojas de *C. annuum* adaptadas a la oscuridad (1 h) posteriormente al riego de recuperación (A). Los parámetros derivados de la prueba JIP aplicada a las trazas de aumento rápido de la fluorescencia (OJIP), fueron normalizados utilizando como referencia los valores correspondientes al tratamiento testigo. Eficiencias para todo el flujo de energía en cascada – desde la absorción a la reducción de los aceptores finales de electrones del FSI – e índices de comportamiento en hojas de *C. annuum* adaptadas a la oscuridad (1 h) posteriores al riego de recuperación (B).

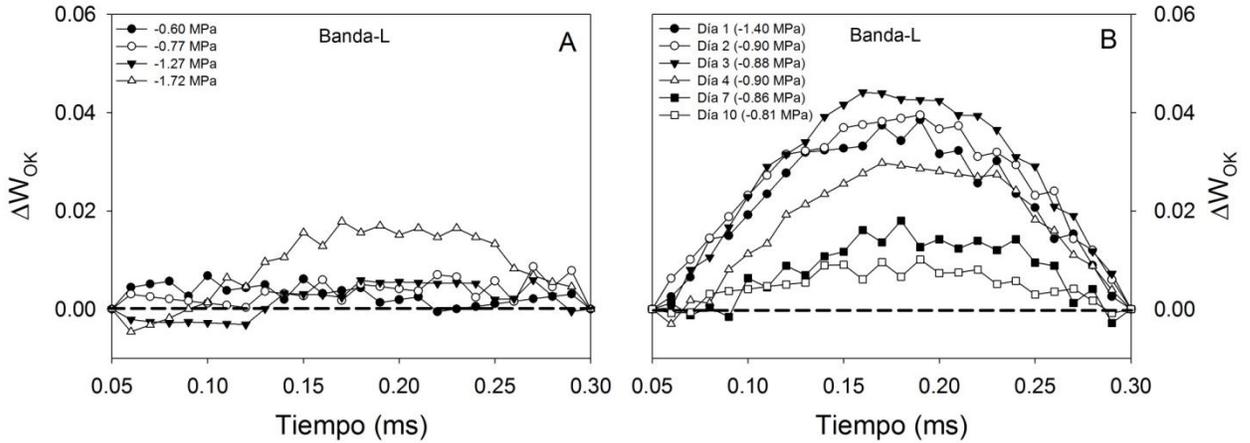


**Figura IV.8.** Producción cuántica máxima de la fotoquímica primaria  $F_V/F_M$  (●) e índice de desempeño  $PI_{ABS}$  (○) normalizado con el testigo a distintos potenciales de agua (A) y posteriormente al riego de recuperación (B) en hojas de *C. annuum*.

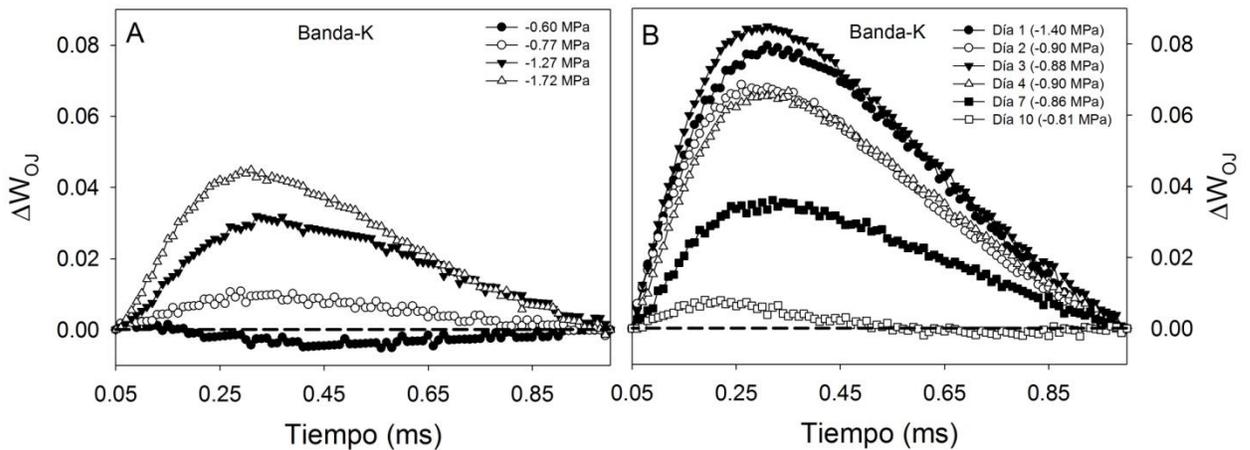
Seguido a la caída del potencial de agua de la hoja el  $PI_{ABS}$  disminuyó en las plantas de *C. annuum* (Fig. IV.8 A). El  $PI_{ABS}$ , como una medida del desempeño de la planta, reveló diferencias en la respuesta a la disminución del potencial de agua. Al inicio del tratamiento (-0.54 MPa) el  $PI_{ABS}$  relativo fue de 1.06 y a -1.72 MPa fue de 0.65 durante el momento más severo de estrés. Después del riego de recuperación el  $PI_{ABS}$  incrementó desde 0.25 hasta alcanzar un valor cercano a 1 (Fig. IV.8 B). Similarmente, el  $PI_{total}$  disminuyó conforme el  $\Psi_L$  se reducía (Fig. IV.6) y se recuperó a niveles cercanos a la planta testigo posteriormente al riego de recuperación (Fig. IV.7 B).

La fase O-J de la traza de fluorescencia de Chl *a* está relacionada a la reducción fotoquímica del aceptor quinona primario ( $Q_A$ ) en los centros de reacción del FSII y es sensitivo a la intensidad de luz y temperatura (Strasser *et al.*, 1995). Por lo que las trazas de fluorescencia de Chl *a* de los tratamientos testigo y estrés, este último con distinto grado de severidad fueron doblemente normalizadas entre  $F_0$  (0.05 ms) y  $F_K$  (0.3 ms), que puede ser

expresado como  $W_{OK} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$ . Subsecuentemente, las trazas testigo fueron sustraídas de las trazas de las hojas tratadas ( $\Delta W_{OK}$ ). La traza resultante de la diferencia se muestra en la Figura IV.9. La diferencia hace la banda L visible. Esta tiene un pico alrededor de los 0.15 a 0.20 ms. Una desviación positiva indica la transformación del aumento de la fluorescencia sigmoidea hacia un aumento exponencial (Strasser y Stirbet, 1998) con una disminución de la conectividad energética (o agrupamiento) entre las unidades del FSII. La respuesta de la banda L en los distintos potenciales de agua de la hoja y durante el riego de recuperación fue diferente (Fig. IV.9 A y B), con una disminución en la conectividad energética en el  $\Psi_L$  de -1.72 MPa y durante los días uno a cuatro posteriores al riego lo que indica un rezago en la recuperación de la conectividad, mientras que a los 7 y 10 d de riego la conectividad energética aumentó (Fig. IV.9 B). Esto representa una recuperación del estado de estrés hídrico y quizá un aumento en la resistencia a la sequía. En la Figura IV.10 A y B, las trazas de fluorescencia de Chl *a* fueron doblemente normalizadas entre  $F_0$  y  $F_J$  (=1 ms), que puede expresarse como  $W_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$  y la diferencia entre los distintos niveles de estrés y el testigo fueron determinados ( $\Delta W_{OJ}$ ). Esto permitió la visualización de la banda *K* con un pico entre los 0.25 y 0.30 ms. Se observó una desviación positiva en aumento, lo que indica que la banda *K* se hizo más pronunciada conforme el estrés hídrico fue más severo en comparación con el testigo (Fig. IV.10 A). La banda *K* puede ser observada en el aumento de la fluorescencia en respuesta al estrés por sequía (Oukarroum *et al.*, 2007). La aparición de la banda *K* coincide con una limitación en el lado donador del FSII (Srivastava *et al.*, 1997). Dicha limitación desapareció hacia el día 10 posterior al riego de recuperación (Fig. IV.10 B), lo que indica una recuperación de la función normal del lado donador del FSII.



**Figura IV.9.** Cambio en la forma de las curvas de la fluorescencia de Chl *a* normalizadas entre  $F_0$  y  $F_K$  expresadas como  $W_{OK} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$ .  $\Delta W_{OK} = W_{OK(\text{tratamiento})} - W_{OK(\text{testigo})}$  donde tratamiento testigo (----), -0.60 (●), -0.77 (○), -1.27 (▼), y -1.72 (△) en A y tratamiento testigo (----), día 1 (●), día 2 (○), día 3 (▼), día 4 (△), día 7 (■) y día 10 (□) posterior al riego de recuperación en B.

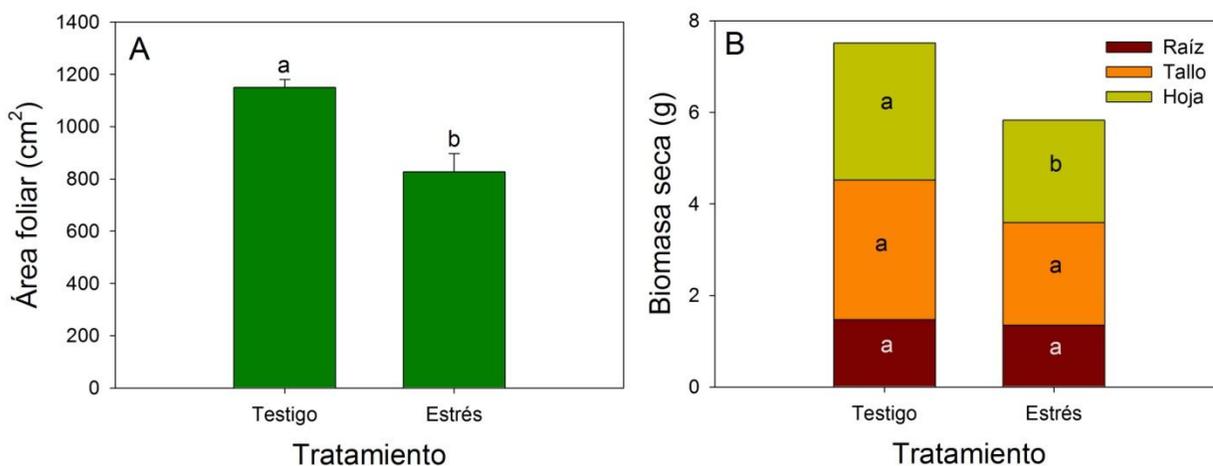


**Figura IV.10.** Cambio en la forma de las curvas de la fluorescencia de Chl *a* normalizadas entre  $F_0$  y  $F_J$  expresadas como  $W_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$ .  $\Delta W_{OJ} = W_{OJ(\text{tratamiento})} - W_{OJ(\text{testigo})}$  donde tratamiento testigo (----), -0.60 (●), -0.77 (○), -1.27 (▼), y -1.72 (△) en A y tratamiento testigo (----), día 1 (●), día 2 (○), día 3 (▼), día 4 (△), día 7 (■) y día 10 (□) posterior al riego de recuperación en B.

#### IV.5.5. Crecimiento

La disminución en la disponibilidad de agua en las plantas con estrés hídrico originó una reducción significativa en la producción de área foliar en comparación con las plantas

testigo (Fig. IV.11 A). Además de la reducción del tejido fotosintético, producto de los cambios en la fijación de carbono debido a las alteraciones difusivas, metabólicas y fotoquímicas causadas por el déficit de agua, las plantas con estrés hídrico mostraron una reducción en el crecimiento entendido como la generación de biomasa seca, con una reducción significativa en la asignación de biomasa seca al compartimento hojas en comparación con las plantas testigo (Fig. IV.11 B).



**Figura IV.11.** Producción de área foliar al final del periodo experimental (A) y partición de biomasa seca al final del periodo experimental (B) en plantas de *C. annuum* en dos condiciones de humedad en el suelo. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas con  $P < 0.05$  ( $n = 5$ ).

## IV.6. Discusión

El análisis de las variables de intercambio de gases y de las curvas  $A/C_C$  demostraron que la disminución en  $A$  en las plantas de *C. annuum* durante el estrés hídrico estuvo asociado tanto a limitaciones estomáticas como a limitaciones no estomáticas. Los resultados sugieren que las limitaciones estomáticas en  $A$  se presentan en las fases iniciales del estrés, mientras que las no estomáticas se vuelven limitantes para la  $A$  durante periodos más prolongados. Este patrón de respuesta es consistente con el descrito por otros autores en condiciones controladas (Hu *et al.*, 2010). Las mediciones de los distintos componentes fotosintéticos derivados del intercambio de gases mostraron que inicialmente a los 4 d posteriores al inicio del tratamiento con estrés cuando el  $\Psi_L$  fue de -0.85 MPa (estrés moderado), la disminución en  $A$  fue acompañada por un decremento en  $g_s$  y  $Tr$  (Fig. IV.2) mientras que  $F_V/F_M$  ( $\phi_{Po}$ ) permaneció sin cambios (Fig. IV.8 A) y otros componentes de la capacidad fotosintética ( $V_{cmax}$  y  $J_{max}$ ) exhibieron una ligera reducción (Cuadro IV.1). En condiciones de un estrés moderado, una pequeña disminución en la conductancia estomática puede tener efectos protectores al permitir a la planta ahorrar agua y mejorar la eficiencia en el uso del agua (Chaves *et al.*, 2009). Los resultados del presente estudio muestran además una reducción en la difusión de  $CO_2$  a través del estoma (Fig. IV.2), el estrés hídrico severo aparentemente ocasionó una disminución en la difusión de  $CO_2$  a través del mesófilo de la hoja evidenciada por la reducción en la conductancia del mesófilo al  $CO_2$  ( $g_m$ ; Cuadro IV.1). Estos cambios en la conductancia del mesófilo pueden estar ligados a alteraciones físicas en la estructura de los espacios intracelulares debido al marchitamiento de la hoja o debido a alteraciones en la bioquímica (conversión del bicarbonato a  $CO_2$ ) y/o permeabilidad de las membranas (Chaves *et al.*, 2009).

En nuestros días están disponibles muchas técnicas experimentales para la investigación del comportamiento energético de un sistema fotosintético. Existe un acuerdo general de que a temperatura ambiente, la producción de fluorescencia por las Chl *a* de plantas, algas y cianobacterias en la región espectral de los 680-740 nm es emitida principalmente por el FSII y puede por lo tanto servir como una prueba intrínseca del destino de su energía de excitación (Papageorgiu y Govindjee, 2004). Dado que su destino es determinado por la estructura y el equilibrio redox de todos los componentes, desde la división del agua hasta los aceptores de electrones del FSI, un análisis adecuado de la cinética del aumento rápido de la fluorescencia puede proveer información sustancial, no sólo del FSII, sino de todo el proceso fotosintético (Strasser *et al.*, 2010). Dicho análisis es la prueba JIP (Strasser *et al.*, 2004), que liga los diferentes pasos y fases del aumento rápido de la fluorescencia OJIP con las eficiencias de la transferencia de electrones en la cadena interfotosistemas y hacia los aceptores de electrones finales en el lado aceptor del FSI. Sin embargo, como cualquier modelo que es propuesto en bioenergética, el análisis del aumento rápido de la fluorescencia está basado en dogmas y supuestos. El dogma adoptado en la formulación de la prueba JIP, como el de la mayoría de los investigadores, está basado en la teoría de Duysens y Sweers (1963) que dice que la producción de fluorescencia por la antena del FSII es máxima cuando el aceptor de electrones primario del FSII la  $Q_A$  es reducida ( $Q_A^-$ ) y mínima cuando la  $Q_A$  está en estado oxidado; los RCs son denotados como cerrados y abiertos a la intensidad de fluorescencia de  $F_M$  y  $F_0$  respectivamente. Entre estos extremos existen varios estados redox bioquímicos, dado que hay varias combinaciones de estados redox de los acarreadores de electrones interfotosistemas (especialmente de  $Q_A$ ,  $Q_B$  y PQ); los cuales pueden ser predichos mediante modelado y aproximados por simulaciones numéricas. Se han propuesto diferentes puntos de vista conceptuales, que consideran el

dogma de tener una mezcla de RCs abiertos y cerrados muy simplistas y que pueden ser defendidos con la misma precisión experimental. Esto significa que la pregunta de cómo funciona una muestra fotosintética, permanece abierta. Sin embargo, el análisis de las trazas de fluorescencia OJIP pueden tomarse como una señal apropiada, debido a que ésta ha sido exhaustivamente analizada por muchos años en base de un concepto bioenergético (Strasser *et al.*, 2010).

Los resultados mostraron poco efecto en la producción cuántica máxima de la fotoquímica primaria del FSII ( $\phi_{Po} = F_V/F_M$ ) en los distintos  $\Psi_L$  (Fig. IV.8 A), lo que concuerda con lo reportado con anterioridad (Lu y Zhang, 1999). Investigaciones basadas en evaluaciones de la fluorescencia de clorofila han mostrado que el FSII es resistente al déficit de agua sin sufrir efectos (Lu y Zhang, 1998) o afectado solamente durante condiciones severas de sequía (Souza *et al.*, 2004). La proporción  $F_V/F_M$  refleja la eficiencia máxima de captura de la energía de excitación por los centros de reacción ‘abiertos’ del FSII. Un decremento en este parámetro indica una disminución en la regulación de la fotosíntesis o fotoinhibición durante el estrés por sequía (Souza *et al.*, 2004). Sin embargo, la invariabilidad en el presente experimento de  $F_V/F_M$  sugiere una gran insensibilidad del parámetro para evaluar el estrés hídrico en las plantas. La misma observación en el uso de  $F_V/F_M$  para el estudio de la fluorescencia en plantas con estrés ha sido reportado por otros investigadores (Oukarroum *et al.*, 2007; Van Heerden *et al.*, 2004). En contraste, se observó una marcada disminución en el índice de desempeño  $PI_{ABS}$  con la caída del  $\Psi_L$  de la hoja (Fig. IV.8 A). El  $PI_{ABS}$  es calculado y depende de tres expresiones: la concentración de los centros de reacción por clorofila (RC/ABS), una expresión

relacionada a la fotoquímica primaria  $\phi_{P_0}/(1 - \phi_{P_0})$  y una expresión relacionada al transporte de electrones  $\Psi_0/(1 - \Psi_0)$ . Esto significa que el  $PI_{ABS}$  es sensitivo a cambios tanto en las propiedades de la antena, en la eficiencia de captura o el transporte de electrones más allá de la  $Q_A$  (Oukarroum *et al.*, 2007). La disminución en el  $PI_{ABS}$  en respuesta al estrés hídrico se debió principalmente a cambios en las propiedades de la antena (RC/ABS) y a la disminución de la eficiencia fotoquímica en el transporte de electrones fotosintético ( $ET_0/TR_0$ ) en las plantas con estrés (Fig. IV.6).

Los valores menores de  $\Delta V_{IP}$  observados en las hojas con  $\Psi_L < -0.77$  MPa de *C. annuum* (Cuadro IV.2) han sido observados también por Oukarroum *et al.* (2009) en dos variedades de cebada (*Hordeum vulgare* L.) var. Lannaceur y Aït Baha; y por Van Heerden *et al.* (2007) en dos especies de arbustos del desierto, *Augea capensis* Thunb. y *Zygophyllum prismatocarpum* E. Meyer ex Sond. Estos últimos sugieren que el estrés por sequía causa una restricción en el lado aceptor del FSI llevando a un aumento en el estado reducido del conjunto de plastoquinonas. Schansker *et al.* (2005) demostraron que la fase I-P depende tanto del flujo de electrones a través del FSI como de un bloqueo transitorio del flujo de electrones en el lado aceptor del FSI. Esto también depende del contenido de FSI (Oukarroum *et al.*, 2009). Por lo que el aumento en la deshidratación de las hojas de *C. annuum* induce un cambio en el contenido de FSI y en su contribución relativa a la fase I-P ( $\Delta V_{IP}$ ).

La fotosíntesis en las plantas superiores con estrés por sequía es inhibida por el cierre estomático, lo que limita la difusión de  $CO_2$  hacia el cloroplasto, causando un

decremento en la concentración interna de CO<sub>2</sub> (Chaves *et al.*, 2003) lo que conlleva a una reducción de la actividad de las enzimas como la Rubisco (Meyer y Genty, 1998). El FSI es una fuente potencial de radicales oxígeno (Oukarroum *et al.*, 2009), por lo que una reducción en la actividad enzimática del ciclo de Calvin-Benson en condiciones de estrés por sequía puede causar un aumento en la producción del radical superóxido en el lado aceptor del FSI. Una reducción del contenido de FSI debido a y/o en respuesta al aumento en los niveles de radicales oxígeno producidos en el FSI han sido reportados para otros tipos de estrés (Dat *et al.*, 2000; Mittler, 2002). Por lo tanto, la disminución específica de la fase I-P en las plantas de *C. annuum* durante el estrés hídrico cuantificada por  $\Delta V_{IP}$  (Cuadro IV.2) sugiere un cambio (aumento) en la proporción entre el FSII y el FSI. Con los datos analizados en este trabajo, se refuerza la noción de Oukarroum *et al.* (2009) quienes sugieren que los cambios en la contribución relativa de la fase I-P pueden representar un buen parámetro para monitorear los efectos del estrés hídrico en el FSI. Esto puede ser en la forma del parámetro  $\Delta V_{IP}$  o en la forma de los parámetros  $RE_0/RC$ ,  $RE_0/ABS$  y  $RE_0/ET_0$  que son definidos en base al trabajo de Paillotin (1976).

Las eficiencias para todo el flujo de la energía en cascada desde la absorción a la reducción de los aceptores finales de electrones del FSI que afectan el comportamiento fotosintético de las plantas fueron caracterizadas de las trazas de fluorescencia y se muestran en la Figura IV.6. Allí, los parámetros de las plantas con estrés fueron normalizados respecto a las plantas testigo, de manera que si son iguales presentan un valor de uno y si son mayores o menores que las plantas testigo aumentan o disminuyen respectivamente de la unidad. A lo largo de la cascada de energía, el movimiento de energía

inicia de la absorción (ABS) seguido de la captura ( $TR_0$ ), el transporte de electrones ( $ET_0$ ) y hasta la reducción de los aceptores de electrones finales ( $RE_0$ ), por lo que el estrés hídrico ocasionó una disminución en la densidad de los centros de reacción por clorofila (RC/ABS), en la producción cuántica para el transporte de electrones ( $ET_0$ /ABS) y en la producción cuántica para la reducción de los aceptores de electrones finales ( $RE_0$ /ABS) del FSI (Fig. IV.6). De hecho, la eficiencia o probabilidad para el transporte de electrones más allá de la  $Q_A^-$  ( $ET_0$ / $TR_0$ ) y la eficiencia o probabilidad de que los acarreadores de electrones intersistemas se muevan para reducir los aceptores de electrones finales ( $RE_0$ / $ET_0$ ) fueron también reducidos en las plantas con estrés hídrico (Fig. IV.6). Así, estos parámetros revelan que varios eventos fueron afectados por el estrés hídrico en las plantas de *C. annuum* que incluyen una disminución en el transporte de electrones más allá de la  $Q_A^-$  y en la reducción de los aceptores de electrones finales en el FSI. Durante el estrés hídrico, se piensa que la principal limitación de la fotosíntesis es causada por el cierre estomático lo que ocasiona una disminución en la asimilación de  $CO_2$  (Cornic *et al.*, 1992). Sin embargo, varios parámetros JIP fueron afectados en las plantas de *C. annuum* con estrés hídrico, sugiriendo que la restricción estomática de  $CO_2$  puede no ser el único mecanismo involucrado en la reducción de la fotosíntesis durante el estrés hídrico y que muchos procesos fotosintéticos son influidos por ella (Cornic y Massacci, 1996). En conjunto, los resultados confirman que el movimiento de los acarreadores de electrones que llevan a la reducción de los aceptores de electrones finales fue afectado por el estrés hídrico lo que condujo a un decremento más pronunciado en la reducción de los aceptores de electrones finales. Se ha reportado que el estrés hídrico reduce la asimilación de  $CO_2$  lo que ocasiona una disminución en la actividad de la Rubisco en el ciclo de Calvin (Meyer y Genty, 1998; Chaves *et al.*, 2003). La transferencia de energía a los centros de reacción del FSII y FSI

resulta en el transporte de electrones a la ferredoxina y la posterior reducción del  $\text{NADP}^+$  (Lawlor y Tezara, 2009). Sin embargo conforme la  $A$  disminuye progresivamente con el déficit de agua también lo hace el consumo de NADPH (Lawlor y Tezara, 2009). Así, con el aumento del déficit de agua el transporte de electrones disminuye conforme la capacidad de sumidero decae (Lawlor y Tezara, 2009). Esto lleva a la desregulación del transporte de electrones y a un decline en el requerimiento para reducir los aceptores de electrones finales  $\text{NADP}^+$  y Fd en las hojas de *C. annuum* con estrés hídrico.

El parámetro  $\text{PI}_{\text{total}}$  resume todas las fuerzas conductoras parciales y sus efectos individuales en los parámetros que la componen como la densidad de los centros de reacción por clorofila (RC/ABS), el comportamiento debido a la eficiencia cuántica de la fotoquímica primaria [ $\phi_{\text{P}_0}/(1-\phi_{\text{P}_0})$ ], el comportamiento debido a la eficiencia cuántica de la conversión de la energía de excitación para el transporte de electrones [ $\psi_{\text{E}_0}/(1-\psi_{\text{E}_0})$ ] y el comportamiento debido a la eficiencia cuántica para la reducción de los aceptores finales [ $\delta_{\text{R}_0}/(1-\delta_{\text{R}_0})$ ]. La Figura IV.6 reveló que el  $\text{PI}_{\text{total}}$  se redujo notablemente conforme el  $\Psi_L$  disminuía por la suspensión del riego. Este hallazgo indica que el  $\text{PI}_{\text{total}}$  es un parámetro sensitivo para caracterizar, cuantificar y detectar el estrés hídrico incluso antes de la aparición de síntomas visibles en la hoja de plantas de *C. annuum*.

Un análisis más exhaustivo de las trazas OJIP reveló más información acerca de los efectos del estrés hídrico en las unidades fotosintéticas de las plantas de *C. annuum*. La forma de inducción de la curva entre los 50 y 300  $\mu\text{s}$  (banda L) es influida por la transferencia de la energía de excitación entre las unidades del FSII, comúnmente denotada

como conectividad o agrupamiento (Strasser y Stirbet, 1998). El aumento en la amplitud positiva en el  $\Psi_L$  de -1.72 MPa observado en la Figura IV.9 A y sostenido durante los primeros 4 d de riego de recuperación (Fig. IV.9 B), indica un decremento en la conectividad energética en respuesta al estrés hídrico. Se sabe que el agrupamiento es sensitivo al desapilamiento de las membranas del tilacoide inducido por ejemplo en condiciones de alta o baja salinidad (Strasser y Greppin, 1981; Strasser, 1981) y se ha demostrado la ocurrencia del desapilamiento en *Chlamydomonas reinhardtii* en respuesta a un estrés hiperosmótico (Cruz *et al.*, 2001).

El paso K es exhibido en las trazas de fluorescencia de varias plantas superiores que crecen de manera natural en ambientes cálidos y secos como lo reporta Srivastava *et al.* (1997). Se encuentra usualmente escondida en el aumento O-J, debido a que en la mayoría de las condiciones no se presenta una limitación suficientemente fuerte en el transporte de electrones a través del FSII que la vuelva visible. Sin embargo, como se muestra en la Figura IV.10 A, el estrés hídrico induce la estimulación de la banda K con una mayor amplitud conforme se da una disminución en el  $\Psi_L$  (Fig. IV.10 A). Una banda K más pronunciada puede ser explicada por un desbalance dentro del FSII entre los electrones que dejan los centros de reacción en el lado aceptor de electrones y los electrones donados por el lado donador (Strasser, 1997). Esto ha sido asociado a una disociación del complejo productor de oxígeno (OEC) (Guissé *et al.*, 1995; De Ronde *et al.*, 2004). También se observó el mantenimiento de la banda K durante los primeros 4 d posteriores al riego de recuperación y su desaparición después de 10 d de riego (Fig. IV.10 B), momento en el que se piensa se logró la restauración y funcionamiento normal del OEC.

Los cambios en la bioquímica de la hoja resultado de la disminución de la regulación del metabolismo fotosintético pueden presentarse en respuesta a una limitación en la disponibilidad de CO<sub>2</sub> durante el estrés por sequía (Flexas *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2010). La disminución de  $A$  en las altas  $C_c$  (Fig. IV.3) las cuales fueron acompañadas con reducciones en  $V_{cmax}$  y  $J_{max}$  (Cuadro IV.1), indican una disminución en la regulación de la asimilación de CO<sub>2</sub> para ajustar la capacidad del mesófilo a la disminución en el suministro de CO<sub>2</sub> (Chaves *et al.*, 2002; Lawlor y Cornic, 2002) causada por el cierre estomático. El decremento en  $V_{cmax}$  puede ser resultado de las reducciones en la cantidad de Rubisco activa (Pena-Rojas *et al.*, 2004). La reducción en  $J_{max}$  es asociada a una regeneración limitada de la RuBP, la cual puede presentarse debido a un suministro inadecuado de ATP o NADPH o a una baja actividad enzimática del ciclo de reducción de carbono fotosintético tal como la sedoheptulosa-1,7-bifosfatasa y fructosa-1,6-bifosfatasa (Flexas *et al.*, 2004; Lawlor, 2002; Parry *et al.*, 2002). Los resultados indicaron que las plantas con estrés hídrico severo presentaron una mayor  $R_d$  (Cuadro IV.1), las cuales pueden contribuir con más CO<sub>2</sub> para la fotosíntesis y mantener así una ganancia de carbono positiva (Hu *et al.*, 2010).

#### IV.7. Conclusiones

En conclusión, los resultados indican que el estrés hídrico en plantas de *C. annuum* inicialmente limitan la fotosíntesis mediante el cierre estomático, lo que minimiza la pérdida de agua por transpiración pero a su vez restringe la disponibilidad de CO<sub>2</sub> en los sitios de carboxilación y conforme la duración y severidad del estrés aumenta, origina que

la fotosíntesis sea inhibida por limitaciones no estomáticas asociadas a cambios en la actividad enzimática de la Rubisco y del transporte de electrones para la regeneración del sustrato ribulosa 1,5 bifosfato (RuBP). Al nivel del FSII se genera una disminución en la regulación con inactivación de los centros de reacción del FSII, una pérdida en la conectividad energética entre las unidades del FSII (aumento de la fluorescencia en los primeros 300  $\mu$ s, banda-L), el desarrollo de limitaciones en el lado donador de electrones del FSII (aumento de la fluorescencia durante los primeros 2 ms, banda-K), un aumento en la constante de desexcitación no fotoquímica y una desconexión progresiva de los dos fotosistemas. Los resultados muestran que el estrés hídrico deteriora toda la cadena de transporte de electrones fotosintética desde el lado donador del FSII hasta la reducción de los aceptores finales del FSI e incluye la inactivación de los centros de reacción del FSII, una disminución en el transporte de electrones más allá de la  $Q_A^-$ , un decremento en el tamaño del almacén de los aceptores de electrones finales y una disminución en la reducción de los aceptores de electrones finales en el FSI, lo que puede estar asociado a la disminución en las tasas de asimilación de  $CO_2$ . Además, los resultados presentados en el Cuadro IV.2 y Fig. IV.7 confirman la observación de Oukarroum *et al.* (2009) de que el estrés por sequía causa una pérdida de FSI (detectada como una reducción en  $\Delta V_{IP}$ ). Finalmente, se demuestra que las mediciones de las trazas OJIP y su análisis utilizando la prueba JIP pueden ser utilizadas como herramientas para la detección del potencial de un cultivo para responder y recuperarse del estrés hídrico.

## **V. Relaciones hídricas, fotosíntesis y crecimiento de plántulas de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck (Agavaceae) con déficit de humedad en el suelo**

### **V.1. Resumen**

El presente estudio fue realizado en plantas de *Agave salmiana* con suspensión de riego para inducir estrés hídrico, seguida de riego de recuperación. El objetivo fue investigar si el proceso de fotosíntesis es regulado durante un estrés hídrico y en la recuperación. En particular, se evaluaron los cambios en las relaciones hídricas de las plantas, regulación de la fotoquímica del FSII, actividad fotosintética, disipación de la energía, intercambio de gases, contenido de clorofila y acumulación de biomasa seca. El contenido relativo de agua (RWC) y el potencial de agua de la hoja ( $\Psi_L$ ) alcanzó valores de 39.6% y -1.1 MPa respectivamente durante el periodo de estrés, los cuales se recuperaron posteriormente al riego (período de recuperación). Después de 30 d de suspensión del riego se inhibió el intercambio de gases nocturno y disminuyó la acumulación de ácido málico. El estrés hídrico tuvo un efecto directo en la fotoquímica del FSII en hojas adaptadas a la luz, evidenciado por una disminución en la eficiencia actual del FSII ( $\Phi_{FSII}$ ) y en la tasa de transporte de electrones fotosintético aparente (ETR). El estrés hídrico aumentó la actividad de disipación de la energía de las hojas, denotado por cambios en el coeficiente de extinción no fotoquímico (NPQ). El análisis de las trazas OJIP reveló la aparición de una banda L y K lo que sugiere una pérdida en la conectividad energética entre las unidades del FSII e inhibición de complejo productor de oxígeno respectivamente. El abatimiento de la actividad fotoquímica ocurrió principalmente a través de la inactivación de los centros de reacción del FSII (transformación a pozas de calor) y por un aumento en el tamaño funcional de la antena. La producción cuántica máxima de la fotoquímica primaria ( $\phi_{P_0} = F_v/F_m$ ) disminuyó después de 30 d de suspensión del riego lo que sugiere un estrés hídrico severo y una fotoinhibición. Sin embargo, el contenido de clorofila *a* y *b* permaneció estable durante el estrés. Las variables anteriores mostraron una recuperación gradual después del riego. Los resultados sugieren que la disipación térmica del exceso de energía puede ser un mecanismo de aclimatación importante para proteger el aparato fotosintético y en conjunto con las características anteriores le permiten a las plántulas de *A. salmiana* no solo sobrevivir durante el desarrollo del estrés sino que le ayudan a preservar la integridad

del aparato fotosintético y su eficiente recuperación posterior al riego. No obstante, esto puede ser insuficiente para el establecimiento exitoso en campo de plántulas pequeñas y jóvenes en áreas semiáridas y áridas donde enfrentan una combinación de sequía, alta luminosidad y altas temperaturas.

## V.2. Abstract

This study was performed with *A. salmiana* plants with water-withholding to induce water stress, followed by re-watering to induce recovery. The aim was to investigate how photosynthesis is regulated during stress and recovery. In particular, changes in water relations, regulation of photosystem II photochemistry, photosynthetic activity, energy dissipation activity, gas exchange, titratable acidity, chlorophyll content and dry biomass accumulation were assessed. Leaf relative water content (RWC) and leaf water potential ( $\Psi_L$ ) decreased until 39.6% and -1.1 MPa respectively during water stress and they were recovered after irrigation. Withholding water inhibited night-time gas exchange and lowered malic acid accumulation after 30 d. There were a direct effect on PSII photochemistry in light-adapted leaves; this was shown by the decrease in both the actual PSII efficiency ( $\Phi_{PSII}$ ) and the maximum photosynthetic electron transport rate (ETR). Water stress increased the capacity of energy dissipation of leaves, judging from the changes in the non-photochemical quenching coefficient (NPQ). Analysis of OJIP transients revealed the appearance of an L and K-band suggesting both a lost on the energetic connectivity between PSII units and the inhibition of the oxygen-evolving complex respectively. Down-regulation of photochemical activity occurred predominantly through both inactivation of PSII reaction centers (transformation to heat sinks) and to an increase in the functional antenna size. Maximum quantum yield of primary photochemistry ( $\phi_{P_0} = F_v/F_m$ ) decreased only after 30 d of withholding water suggesting severe water stress and photoinhibition. However, chlorophyll *a* and *b* content were almost stable regardless of water stress. The above parameters showed a slow recovery after re-watering. The results suggest that thermal dissipation of excess energy may be an important adaptive mechanism to protect the photosynthetic apparatus from photodamage and

together with the above characteristics enabled *A. salmiana* seedlings not only to survive during aggravating water stress but also help to preserve the integrity of the photosynthetic apparatus and recovery after re-watering. However, this would be insufficient for successful establishment of small and young *A. salmiana* plants growing in arid and semi-arid areas in the field where they have to face altogether water stress, high light intensities and high temperature combination.

### **V.3. Introducción**

Existen evidencias que permiten suponer que las concentraciones atmosféricas de CO<sub>2</sub> aumentarán de manera estable y significativa a nivel global (IPCC, 2007), por lo que el aumento en la explotación de fuentes de energía renovables es probable que origine un aumento en la contribución hacia la mitigación del cambio climático y a la vez se mejore la seguridad energética (Oliver *et al.*, 2009). Una fuente de energía renovable que tiene mucho que ofrecer es la producción de biomasa para biocombustibles, por lo que la biomasa de plantas que crecen en zonas semiáridas o áridas puede ser una respuesta sostenible al aumento de la demanda de combustibles renovables sin entrar en conflicto con la producción de alimentos (Davis *et al.*, 2010). Las plantas que llevan a cabo el Metabolismo Ácido de Crasuláceas (MAC) presentan requerimientos bajos de agua y son productivas en regiones áridas y semiáridas debido a que asimilan carbono en la noche; -esto permite que la pérdida de agua por evapotranspiración sea baja y la eficiencia en el uso del agua sea alta (Nobel, 1994). Algunas de estas especies han sido identificadas recientemente como cultivos potenciales para la producción de bioenergía (Smith, 2008; Borland *et al.*, 2009).

El género *Agave* contiene cerca de 140 especies nativas de América, principalmente en Mesoamérica (Gentry, 1982) y está compuesto exclusivamente de plantas MAC obligadas (Davis *et al.*, 2010). Cerca del 75% de éstas especies viven en México y 74% de ellas son endémicas de este país (García, 1995; Martínez-Palacios *et al.*, 1999). La mayor diversidad se encuentra en la Planicie Central Mexicana (Gómez-Pompa, 1963; Saluson, 2000). De hecho, los magueyes secundan al maíz en el desarrollo de la agricultura en Mesoamérica (García-Moya *et al.*, 2010). Ellos son utilizados para elaborar bebidas (Colunga-García y Zizumbo-Villareal, 2007), como forraje (Zamudio *et al.*, 2009), en la obtención de fibras (Nobel, 1990), como plantas ornamentales y en la estabilización del suelo para prevenir la desertificación (Gentry, 1982; Nobel, 2010). Además, pueden remover metales pesados de las soluciones acuosas, como las que se presentan alrededor de las minas (Romero *et al.*, 2006, 2007). Desde la época precolombina, se obtienen bebidas a partir de los tallos de varias especies de maguey, como aguamiel (agua dulce), pulque (producto fermentado) y los destilados mezcal y tequila (Gentry, 1982; Nobel, 2010). Actualmente, la superficie cultivada de *Agave* en el mundo supera las 500 000 ha (Nobel *et al.*, 2002), principalmente para fibra y forraje, pero también para la producción de bebidas alcohólicas, como tequila (producido de la doble destilación de azúcares fermentados de los tallos de *A. tequilana*) y mezcal (una bebida destilada de alrededor de 10 diferentes especies de *Agave*). Particularmente, los tallos de *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck son cocinados y fermentados para producir mezcal, mientras que las hojas son utilizadas para alimentar a los rumiantes (Zamudio *et al.*, 2009). También, de *A. salmiana* se obtiene el aguamiel, que es tradicionalmente utilizado para preparar pulque. Recientemente, los carbohidratos de los tallos de *Agave* y la lignocelulosa de sus hojas han sido reconocidos como fuentes potenciales de biocombustibles (Borland *et al.*, 2009; García-Moya *et al.*,

2010) y son sobresalientes porque prosperan en condiciones que son inadecuadas para los principales cultivos alimenticios y pastos (Davis *et al.*, 2010). Además, *A. salmiana* con riego adecuado presenta una productividad de 42 Mg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (Nobel *et al.*, 1992), lo que excede la producción de maíz, soya, sorgo y trigo con manejo intensivo (Davis *et al.*, 2010). Incluso sin riego los rendimientos de *A. salmiana* pueden alcanzar de 25 a 26 Mg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en condiciones semiáridas en el oeste central de México (Nobel, 1991). Así, grandes comunidades de plantas MAC ofrecen un gran potencial como sistemas de requerimientos bajos para el secuestro de CO<sub>2</sub> atmosférico en hábitats áridos. Sin embargo, la productividad de la planta representa los efectos acumulados e integrados del potencial hídrico del suelo, la temperatura y el flujo de fotones fotosintéticos (FFF), dado que se relacionan con la toma neta de CO<sub>2</sub> y el almacenamiento de carbono (Nobel, 1988). En México, las proyecciones de los “Modelos de Circulación General Acoplados” indican un decremento de la precipitación en la mayor parte del territorio (Montero y Pérez, 2008), lo que puede provocar escasez de agua, resultado de la insuficiente precipitación y periodos de estrés hídrico o sequía, de distinta magnitud y duración. Particularmente, el estrés hídrico es uno de los principales factores que limitan la fotosíntesis y la respiración, y en consecuencia el crecimiento de la planta (Flexas *et al.*, 2006).

Se ha reconocido ampliamente que la succulencia juega un papel importante en las relaciones hídricas de varias especies de plantas de ambientes áridos, ya que representa una fuente de agua durante los periodos en que ésta no se encuentra disponible en el suelo (Schulte, 2009). De esta manera, las plantas suculentas MAC almacenan cantidades apreciables de agua en tejidos especializados de sus hojas y tallos y el agua es transportada

desde esos tejidos de almacenamiento a los tejidos fotosintéticos (clorenquima) -y permitir la fijación continua de CO<sub>2</sub> (Andrade *et al.*, 2009). Un estudio en *Agave deserti* mostró que el agua almacenada le permitió mantener la turgencia en el clorenquima después de ocho meses de sequía, lo que originó la pérdida de cerca de la mitad del agua foliar total (Schulte y Nobel, 1989). Sin embargo, dado que muchas especies MAC tienen tasas de crecimiento relativamente bajas, también tienen capacidad de almacenamiento de agua relativamente pequeña durante la primera temporada de crecimiento (Jordan y Nobel, 1979; 1981). Lo anterior expone a las plántulas a condiciones de estrés hídrico durante periodos prolongados por déficit de humedad en el suelo durante la fase de establecimiento posterior a la germinación. A su vez, la limitación del crecimiento en las plantas por disponibilidad limitada de agua es principalmente debida a las reducciones en el balance de carbono vegetal (Flexas *et al.*, 2006), el cual es dependiente en gran parte de la fotosíntesis. En plantas MAC el estrés hídrico conduce al cierre de estomas y disminución en la fluctuación de los ácidos orgánicos, lo que resulta en una pérdida de la asimilación fotosintética de CO<sub>2</sub> (Hanscom y Ting, 1978). Una consecuencia de la limitación difusiva por el estrés hídrico en la fotosíntesis es que las plantas MAC pueden estar expuestas a un exceso de la energía de excitación, lo que puede ocasionar fotoinhibición si el exceso de la energía de excitación no es disipada de manera segura (Lu *et al.*, 2003). En hojas de *Kalanchoe daigremontiana* adaptadas a la oscuridad, una planta MAC, el estrés hídrico no tuvo efecto directo en la fotoquímica primaria del fotosistema II (FSII); sin embargo, la fotoquímica del FSII en las hojas adaptadas a la luz sí fue modificada por el déficit hídrico (Lu *et al.*, 2003), mediante la reducción de la eficiencia real del FSII ( $\Phi_{PSII}$ ), la eficiencia para la captura de energía de excitación por los centros abiertos del FSII ( $F_v'/F_m'$ ) y la extinción fotoquímica ( $q_P$ ), así

como -el aumento significativo en la extinción no fotoquímica (NPQ). Sin embargo, la respuesta de la fotosíntesis en las plantas MAC a las condiciones de estrés hídrico depende de la especie (Hanscom and Ting, 1978). Además, se ha sugerido que concentraciones altas de CO<sub>2</sub> en los espacios aéreos internos de las plantas MAC, durante la fase III del metabolismo MAC, suprime la actividad oxigenasa de la Rubisco y por lo tanto la fotorespiración; por lo que, el trabajo fotoquímico en condiciones de saturación de CO<sub>2</sub> debería prevenir la energización excesiva del aparato fotosintético y suprimir así la fotoinhibición y el estrés oxidativo (Luttge, 2004). Sin embargo, la fotorespiración, fotoinhibición y el estrés oxidativo se presentan en las plantas MAC en la luz, no solo en la fase IV, cuando operan como plantas C<sub>3</sub>, sino también en la fase III con altas concentraciones internas de CO<sub>2</sub> (Luttge, 2004). El dogma aceptado estipula que la ruta MAC es un mecanismo de concentración de carbono y que la fotorespiración debe ser un proceso metabólico mínimo. Sin embargo, las características morfológicas de las hojas suculentas requeridas para llevar a cabo el MAC conducen a presiones parciales bajas de CO<sub>2</sub> dentro de la hoja, lo que aumenta la probabilidad de la fotorespiración en el transcurso del día (Borland *et al.*, 2000). Es claro que la fotorespiración sí se presenta en plantas MAC, a menudo a tasas substanciales altas y debe ser significativa en plantas MAC-ralentizadas (idling en inglés) en condiciones de sequía. Por lo tanto, los cambios en la fotoquímica del FSII, la fotoinhibición, la fotoprotección y la fotorespiración por el déficit hídrico en distintas plantas MAC deben continuar estudiándose, ya que es imperativo aumentar el conocimiento de las bases fisiológicas de la regulación de la fotosíntesis en condiciones de déficit hídrico. Lo anterior podría permitirnos mejorar la producción de las plantas en regiones áridas y semiáridas y realizar inferencias acerca de su potencial en la

captura y secuestro de carbono en condiciones de estrés hídrico, que son pasos iniciales y cruciales para usarlas como biocombustibles.

Así, los objetivos de este estudio fueron: (1) analizar en *A. salmiana* cómo se regula la fotosíntesis por restricción de diferentes procesos fisiológicos durante el desarrollo del estrés hídrico y durante la recuperación por riego, (2) evaluar el efecto del estrés hídrico en la activación de los mecanismos de regulación fotoquímicos y no fotoquímicos del maguey y (3) evaluar si éste predispone las plántulas a la fotoinhibición. Las hipótesis planteadas fueron: (i) durante el estrés hídrico las variaciones en las propiedades fotoquímicas de la hoja de maguey tienen un papel importante en el ajuste de la limitación fotosintética, (ii) las plantas de maguey han desarrollado mecanismos de regulación fotoquímicos y no fotoquímicos que están activos o son activados en dependencia de los requerimientos de optimización de la distribución de energía para la fotosíntesis y así evitan la sobreenergización del metabolismo fotosintético y (iii) la recuperación de la fotosíntesis después del riego de recuperación depende de la capacidad de recuperación de las limitaciones difusivas y fotoquímicas de la hoja.

## **V.4. Materiales y Métodos**

### *V.4.1. Material vegetal y tratamientos*

Semillas de *A. salmiana* fueron recolectadas de inflorescencias completas en San Lorenzo Nenamicoyan, Estado de México (99° 26'O, 19° 52'N, elevación 2,562 msnm) durante el 2009. En el laboratorio, las semillas fueron lavadas con agua y sumergidas en

una solución comercial de hipoclorito de sodio (1% v/v) para su esterilización superficial. Posteriormente las semillas fueron secadas con toallas de papel y almacenadas en la oscuridad a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) hasta su utilización. Las semillas fueron germinadas en charolas germinadoras con turba como sustrato, trasplantadas a contenedores de 250 mL con suelo, éstos fueron colocadas en una cámara de crecimiento con ambiente semi-controlado (Thermo Scientific, USA), con fotoperiodo de 12 h y  $382 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de radiación fotosintéticamente activa (PAR) al nivel de las plantas. La humedad relativa varió en promedio entre 40 y 50%. Una solución de Ultrasol Multipropósito 18-18-18 más elementos menores (SQM, Chile) fue aplicada diariamente con el agua de riego hasta que las plántulas tenían 1 año de edad. En ese momento –se formaron dos grupos de plantas, -uno representó el tratamiento con riego (testigo) y el otro el tratamiento con estrés hídrico. Las plantas testigo fueron regadas a capacidad de campo cada tercer día, mientras que al otro grupo se le suspendió el riego. Las mediciones fueron realizadas cada dos días para obtener un gradiente de distintas situaciones de estrés por sequía. Después de 115 d sin riego las plantas fueron regadas nuevamente a capacidad de campo y la recuperación fue seguida por 28 d más. El estudio se llevó a cabo bajo un diseño completamente al azar.

#### *V.4.2. Evaluación del estado hídrico del suelo*

El contenido volumétrico de agua del suelo ( $\theta_v$ ) se midió en los primeros 8 cm del sustrato con un reflectómetro de tiempo HH2 moisture Meter adjunto a un sensor WET (Delta-T Devices). Previamente, se determinaron en el laboratorio los niveles del  $\theta_v$  entre capacidad de campo y 5% de humedad mediante la adición de volúmenes conocidos de

agua a volúmenes conocidos de sustrato seco y en cada uno se midió la constante dieléctrica aparente con el reflectómetro de tiempo para obtener la curva de calibración específica para el suelo utilizado (Anexo A2).

#### V.4.3. Estado hídrico de la planta

El potencial de agua de la hoja ( $\Psi_L$ ) se midió en discos foliares de 0.5 cm de diámetro que fueron colocados en cámaras C-52 Sample Chambers (Wescor Inc., Utah, USA) y equilibradas por 2 h a temperatura constante mediante la técnica de punto de rocío con un HR 33 Dewpoint Microvoltmeter (Wescor Inc., Utah, USA). Por otra parte, se midió el contenido relativo de agua (RWC) cada 2 semanas de acuerdo con lo descrito por Beadle *et al.* (1993); para esto, se obtuvo la biomasa fresca ( $W_f$ ) de discos foliares de 2 cm<sup>2</sup> en 5 plántulas por tratamiento, se colocaron en 20 mL de agua destilada durante 24 h, se obtuvo el peso de la biomasa turgente ( $W_t$ ), después se secaron en una estufa a 70 °C y se registró el peso de la biomasa seca ( $W_d$ ). El contenido relativo de agua se calculó con la siguiente ecuación:

$$RWC (\%) = \left[ \frac{(W_f - W_d)}{(W_t - W_d)} \right] 100$$

#### V.4.4. Intercambio de gases

Se midió el intercambio de gases cada 4 h durante el transcurso del día en cuatro repeticiones por tratamiento con un IRGA portátil (LI-6400XT, Li-Cor, Nebraska, USA) adjunto a la cámara ‘Sun and Sky’. La luz incidente fue registrada como la intensidad luminosa dentro de la cámara al nivel de la hoja. La temperatura de la hoja estuvo máximo

1 °C por encima del ambiente y no excedió los 30 °C. El CO<sub>2</sub> dentro del sistema fue suministrado con cartuchos de CO<sub>2</sub> y mantenido a una concentración de 370 μmol mol<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> y un flujo de 50 mL min<sup>-1</sup>.

#### *V.4.5. Análisis de los datos de fluorescencia de clorofila y ecuaciones de la prueba JIP*

El aumento rápido de la fluorescencia de clorofila *a* ó trazas OJIP (50 μs a 1 s) fueron medidas con un fluorómetro PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments Ltd, King's Lynn, Norfolk, UK). Se estipula que O es el nivel de fluorescencia inicial (50 μs), J (2 ms) e I (30 ms) son niveles intermedios y P (500 ms a 1 s) es el nivel máximo (Strasser *et al.*, 1995). Las trazas se obtuvieron al exponer (1.0 s) las hojas a un haz de luz roja (650 nm) de 3200 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, generado con seis diodos emisores, enfocado en un punto de 5 mm de diámetro. Los siguientes parámetros fueron calculados y se refieren al tiempo 0 (inicio de la inducción de la fluorescencia, ver Anexo A1): (a) los flujos de energía específica por centro de reacción (RC) para la absorción (ABS/RC), captura (TR<sub>0</sub>/RC), transporte de electrones (ET<sub>0</sub>/RC) y reducción de los aceptores finales en el lado aceptor del FSI (RE<sub>0</sub>/RC); (b) las proporciones de flujo o producciones, por ejemplo, la producción cuántica máxima de la fotoquímica primaria ( $\phi_{P_0} = 1 - (F_0/F_M) = F_V/F_M$ ).  $\phi_{P_0}$  corresponde a la eficiencia con la cual un fotón absorbido puede ser capturado por los centros de reacción del FSII (TR<sub>0</sub>/ABS). Este ha sido frecuentemente utilizado como una medida de la eficiencia máxima de la fotoquímica del FSII (Baker, 1991; Krause y Weis, 1991). La probabilidad de que un excitón capturado mueva un electrón hacia la cadena del transporte de electrones mas allá de la Q<sub>A</sub><sup>-</sup> ( $\psi_{E_0} = ET_0/TR_0$ ), la producción

cuántica del transporte de electrones ( $\varphi_{E_0} = ET_0/ABS$ ), la producción cuántica para la reducción de los aceptores finales del FSI por fotón absorbido ( $\varphi_{R_0} = RE_0/ABS$ ) y la eficiencia con la cual un electrón puede moverse de los aceptores de electrones intersistemas reducidos hacia los aceptores de electrones finales del FSI ( $\delta_{R_0} = RE_0/ET_0$ ); (c) el índice de desempeño ( $PI_{ABS}$ ) es uno de los parámetros de la fluorescencia de clorofila que provee información útil y cuantitativa acerca del estado de las plantas y su vitalidad. La expresión para el índice de desempeño es derivada en analogía a la ecuación de Nernst que es utilizada para determinar el potencial redox de un sistema:

$$PI_{ABS} = \left[ \frac{\gamma_o}{1 - \gamma_o} \right] \left[ \frac{\varphi_{P_o}}{1 - \varphi_{P_o}} \right] \left[ \frac{\psi_o}{1 - \psi_o} \right]$$

El símbolo  $\gamma$  representa la tasa de clorofilas de los centros de reacción y la clorofila total del FSII. La expresión  $\gamma_o/(1 - \gamma_o)$  es proporcional a los parámetros estimados por la prueba JIP igual a la tasa de centros de reacción y la absorbancia ( $RC/ABS$ ). Por lo tanto

$$\frac{\gamma_o}{(1 - \gamma_o)} \sim \frac{Chl_{RC}}{Chl_{antena}}$$

$$\frac{RC}{ABS} = \left[ \frac{(F_{2ms} - F_{50\mu s})}{4(F_{300\mu s} - F_{50\mu s})} \right] \frac{F_V}{F_M}$$

$\Psi_o (=1 - V_j)$  es la fracción de electrones transportados más allá de la  $Q_A^-$  por excitón capturado por los centros de reacción (RC) del FSII. Este es la probabilidad de que la energía de un excitón capturado sea utilizada en el transporte de electrones más allá de la  $Q_A$ . (d) El  $PI_{total}$  es el producto del índice de comportamiento y la probabilidad de que un electrón pueda moverse de los aceptores de electrones intersistemas reducidos hacia los aceptores finales de electrones del FSI y se define como sigue (Tsimilli-Michael y Strasser, 2008):  $PI_{total} = PI_{ABS} \cdot \delta_{R_0}/(1-\delta_{R_0})$ . El índice de desempeño  $PI_{total}$  es el parámetro más

sensitivo de la prueba JIP debido a que incorpora varios parámetros que evalúan todo el proceso del transporte de electrones fotosintético a partir de las trazas de fluorescencia OJIP, por lo que cualquier cambio en las trazas OJIP es expresado en el  $PI_{total}$ , mientras que el comúnmente utilizado  $F_v/F_m$  solamente es sensitivo a la proporción ( $F_0/F_m$ ). Puede notarse que, de acuerdo a su definición, ambos el  $PI_{ABS}$  y  $PI_{total}$  son índices del desempeño fotosintético – en base a la absorción de luz.

#### *V.4.6. Curvas de respuesta a la luz y fluorescencia modulada*

Se realizaron curvas de respuesta rápida a la luz (LRC) para analizar la dinámica de la producción cuántica efectiva del FSII ( $\Phi_{FSII}$ ), del transporte lineal de electrones fotosintéticos aparente (ETR) y de la disipación térmica de la energía lumínica (extinción no fotoquímica, NPQ) en un rango de intensidades de luz. Las mediciones fueron realizadas en la quinta hoja completamente expandida utilizando un sistema de intercambio de gases abierto (LI-6400XT; LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA) con una cámara de fluorescencia integrada (fluorómetro de cámara foliar LI-6400-40; LI-COR) y software de adquisición de datos (OPEN Software versión 5.1, LI-COR) a concentraciones ambientales de  $CO_2$ , 50% de humedad relativa y temperatura de la cámara foliar de 25 °C. La hoja fue aclimatada a la oscuridad por un periodo de 20 min y se midió la producción de fluorescencia mínima ( $F_0$ ) con una luz modulada lo suficientemente baja ( $<0.1 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) para no inducir fotosíntesis y la producción de fluorescencia máxima ( $F_m$ ) fue determinada por un pulso de saturación de luz 0.8 s ( $7000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Posteriormente la hoja fue expuesta al aumento progresivo de la intensidad de luz actínica por un periodo de 60 s (en un rango de 0 a  $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) suministrada con los diodos emisores de luz (90% luz roja, 630 nm;

10% luz azul, 470 nm). En cada paso en el aumento de luz actínica se registró el valor en estado estable de la fluorescencia ( $F_s$ ) y se impuso un segundo pulso de saturación a 7000  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  para determinar el nivel de fluorescencia máxima adaptada a la luz ( $F_m'$ ). En seguida, la luz actínica fue removida y el nivel de fluorescencia mínima en el estado adaptado a la luz ( $F_o'$ ) fue determinado después de 3 s de iluminación en el rojo lejano. Se calculó la fluorescencia variable ( $F_v$ ) como ( $F_m - F_o$ ), la eficiencia de los centros del FSII [ $\Phi_{\text{FSII}}; (F_m' - F_s)/F_m'$ ], la producción cuántica de los centros abiertos del FSII con iluminación ( $F_m' - F_o'$ )/ $F_m'$ , y la extinción no fotoquímica [NPQ;  $F_m/F_m' - 1$ ] acorde a Genty *et al.* (1989). La tasa del transporte de electrones del FSII (ETR) fue calculada como  $\Phi_{\text{FSII}} \cdot f \cdot I \cdot a_{\text{leaf}}$  (Bilger y Björkman, 1990), donde  $I$  es el flujo de fotones fotosintéticamente activos (FFFA) incidente,  $f$  es el factor con valor de 0.5 que asume que ambos fotosistemas II y I son excitados igualmente por la irradianza (Ehleringer, 1981) y  $a_{\text{leaf}}$  es el factor con valor de 0.84 que considera que solo cerca del 84% de la irradianza incidente puede ser absorbida por los fotosistemas (Genty *et al.*, 1989; Rascher *et al.*, 2000). Las curvas de respuesta a la luz fueron obtenidas utilizando el programa del LI-6400XT (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA) y en cada intensidad se calculó  $\Phi_{\text{FSII}}$ , ETR y el NPQ.

Los datos de  $\Phi_{\text{FSII}}$  versus la densidad del flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) fueron ajustados matemáticamente utilizando una función exponencial de doble decaimiento mediante el programa Sigma Plot de SPSS Inc. (San Rafael, California, USA):

$$f(x) = m + ae^{-bx} + ce^{-dx}$$

Para determinar los parámetros principales de las curvas de respuesta a la luz de ETR versus DFFF los datos fueron ajustados utilizando una función exponencial simple:

$$f(x) = a(1 - e^{-bx})$$

Donde  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$ , y  $m$  son parámetros independientes. De los resultados de la segunda ecuación los puntos principales pueden ser determinados con  $a = ETR_{\max}$  y  $DFFF_{\text{sat}}$  es alcanzada a  $0.9 ETR_{\max}$ . Los parámetros fueron comparados estadísticamente utilizando el error estándar para realizar las comparaciones múltiples ( $t$ -tests), con el comando DISTR.T de Excel (Office Excel 2007, Microsoft, USA) y determinar las diferencias significativas entre los parámetros de cada tratamiento con  $\alpha=0.05$  (Motulsky y Christopoulos, 2003).

#### *V.4.7. Acidez titulable del tejido*

La acidez del tejido fue medida cada 4 h, durante 24 h con cinco repeticiones por tratamiento en las plantas utilizada para el intercambio de gases. Se obtuvo 1 cm<sup>2</sup> de muestra de tejido con un sacabocado y se colocó en un tubo Falcón con 5 mL de etanol al 80%. Los ácidos del tejido fueron extraídos calentando las muestras por 20 minutos a 65 °C en vasos de precipitado de 10 mL. Transcurrido el tiempo los vasos fueron mantenidos a temperatura ambiente durante 20 min. Después se le añadieron dos gotas de fenolftaleína y se tituló con una solución de NaOH 0.01 N hasta obtener una coloración final rosada o un pH final de 7. La acidez del tejido se expresó en unidad de área (mmol H<sup>+</sup> cm<sup>-2</sup>). Se postula que las fluctuaciones en la acidez titulable refleja la acumulación nocturna y el subsecuente consumo diurno de ácido málico (Barker y Adams, 1997).

#### *V.4.8. Contenido de clorofilas de la hoja*

La concentración de clorofilas en la hoja fueron determinadas espectrofotométricamente acorde a Porra *et al.* (1989) en seis plantas por tratamiento.

Brevemente, 1 cm<sup>2</sup> de tejido foliar se colocó en frascos de vidrio forrados con aluminio y con 5 mL de N,N-dimetilformamida (DMF). Las muestras fueron incubadas en la oscuridad a temperatura ambiente durante 72 h. Posteriormente, las absorbancias de las soluciones se midieron a 647, 664 y 750 nm en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer Lambda UV/VIS) y las ecuaciones propuestas por Porra *et al.* (1989) se utilizaron para calcular las concentraciones de clorofila *a*, *b* y la proporción *a/b*.

#### *V.4.9. Asignación de biomasa seca y crecimiento*

Al final del periodo de suspensión de riego y del de riego de recuperación, ocho plantas fueron removidas de los contenedores, lavadas cuidadosamente y divididas en hojas, tallo y raíz. El área foliar total de cada planta cosechada fue medida con integrador de área foliar óptico (Li-3100, Li Cor). Posteriormente los componentes de cada planta fueron secados separadamente hasta masa constante y se registró su peso en una balanza analítica (Scientech Inc., USA).

#### *V.4.10. Análisis estadístico*

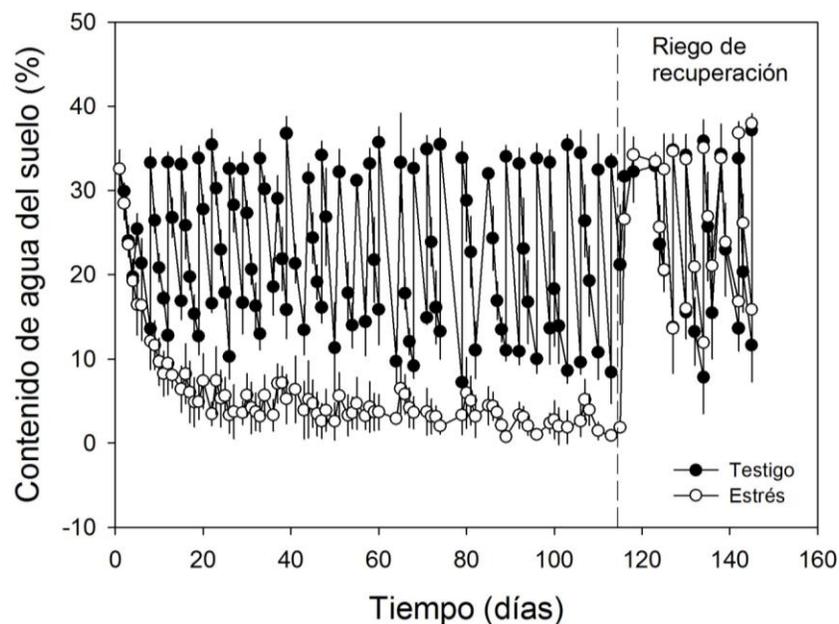
Los datos fueron analizados mediante regresión no lineal con Sigma Plot (versión 9.01; Systat Software, Inc., Point Richmond, CA, USA). Se realizaron pruebas de normalidad y pruebas de varianza constante previo al análisis estadístico mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y el rango de correlación de Spearman (Sigma Plot versión 9.01; Systat Software, Inc., Point Richmond, CA, USA), si no se cumplían los supuestos se transformaron los datos mediante la transformación de Johnson y posteriormente se realizaron los análisis. Para las variables de contenido de clorofila, área

foliar y biomasa seca de hoja, tallo y raíz se realizó un análisis de varianza factorial utilizando el procedimiento GLM de SAS versión 9.1 (SAS Institute, NC, E.U.A.) y prueba de separación de medias Tukey con  $P < 0.05$ .

## V.5. Resultados

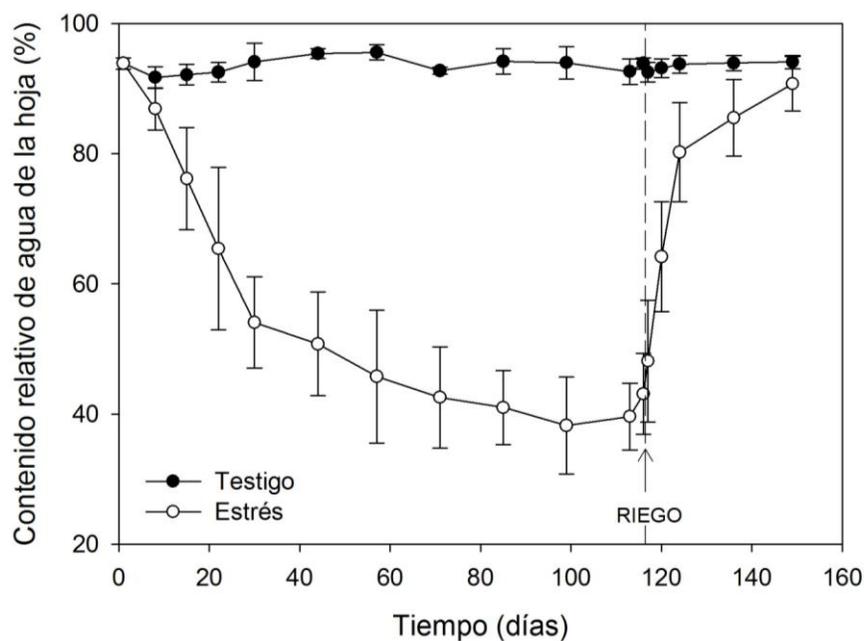
### V.5.1. Relaciones hídricas

El contenido de agua del suelo (SWC) en el tratamiento testigo fluctuó entre capacidad de campo (~35%) y hasta cerca del 10%, inmediatamente después recibía riego hasta capacidad de campo y así de manera cíclica durante todo el estudio (Fig. V.1). En las plantas con estrés después de 115 días sin riego causó una caída del SWC, manteniéndose en valores alrededor de 5% durante la mayor parte del periodo experimental antes de regresarlo a capacidad de campo (Fig. V.1).



**Figura V.1.** Dinámica del contenido de agua del suelo en plantas de *A. salmiana* con dos condiciones de riego. Los datos son el promedio  $\pm$  e.e. ( $n = 6$ ).

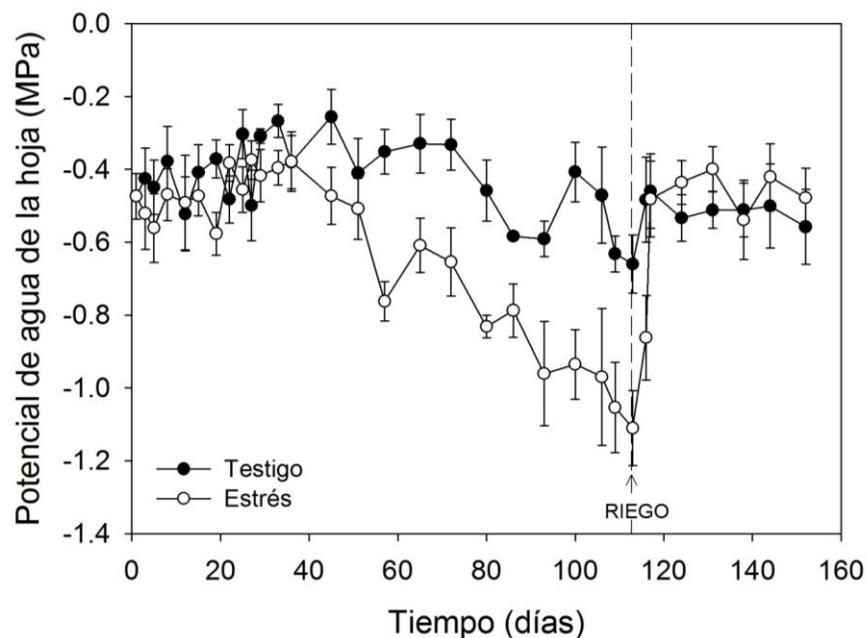
El RWC de la hoja disminuyó linealmente los primeros 30 d de suspensión del riego (Fig. V.2). Conforme el estrés hídrico continuó el RWC disminuyó de manera gradual durante 85 d más y alcanzó un valor de  $39.6 \pm 5.13\%$ . Después del primer riego de recuperación el RWC de la hoja se recuperó rápidamente y después de 30 d alcanzó valores comparables a los de las plantas testigo (Fig. V.2). Durante el periodo experimental, las plantas testigo se caracterizaron por tener valores de RWC por encima del 94% (Fig. V.2).



**Figura V.2.** Cambios en el contenido relativo de agua de la hoja de *A. salmiana* con riego y con estrés hídrico y rehidratación. Los datos son el promedio  $\pm$  e.e. ( $n = 5$ ).

El potencial de agua de la hoja ( $\Psi_L$ ) no difirió significativamente entre las plantas testigo y con estrés durante los primeros 36 d, sus valores promedio fueron  $-0.41 \pm 0.08$  y  $-0.46 \pm 0.07$  MPa, respectivamente (Fig. V.3). Después de 115 d sin agua, el  $\Psi_L$  de las plantas con estrés hídrico fue significativamente menor en comparación con las testigo, pues alcanzaron valores de  $-1.11 \pm 0.10$  y  $-0.66 \pm 0.08$  MPa respectivamente. Además, el

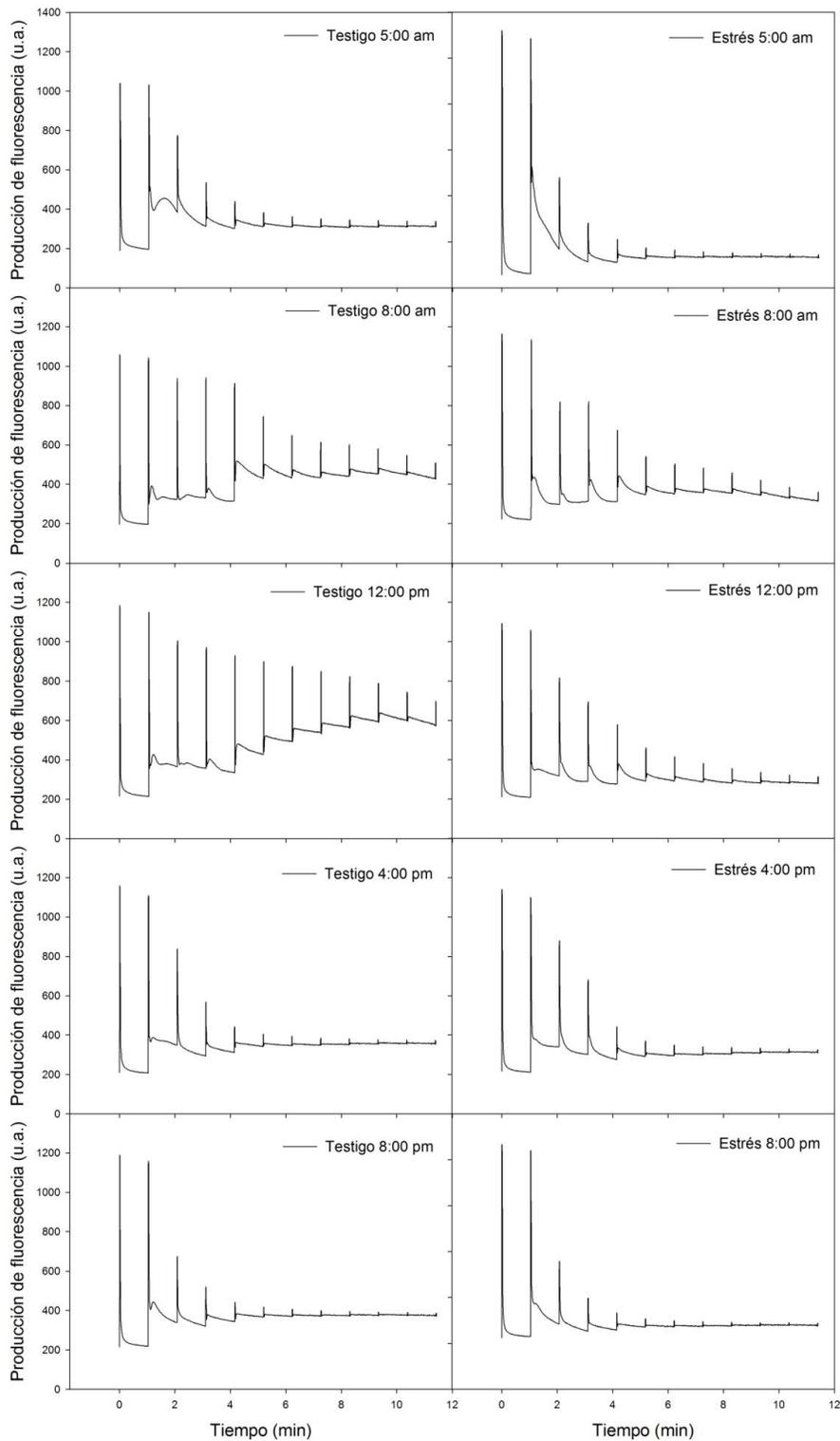
$\Psi_L$  también se recuperó rápidamente después de 4 d de riego (Fig. V.3) y alcanzó valores similares a los de las plantas testigo.



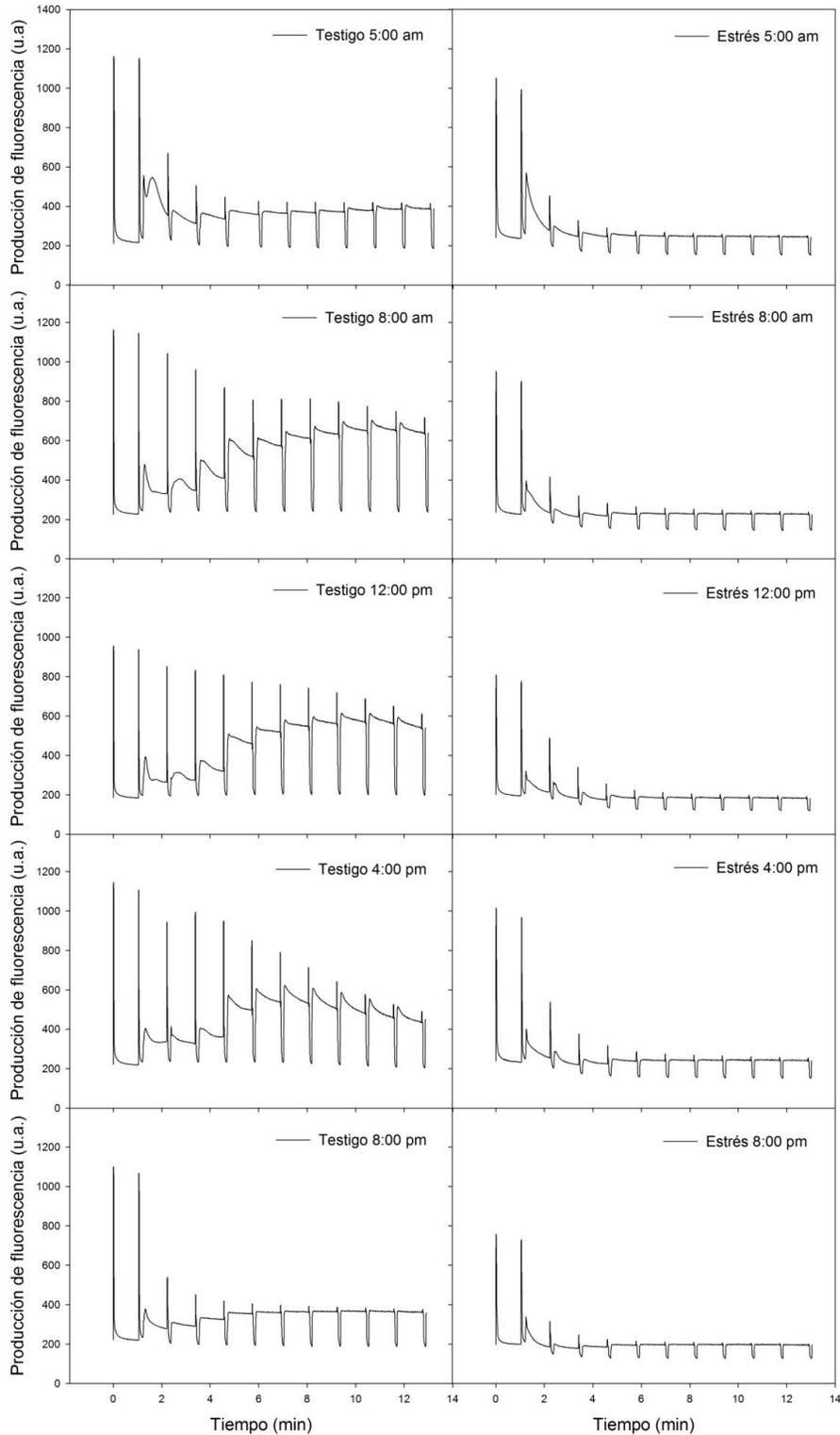
**Figura V.3.** Cambios en el potencial de agua de la hoja de *A. salmiana* con riego y con estrés hídrico y rehidratación. Los datos son el promedio  $\pm$  e.e. ( $n = 6$ ).

#### V.5.2. Fluorescencia modulada y curvas de respuesta a la luz

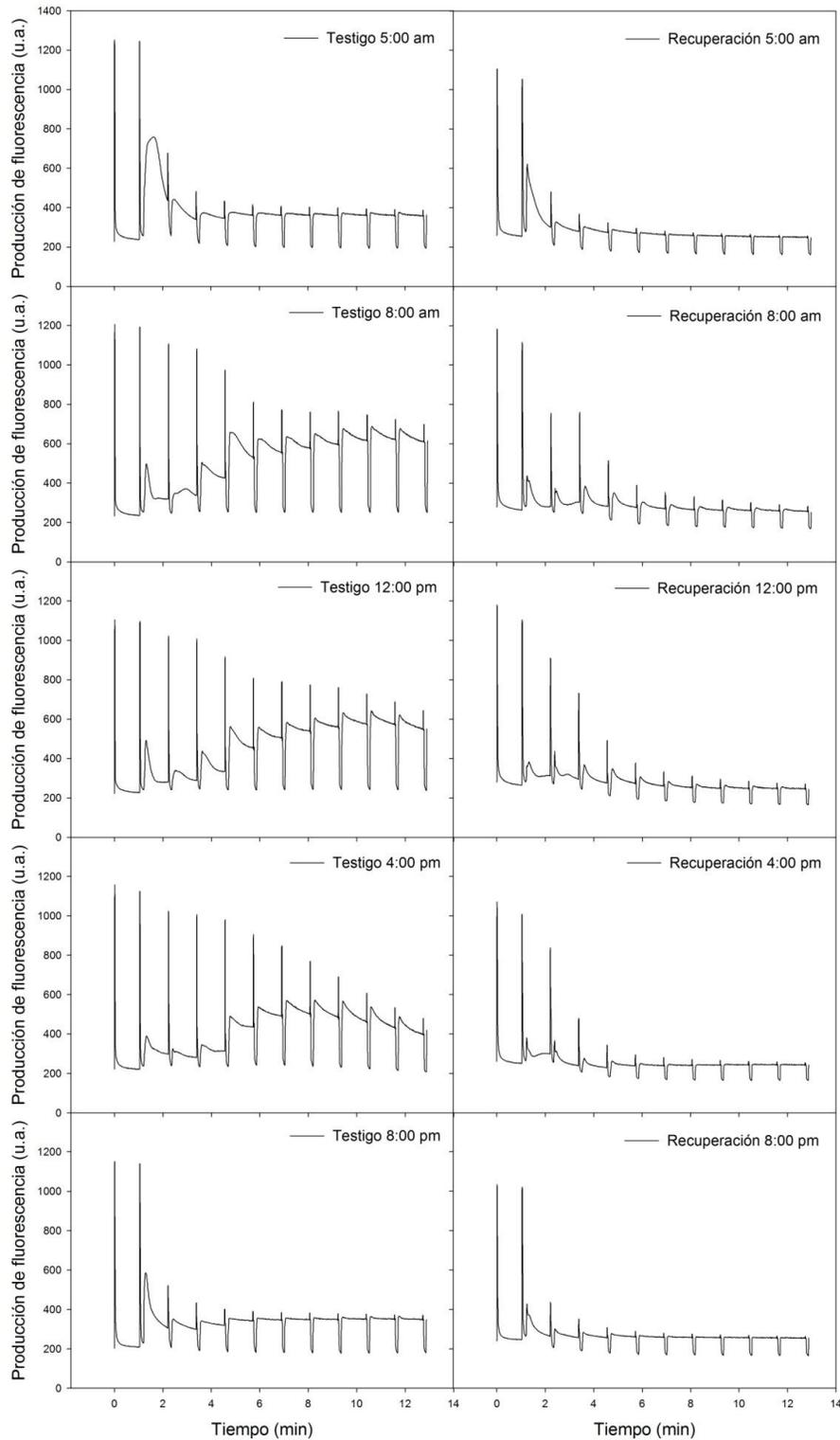
Las curvas de emisión de fluorescencia tanto a lo largo del día como entre tratamientos conforme avanzaba el nivel de estrés fueron notablemente diferentes (Fig. V.4 y V.5). Al inicio del riego de recuperación el comportamiento no cambió (Fig. V.6) y después de 21 d con riego de recuperación el comportamiento fue similar al de las plantas testigo (Fig. V.7). En las plantas testigo durante los cuatro tiempos de muestreo se observó un patrón diurno, así antes del amanecer la  $F_s$  aumentó de 230 a 400 u.a. en los cinco primeros pasos de luz actínica, mientras que a las 8:00 y 12:00 se incrementó de 230 a 600 u.a. A las 16:00 horas  $F_s$  disminuyó de 230 a 475 u.a. En la noche la  $F_s$  fue de 230 a 380 u.a., similar a la fluorescencia registrada antes del amanecer.



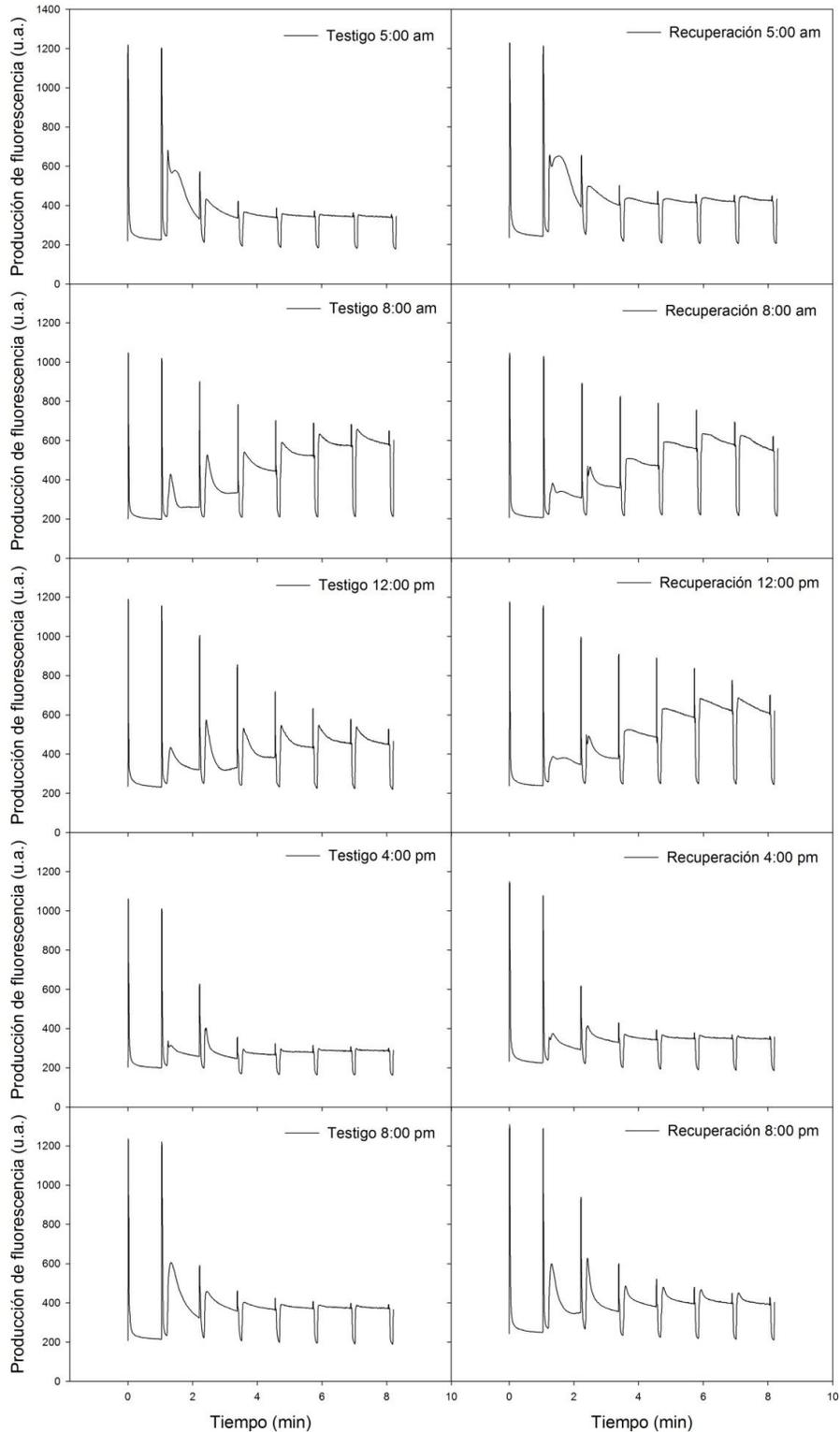
**Figura V.4.** Gráficas de la señal de fluorescencia registradas durante la realización de las curvas de respuesta rápida a la luz a cinco horas del día en hojas de *A. salmiana* con dos condiciones de riego. Cada gráfica es representativa de cuatro réplicas, con un RWC y LWP de la hoja de  $92.5 \pm 1.5 \%$  y  $-0.49 \pm 0.09$  MPa en las plantas testigo;  $65.4 \pm 12.4 \%$  y  $-0.37 \pm 0.05$  MPa en las plantas con estrés hídrico.



**Figura V.5.** Gráficas de la señal de fluorescencia registradas durante la realización de las curvas de respuesta rápida a la luz a cinco horas del día en hojas de *A. salmiana* con dos condiciones de riego. Cada gráfica es representativa de cuatro réplicas, con un RWC y LWP de la hoja de  $93.9 \pm 2.5 \%$  y  $-0.40 \pm 0.08$  MPa en las plantas testigo;  $38.2 \pm 7.44 \%$  y  $-0.93 \pm 0.09$  MPa en las plantas con estrés hídrico.



**Figura V.6.** Gráficas de la señal de fluorescencia registradas durante la realización de las curvas de respuesta rápida a la luz a cinco horas del día en hojas de *A. salmiana* con dos condiciones de riego. Cada gráfica es representativa de cuatro réplicas, con un RWC y LWP de la hoja de  $92.5 \pm 1.4 \%$  y  $-0.45 \pm 0.10$  MPa en las plantas testigo;  $48.1 \pm 9.3 \%$  y  $-0.48 \pm 0.10$  MPa en las plantas con un día de riego de recuperación.



**Figura V.7.** Gráficas de la señal de fluorescencia registradas durante la realización de las curvas de respuesta rápida a la luz a cinco horas del día en hojas de *A. salmiana* con dos condiciones de riego. Cada gráfica es representativa de cuatro réplicas, con un RWC y LWP de la hoja de  $93.9 \pm 1.1$  % y  $-0.51 \pm 0.07$  MPa en las plantas testigo;  $85.4 \pm 5.8$  % y  $-0.53 \pm 0.10$  MPa en las plantas con 21 d de riego de recuperación.

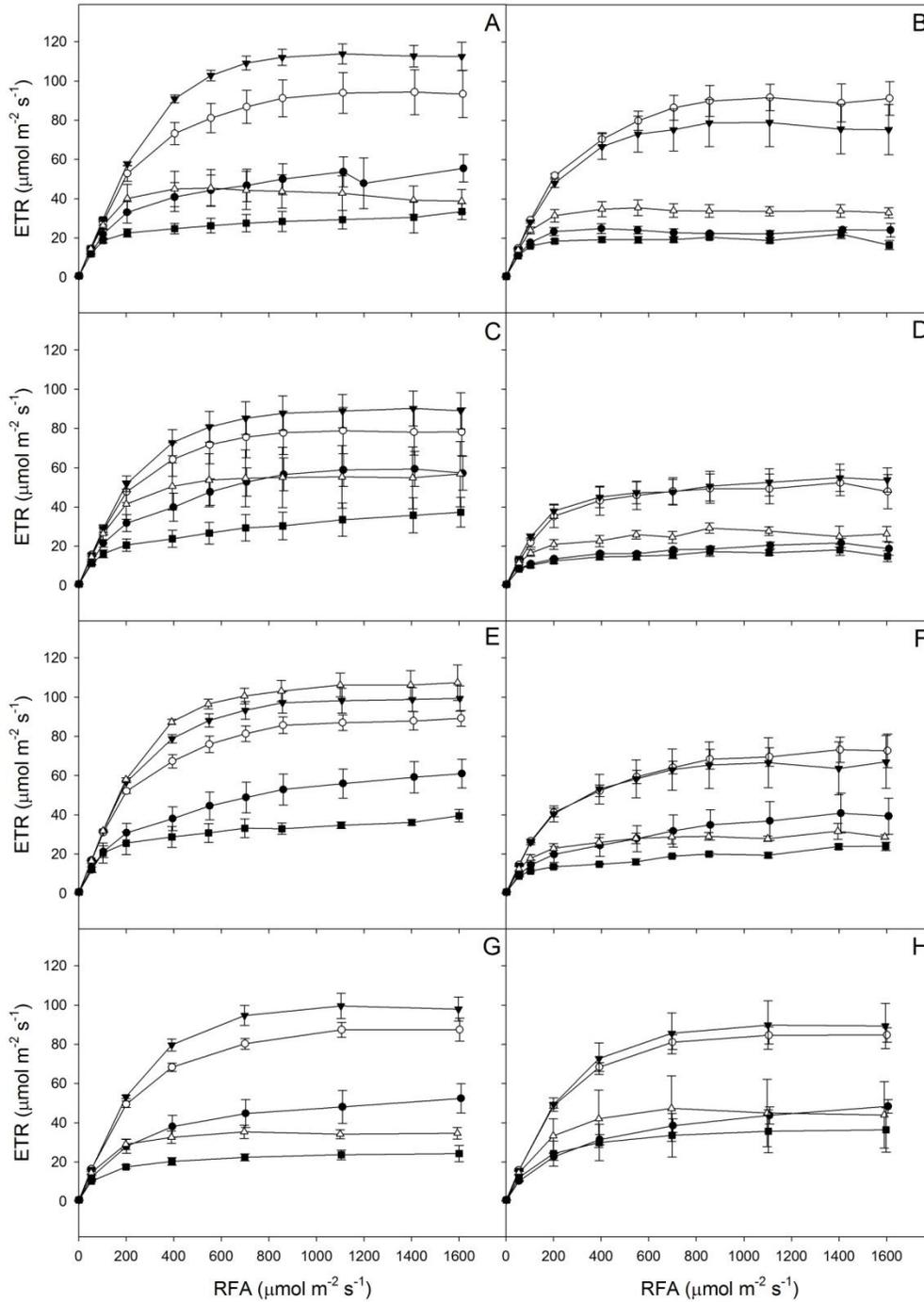
De manera muy interesante, en las plantas con estrés hídrico el patrón encontrado en las plantas testigo no se presentó y la  $F_s$  fue muy estable con valores de 350 u.a. a los 27 d de haber iniciado los tratamientos (DDIT) y de 220 u.a. a los 102 DDIT (Fig. V.4 y V.5), sin embargo, la fluorescencia durante los pulsos de saturación de luz ( $F_m'$ ) al incrementar la irradianza disminuyeron de 800 a 300 u.a. desde los 27 d de estrés hídrico (Fig. V.4) e inclusive el descenso fue más abrupto en las plantas con 102 d de estrés hídrico, con disminuciones de  $F_m'$  de 450 a 200 u.a. con el aumento de la irradianza (Fig. V.5).

Las curvas de respuesta a la luz mostraron patrones contrastantes en la tasa del transporte de electrones aparente (ETR) y en la extinción no fotoquímica (NPQ) de las plantas de *A. salmiana* tanto en los distintos tiempos de muestreo durante el día como durante el avance del estrés hídrico y se igualaron posteriormente al riego de recuperación (Fig. V.8 y V.9). La gráfica de ETR en función de la luz mostró la clásica forma de una curva de respuesta a la luz, con un aumento lineal donde la luz es limitante seguida de una asíntota donde la fotosíntesis se ve limitada (Fig. V.8). En ambos tratamientos, los menores niveles de ETR a todas las intensidades de luz se observaron temprano al amanecer y hacia la tarde e inicio de la noche (5:00 am, 4:00 pm y 8:00 pm; Fig. V.8) concomitantemente con los mayores niveles de extinción no fotoquímica (Fig. V.9). Sin embargo, en las plantas con estrés hídrico (Fig. V.9 B y D) y con solo un día de riego de recuperación (Fig. V.9 F), conforme se alcanzaron las intensidades de luz finales en los muestreos realizados a las 8:00 am y 12:00 pm, los niveles de NPQ fueron similares a los presentados al amanecer y al anochecer; contrariamente, en las plantas testigo durante las horas de descarboxilación se observaron las mayores tasas del transporte de electrones (Fig. V.8 A, C, E y G) ligada a

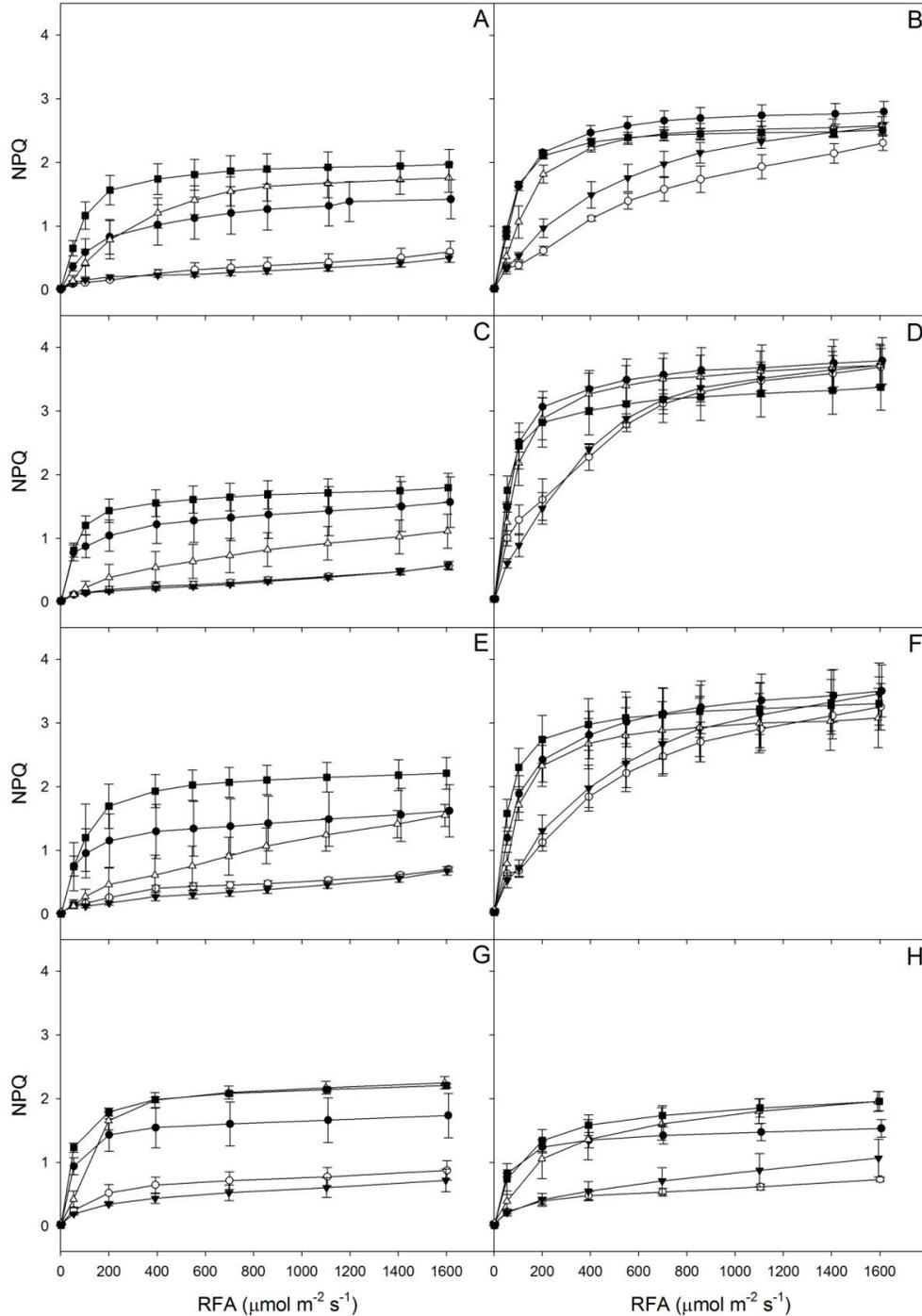
los niveles más bajos de NPQ (Fig. V.9 A, C, E y G). Finalmente, después de 21 d de riego de recuperación la ETR y NPQ fueron similares a los de las plantas testigo (Fig. V.8 y V.9 G, H).

Con el propósito de extraer los parámetros intrínsecos de la fotosíntesis conducida por la luz se graficaron los valores de  $\Delta F/F_m'$  y ETR versus la radiación fotosintéticamente activa (RFA). Todos los datos (alrededor de 130 mediciones en cuatro hojas diferentes por tratamiento) fueron agrupados en tratamiento testigo, estrés medio (27 d de suspensión de riego) estrés severo (102 d de suspensión de riego), un día de riego de recuperación y 21 d de riego de recuperación y posteriormente a los datos se les ajustaron funciones exponenciales (Fig. V.10 y V.11). Inicialmente, las plantas testigo y con estrés medio (Fig. V.10 A y B) se encontraban bastante saludables ( $\Phi_{FSII}=\Delta F/F_m'$  ca. 0.8) y solo en las plantas con estrés severo disminuyó su valor por debajo de 0.8 (Fig. V.10 D) recuperándose a niveles similares a los de las plantas testigo en los días posteriores al riego de recuperación (Fig. V.10 G y H). Una característica de este tipo de curvas es que conforme la intensidad de luz aumenta los valores de  $F_s$  y  $F_m'$  se vuelven similares, lo que origina una señal pequeña de  $\Delta F$  por lo que la  $\Phi_{FSII}$  disminuye. En las plantas con estrés hídrico medio y severo la reducción de  $F_m'$  es mayor por lo que se puede observar un aumento en el valor del parámetro de atenuación de la función, así éste tuvo un incremento del 68, 87 y 105% en las plantas con estrés hídrico medio, severo y con tan solo un día de riego de recuperación respectivamente en comparación con el testigo (Fig. V.10 A-F), alcanzando valores similares a las plantas testigo después de 21 d de riego de recuperación (Fig. V.10 G y H).

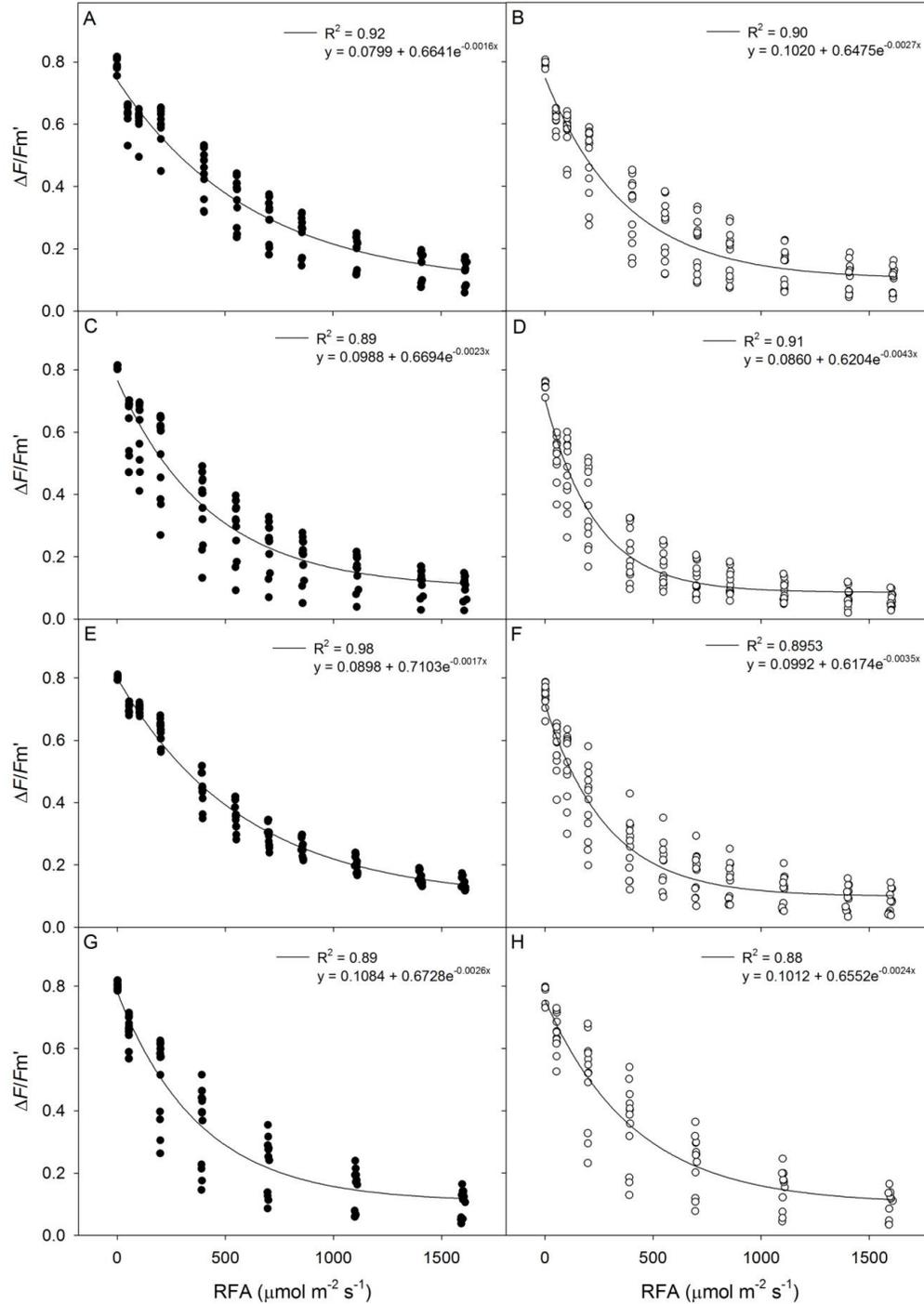
Los valores máximos de ETR a saturación de luz ( $ETR_{max}$ ) de las curvas de dependencia a la luz describen la capacidad intrínseca del aparato fotosintético y fueron probadas estadísticamente para detectar el efecto del estrés hídrico (Cuadro V.1). La  $ETR_{max}$  se redujo significativamente ( $P < 0.05$ ) durante el estrés hídrico medio y severo (Fig. V.11, Cuadro V.1), presentándose los valores menores de  $ETR_{max}$  después de 102 d de estrés (Fig. V.11 D). Un día después del riego de recuperación aún se mantuvo una disminución significativa de  $ETR_{max}$  (Fig. V.11 F; Cuadro V.1), recuperando los valores similares a los de las plantas testigo después de 21 d de riego de recuperación (Fig. V.11 G y H; Cuadro V.1). Las funciones exponenciales ajustadas que fueron utilizadas para cuantificar la reducción de  $ETR_{max}$  pueden considerarse una medida robusta contra las variaciones dentro de las mediciones individuales dado que todos los puntos son utilizados para extraer a  $ETR_{max}$ . La Figura V.11 también muestra como la medición de la ETR utilizando la fluorescencia de clorofila es influenciada por la reducción de la disponibilidad interna de carbono por el cierre estomático durante el día, señalada por la disminución en la amplitud de las curvas que fueron tomadas hacia las 01700 h, lo cual se acrecentó en las plantas con estrés hídrico medio y severo (Fig. V.11 B y D) debido a la disminución de la capacidad fotosintética impuesta por el cierre estomático incluso durante la noche.



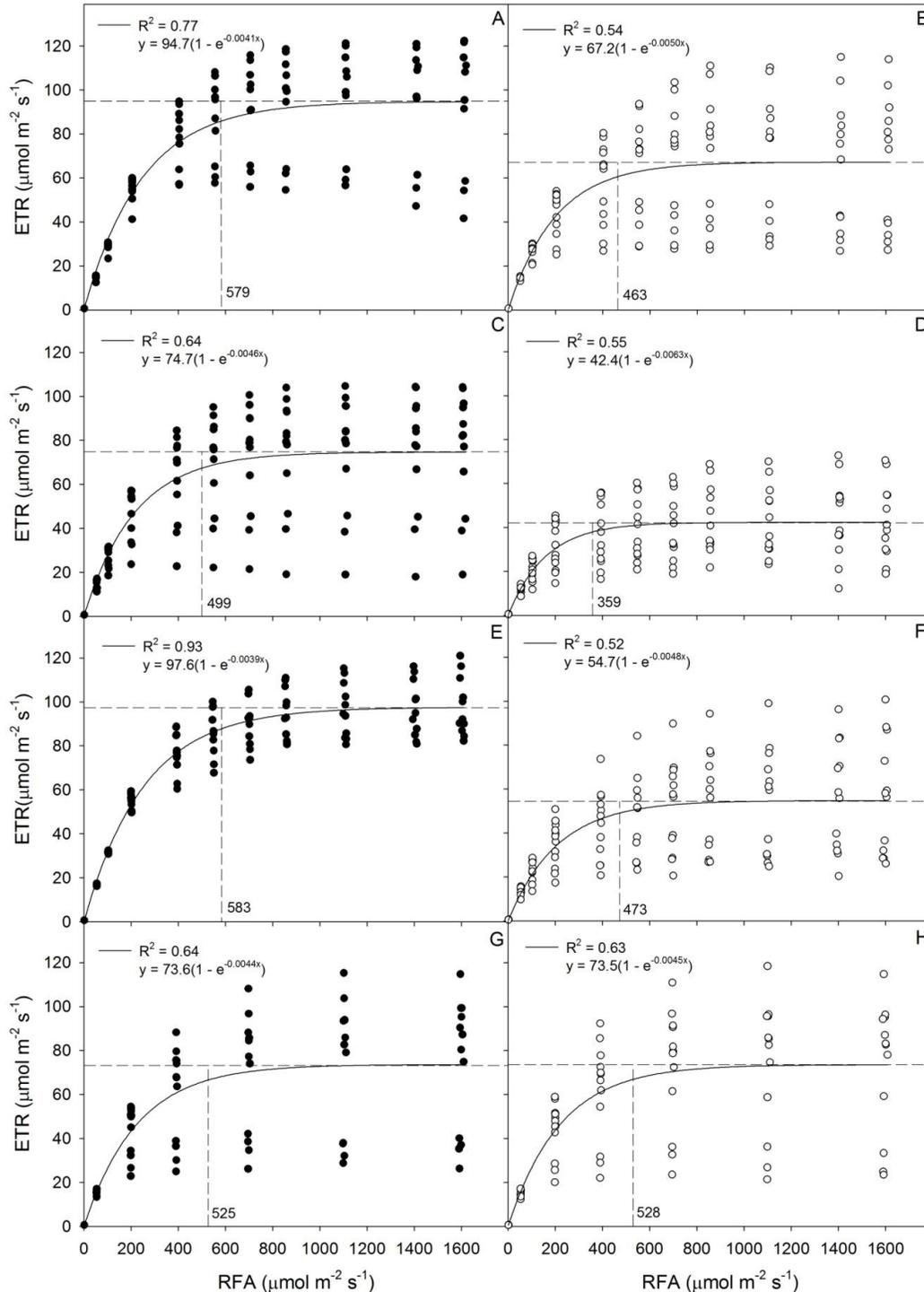
**Figura V.8.** Curvas de respuesta a la luz de la tasa aparente de transporte de electrones fotosintético (ETR) durante un ciclo diurno en plántulas de *A. salmiana* con riego y un RWC y LWP de  $93.5 \pm 1.1\%$  y  $-0.45 \pm 0.10$  MPa (A, C, E, G); estrés hídrico medio  $65.4 \pm 12.4\%$  y  $-0.37 \pm 0.05$  MPa (B); estrés hídrico severo  $38.2 \pm 7.44\%$  y  $-0.93 \pm 0.09$  MPa (D); un día de riego de recuperación  $48.1 \pm 9.3\%$  y  $-0.48 \pm 0.10$  MPa (F) y 21 días de riego de recuperación  $85.4 \pm 5.8\%$  y  $-0.53 \pm 0.10$  MPa (H). Las curvas fueron tomadas a diferentes tiempos durante el transcurso del día: 5:00 am (●), 8:00 am (○), 12:00 pm (▼), 4:00 pm (△) y 8:00 pm (■). Los datos son el promedio de cuatro repeticiones  $\pm$  e.e.



**Figura V.9.** Curvas de respuesta a la luz de la extinción no fotoquímica (NPQ) durante un ciclo diurno en plántulas de *A. salmiana* con riego y un RWC y LWP de  $93.5 \pm 1.1\%$  y  $-0.45 \pm 0.10$  MPa (A, C, E, G); estrés hídrico medio  $65.4 \pm 12.4\%$  y  $-0.37 \pm 0.05$  MPa (B); estrés hídrico severo  $38.2 \pm 7.44\%$  y  $-0.93 \pm 0.09$  MPa (D); un día de riego de recuperación  $48.1 \pm 9.3\%$  y  $-0.48 \pm 0.10$  MPa (F) y 21 días de riego de recuperación  $85.4 \pm 5.8\%$  y  $-0.53 \pm 0.10$  MPa (H). Las curvas fueron tomadas a diferentes tiempos durante el transcurso del día: 5:00 am (●), 8:00 am (○), 12:00 pm (▼), 4:00 pm (△) y 8:00 pm (■). Los datos son el promedio de cuatro repeticiones  $\pm$  e.e.



**Figura V.10.** Producción cuántica efectiva ( $\Delta F/F_m'$ ) de plantas de *A. salmiana* con riego y un RWC y LWP de  $93.5 \pm 1.1$  % y  $-0.45 \pm 0.10$  MPa (A, C, E, G); estrés hídrico medio  $65.4 \pm 12.4$  % y  $-0.37 \pm 0.05$  MPa (B); estrés hídrico severo  $38.2 \pm 7.44$  % y  $-0.93 \pm 0.09$  MPa (D); un día de riego de recuperación  $48.1 \pm 9.3$  % y  $-0.48 \pm 0.10$  MPa (F) y 21 días de riego de recuperación  $85.4 \pm 5.8$  % y  $-0.53 \pm 0.10$  MPa (H). Los datos fueron obtenidos entre las 0800 y 1800 h. Se ajustaron ecuaciones exponenciales de decaimiento individual a los datos ( $n = 130$ ).



**Figura V.11.** Tasa del transporte de electrones (ETR) de plantas de *A. salmiana* con riego y un RWC y LWP de  $93.5 \pm 1.1 \%$  y  $-0.45 \pm 0.10$  MPa (A, C, E, G); estrés hídrico medio  $65.4 \pm 12.4 \%$  y  $-0.37 \pm 0.05$  MPa (B); estrés hídrico severo  $38.2 \pm 7.44 \%$  y  $-0.93 \pm 0.09$  MPa (D); un día de riego de recuperación  $48.1 \pm 9.3 \%$  y  $-0.48 \pm 0.10$  MPa (F) y 21 días de riego de recuperación  $85.4 \pm 5.8 \%$  y  $-0.53 \pm 0.10$  MPa (H). Los datos fueron obtenidos entre las 0800 y 1800 h. Se ajustaron ecuaciones exponenciales de decaimiento individual a los datos ( $n = 130$ ).

**Cuadro V.1.** Contenido relativo de agua de la hoja (RWC), potencial de agua foliar ( $\Psi_L$ ) y tasa máxima del transporte de electrones fotosintético aparente ( $ETR_{max}$ ) en plantas de *A. salmiana* a los 27 y 102 d de suspendido el riego y después de 1 y 21 d de riego de recuperación.

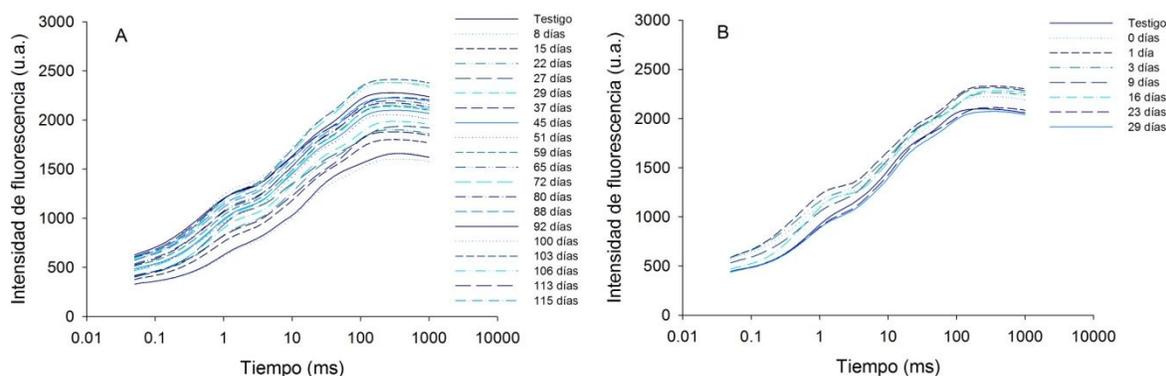
Días	Tratamiento	RWC (%)	$\Psi_L$ (MPa)	$ETR_{max}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
27	Testigo	92.5 ± 1.5	-0.49 ± 0.09	94.7 ± 2.9 a
	Estrés	65.4 ± 12.4	-0.37 ± 0.05	67.2 ± 2.8 b
102	Testigo	93.9 ± 2.5	-0.40 ± 0.08	74.7 ± 2.7 a
	Estrés	38.2 ± 7.44	-0.93 ± 0.09	42.3 ± 1.5 b
Riego de recuperación				
1	Testigo	92.5 ± 1.4	-0.45 ± 0.10	97.6 ± 1.4 a
	Recup.	48.1 ± 9.3	-0.48 ± 0.10	54.7 ± 2.4 b
21	Testigo	93.9 ± 1.1	-0.51 ± 0.07	73.6 ± 3.9 a
	Recup.	85.4 ± 5.8	-0.53 ± 0.10	73.5 ± 3.9 a

La tasa máxima del transporte de electrones fotosintético aparente ( $ETR_{max}$ ) fue obtenida mediante el ajuste de funciones exponenciales de decaimiento a datos obtenidos entre las 0800 y 1800 h. Los valores son la media ± E.E. ( $n = 130$ ). Las letras muestran las diferencias significativas entre tratamientos mediante la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ )

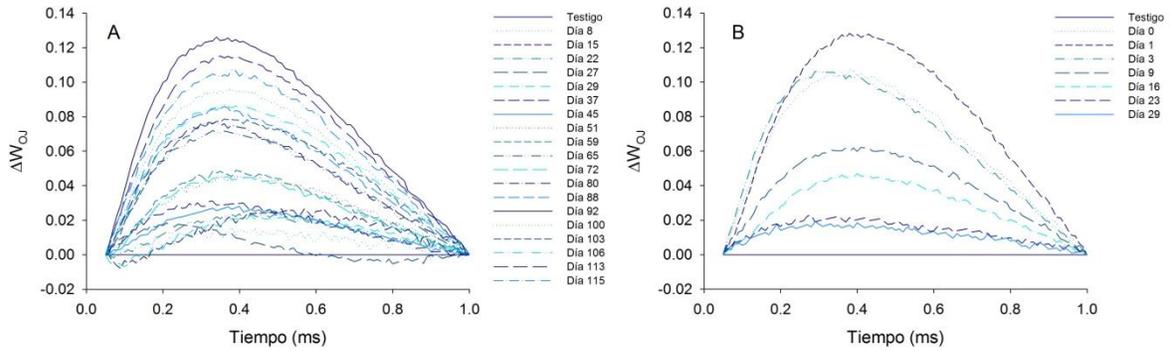
### V.5.3. Fluorescencia rápida de la clorofila a OJIP

Para buscar el efecto del déficit de agua en el FSII se determinaron las trazas del aumento rápido de la fluorescencia de Chl *a* en hojas intactas de *A. salmiana* a distintos tiempos del estrés hídrico y posteriormente durante el riego de recuperación (Fig. V.12 A y B). Las trazas exhibieron el típico aumento polifásico O-J-I-P lo que indicó que las unidades fotosintéticas de las plantas se encontraban activas durante el estrés. Un análisis más exhaustivo de las trazas mediante la doble normalización entre los pasos O y J (2 ms) y

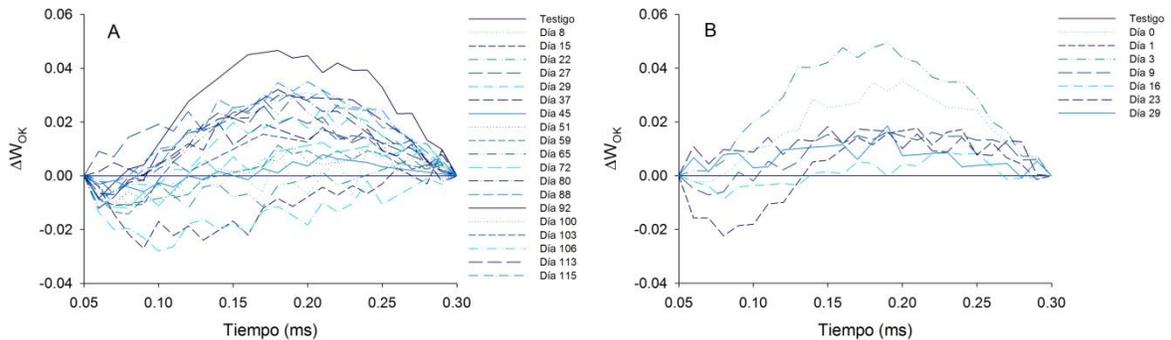
la diferencia de su cinética  $\Delta W_{OJ}$  ( $=W_{OJ(\text{estrés})} - W_{OJ(\text{testigo})}$ ) se muestran en la Fig. V.13 A y B, revelándose la aparición de la banda K y un aumento en su amplitud conforme el estrés hídrico avanzaba (Fig. V.13 A), lo que indica un efecto en el complejo productor de oxígeno (OEC) consecuencia del estrés hídrico. Similarmente, las trazas de fluorescencia fueron doblemente normalizadas entre  $F_0$  (0.05 ms) y  $F_K$  (0.3 ms) y se obtuvo la diferencia de su cinética ( $\Delta W_{OK}$ ) las cuales se muestran en la Fig. V.14 A y B. La diferencia entre las trazas hacen la banda L visible. Con el avance del estrés hídrico en el tiempo se observó un aumento positivo en la amplitud de la banda L (Fig. V.14 A), lo que corresponde a un aumento de la fluorescencia más exponencial al origen y significa una disminución en la cooperatividad energética entre las unidades del FSII por efecto del estrés. Posteriormente al riego frecuente de recuperación, las plantas recuperaron la funcionalidad del OEC (Fig. V.13 B) y se restableció la conectividad energética entre las unidades del FSII (Fig. V.14 B).



**Figura V.12.** Fluorescencia de la clorofila *a* polifásica de plantas de *A. salmiana* en distintos días posteriores al cese del riego (A) y posterior al riego de recuperación (B) que muestran las fases O (50  $\mu$ s), J (2 ms), I (30 ms) y P (500 ms). Cada resultado es el promedio de nueve repeticiones ( $n = 9$ ).



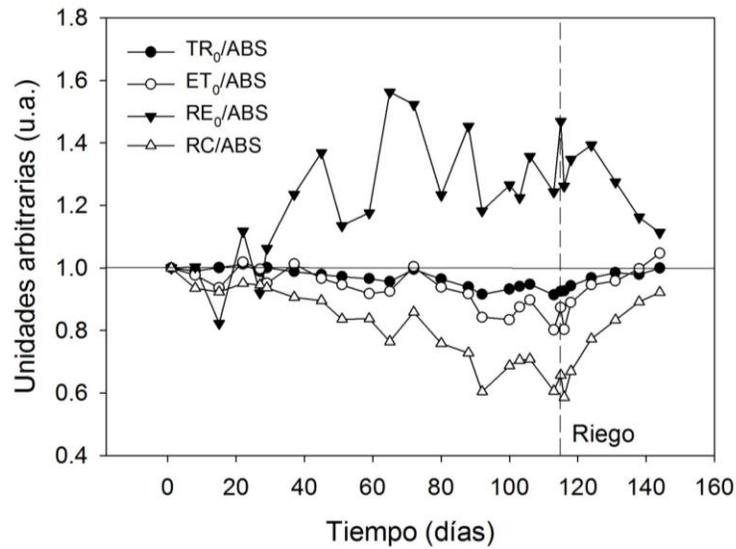
**Figura V.13.** Diferencias en la cinética de la fluorescencia de las trazas OJIP ( $\Delta W_{OJ} = W_{OJ(\text{estrés})} - W_{OJ(\text{testigo})}$ ) doblemente normalizadas en la fase O-J que muestran la banda K de plantas de *A. salmiana* en distintos días posteriores al cese del riego (A) y después del riego de recuperación (B). Cada resultado es el promedio de nueve repeticiones ( $n = 9$ ).



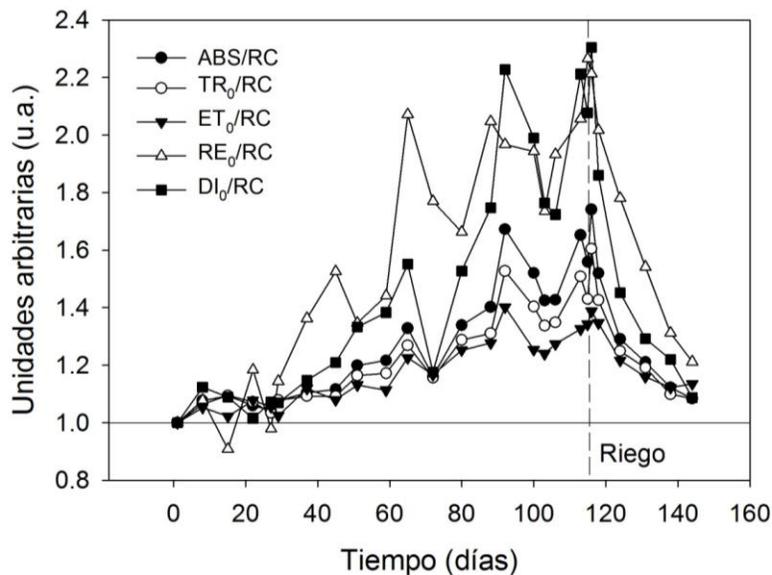
**Figura V.14.** Diferencias en la cinética de la fluorescencia de las trazas OJIP ( $\Delta W_{OK} = W_{OK(\text{estrés})} - W_{OK(\text{testigo})}$ ) doblemente normalizadas en la fase O-J que muestran la banda L de plantas de *A. salmiana* en distintos días posteriores al cese del riego (A) y después del riego de recuperación (B). Cada resultado es el promedio de nueve repeticiones ( $n = 9$ ).

Cada traza OJIP fue analizada acorde a la prueba JIP (Strasser *et al.*, 2004 y 2010) y los parámetros estructurales y funcionales obtenidos de la prueba fueron evaluados. Los parámetros estructurales son las proporciones de las constantes de velocidad y/o las proporciones de flujo de energía expresadas por absorción (ABS) por ejemplo las producciones cuánticas (captura por absorción,  $TR_0/ABS$ ) o por transporte de electrones entre los dos fotosistemas (transporte de electrones por absorción,  $ET_0/ABS$ ), o por transporte de electrones que reducen a los aceptores finales ( $RE_0/ABS$ ) del fotosistema I

(FSI). Por otra parte, los parámetros funcionales son una medida de los flujos de energía específicos expresados por centro de reacción activo, por ejemplo los RCs capaces de reducir la  $Q_A$  a  $Q_A^-$ . Todos los parámetros obtenidos fueron normalizados respecto al testigo y por lo tanto el grado de desviación de la unidad ilustra el efecto en el parámetro debido al estrés hídrico. Como se muestra en la Fig. V.15, la producción cuántica máxima de la fotoquímica primaria ( $\phi_{Po} = TR_0/ABS$ ) y la producción cuántica para el transporte de electrones ( $\phi_{Eo} = ET_0/ABS$ ) variaron poco durante los días iniciales de estrés con una disminución en los momentos de estrés hídrico severo. A su vez se presentó una marcada reducción en los centros de reacción reductores de  $Q_A$  por antena de Chl del FSII (RC/ABS). Contrariamente, hubo un gran incremento  $\phi_{Ro} = RE/ABS$  lo que sugiere un aumento en los eventos de reducción de los aceptores finales de electrones en el lado aceptor del FSI. Al término del estrés y después de 29 d de riego de recuperación los parámetros mencionados volvieron a presentar valores similares a los de las plantas testigo (Fig. V.15). Los cambios en los parámetros funcionales (Fig. V.16), mostraron un aumento en el flujo de absorción (por antena de clorofilas) por centro de reacción (ABS/RC), en el flujo de captura (que lleva a la reducción de la  $Q_A$ ) por RC ( $TR_0/RC$ ), en el flujo de transporte de electrones (mas allá de la  $Q_A^-$ ) por RC ( $ET_0/RC$ ) y en el flujo de electrones para la reducción de los aceptores de electrones finales en el lado aceptor del FSI por RC ( $RE_0/RC$ ). El aumento en ABS/RC puede corroborarse ya que un aumento en el tamaño de la antena se refleja en la formación de bandas L positivas (Fig. V.14) lo que sugiere que el estrés hídrico afectó el tamaño de la antena funcional de las unidades fotosintéticas. Esto fue seguido por un importante aumento en la disipación de energía por RC ( $DI_0/RC$ ) (Fig. V.16).

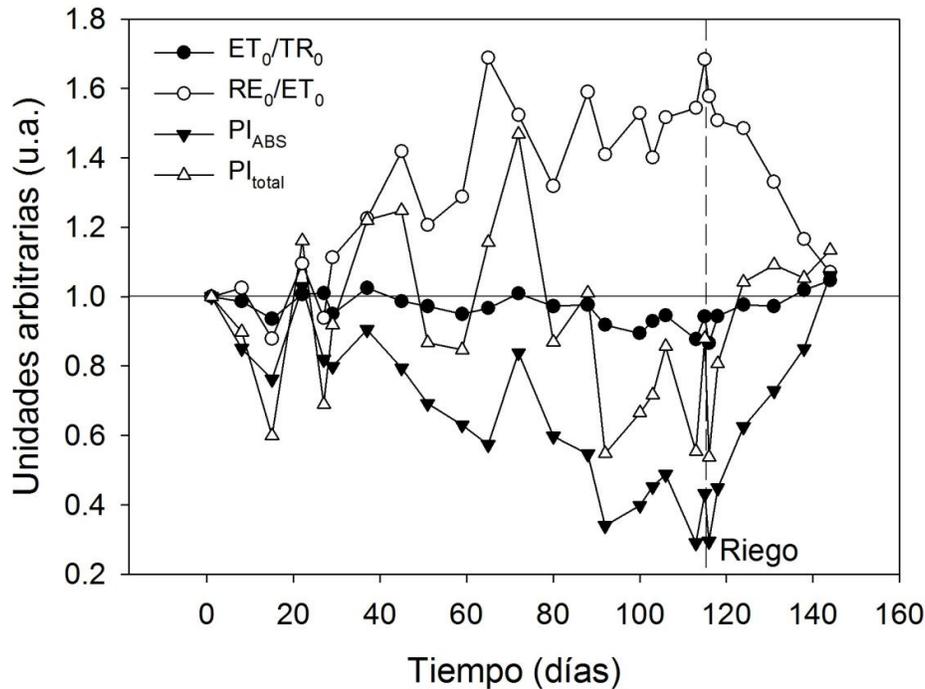


**Figura V.15.** Proporciones o flujos de energía que representan los parámetros estructurales derivados de la prueba JIP relativos a las plantas testigo durante el estrés hídrico y posterior al riego de recuperación. Producción cuántica máxima para la fotoquímica primaria ( $TR_0/ABS$ ), la producción cuántica para la conversión de la energía de excitación a transporte de electrones ( $ET_0/ABS$ ), la producción cuántica para la reducción de los aceptores finales ( $RE_0/ABS$ ) y los centros de reacción reductores de  $Q_A$  por antena de Chl del FSII ( $RC/ABS$ ). Cada punto es el promedio de nueve repeticiones ( $n = 9$ ).



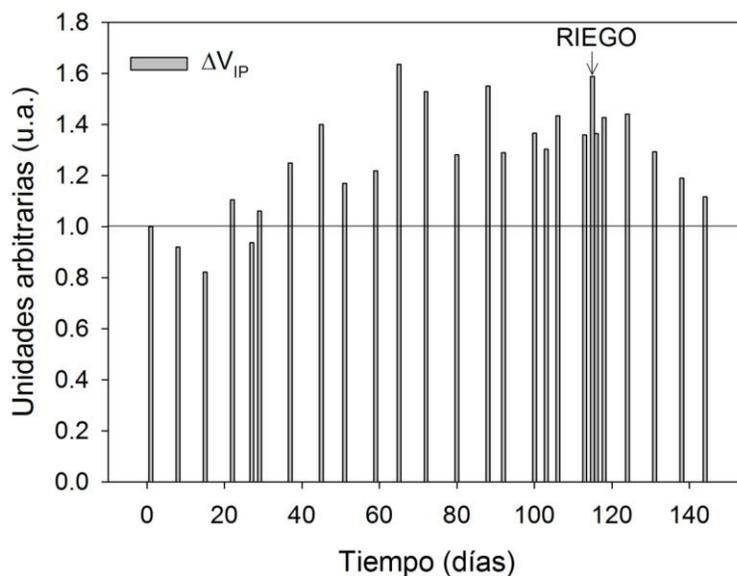
**Figura V.16.** Flujos de energía específicos por centro de reacción ó parámetros funcionales derivados de la prueba JIP relativos a las plantas testigo durante el estrés hídrico y posterior al riego de recuperación. Flujo de absorción ( $ABS/RC$ ), flujo de captura ( $TR_0/RC$ ), flujo del transporte de electrones ( $ET_0/RC$ ), flujo de electrones para la reducción de los aceptores de electrones finales en el lado del FSI ( $RE_0/RC$ ) y disipación por centro de reacción ( $DI_0/RC$ ). Cada punto es el promedio de nueve repeticiones ( $n = 9$ ).

De forma muy interesante, el aumento del tiempo sin riego produjo un incremento de los parámetros que reflejan la velocidad de reducción de la ferredoxina y del NADP<sup>+</sup> más allá del FSI ( $\phi_{R_0} = RE_0/ABS$  y  $\delta_{R_0} = RE_0/ET_0$ ) (Fig. V.15 y V.17), así como un mayor flujo de electrones por centro de reacción reductor de los aceptores finales del FSI ( $RE_0/RC$ ) (Fig. V.16). El parámetro  $PI_{total}$  resume todas las fuerzas conductoras parciales y sus efectos individuales en los parámetros que lo componen como la densidad de los centros de reacción en la capa de clorofilas ( $RC/ABS$ ), el desempeño debido a la eficiencia cuántica de la fotoquímica primaria ( $\phi_{P_0}/(1-\phi_{P_0})$ ), el desempeño debido a la eficiencia cuántica de la conversión de la energía de excitación hacia el transporte de electrones ( $\psi_{E_0}/(1-\psi_{E_0})$ ) y el desempeño debido a la eficiencia cuántica de la reducción de los aceptores finales de electrones ( $\delta_{R_0}/(1-\delta_{R_0})$ ). La Figura V.17 muestra el efecto de la suspensión del riego en el  $PI_{total}$  el cual tuvo incrementos en los días iniciales y posteriormente al día 90 se mantuvo por debajo de las plantas testigo hasta que se inició el riego de recuperación en el día 115, momento en el cual tendió a subir incluso por encima del valor de las plantas testigo. En la Figura V.17 también se muestra el efecto de la suspensión del riego en el índice de desempeño  $PI_{ABS}$ , el cual es utilizado para cuantificar el comportamiento del FSII. Es claro que este índice tendió a disminuir marcadamente con el aumento en la intensidad del estrés hídrico y se recuperó a valores similares a los de las plantas testigo después de 29 d de riego (Fig. V.17).



**Figura V.17.** Eficiencias o probabilidades del transporte de electrones y fuerzas parciales derivados de la prueba JIP normalizados respecto a las plantas testigo durante el estrés hídrico y posterior al riego de recuperación. Eficiencia o probabilidad para el transporte de electrones más allá de la  $Q_A$  ( $ET_0/TR_0$ ), eficiencia o probabilidad de que los acarreadores de electrones intersistemas se muevan para reducir los aceptores de electrones finales ( $RE_0/ET_0$ ) y suma de las fuerzas parciales representadas por el índice de desempeño  $PI_{ABS}$  y totales por el  $PI_{total}$ . Cada punto es el promedio de nueve repeticiones ( $n = 9$ ).

De las trazas OJIP se evaluó también la fase IP que es el último paso del aumento de la fluorescencia inicial en la transición de la oscuridad a la luz y el último paso en una secuencia de reacciones que conducen a la reducción de la cadena de transporte de electrones. En la Figura V.18 se muestra la contribución relativa del aumento IP a la traza de fluorescencia [ $\Delta V_{IP} = (F_P - F_I)/(F_P - F_0)$ ] como una función del tiempo de tratamiento, la cual muestra que conforme el estrés hídrico se hizo más severo el valor de  $\Delta V_{IP}$  fue mayor que el de las plantas testigo y posteriormente al riego de recuperación éste disminuyó alcanzando valores similares a las plantas testigo.



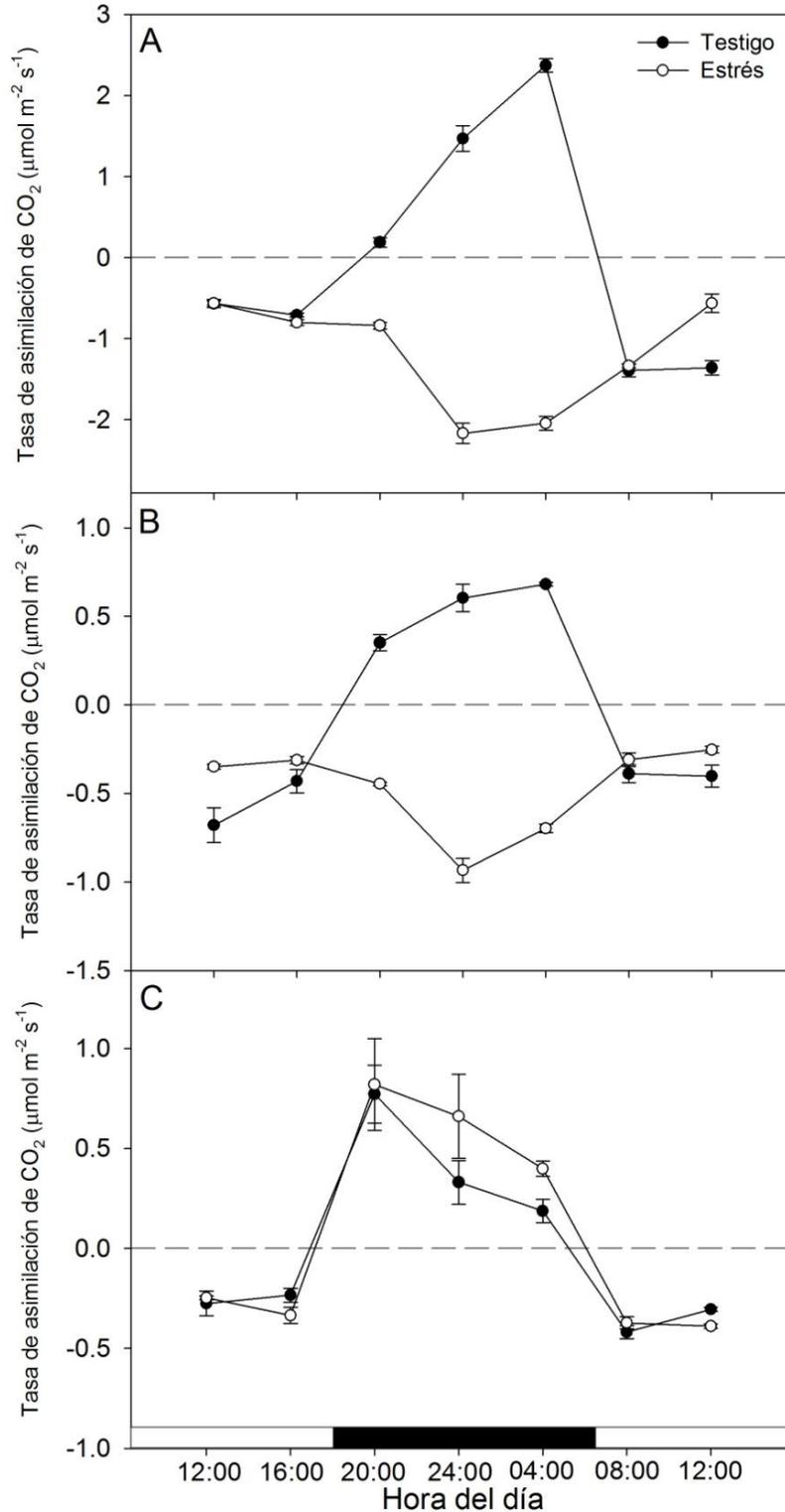
**Figura V.18.** Contribución relativa del aumento IP a la traza de fluorescencia [ $\Delta V_{IP} = (F_P - F_I)/(F_P - F_0)$ ] normalizada con respecto a las plantas testigo y como una función del tiempo de tratamiento. Cada barra es el promedio de nueve repeticiones ( $n = 9$ ).

#### V.5.4. Dinámica del intercambio de gases durante el desarrollo del estrés hídrico y recuperación

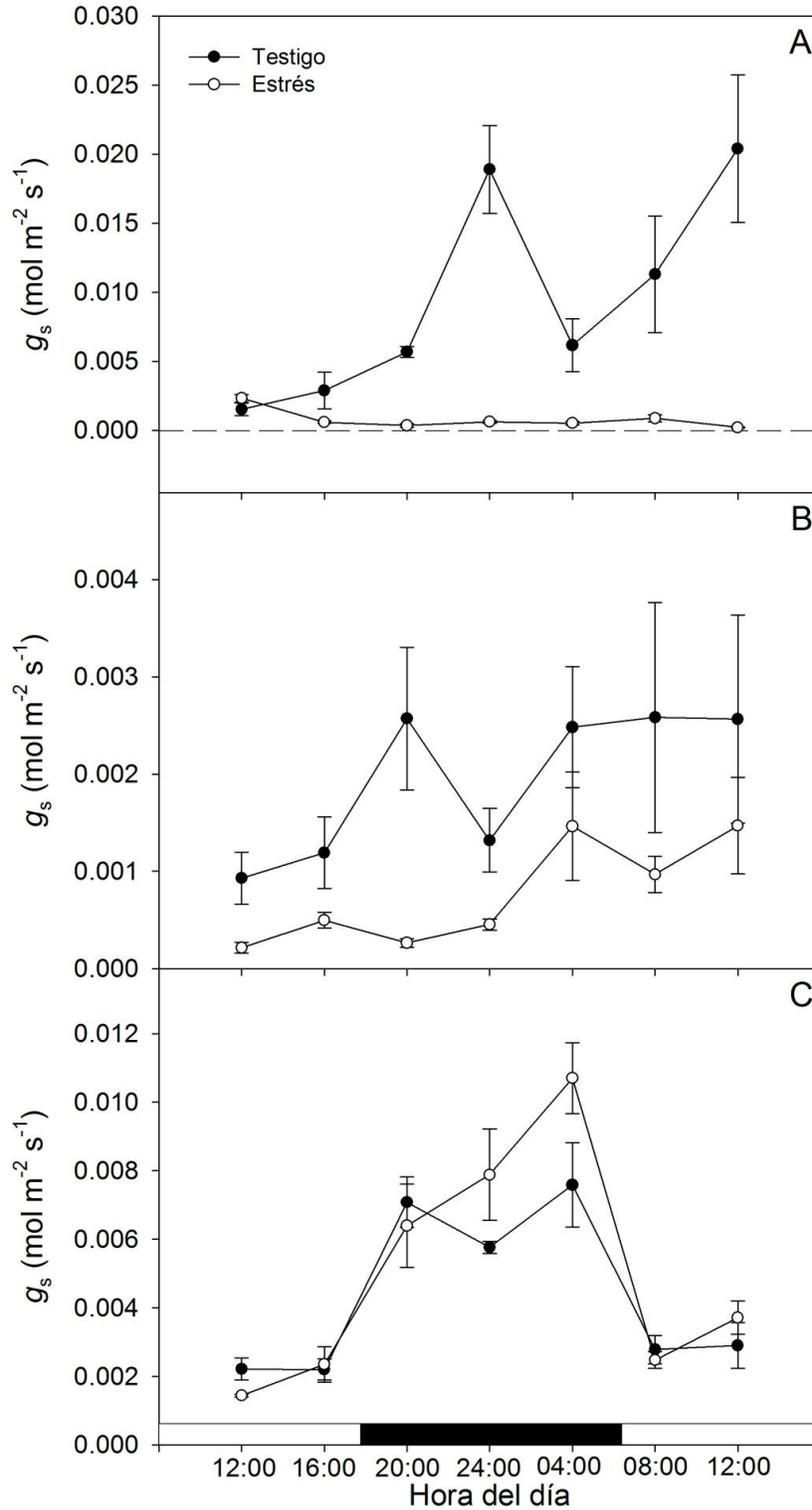
El patrón de toma de  $CO_2$  de las plantas testigo mostró el clásico comportamiento MAC con asimilación de  $CO_2$  durante la noche y nula adquisición de  $CO_2$  durante el día (Fig. V.19), debido a que en el periodo nocturno que fue de las 19:00 a las 7:00 h es cuando los estomas se abren y la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC) está activa lo que genera la toma de  $CO_2$  con la concomitante formación de malato. Durante el día, la descarboxilación del malato acumulado durante la noche genera una alta presión parcial interna de  $CO_2$  lo que causa el cierre de estomas de 8:00 a 18:00 h. La imposición del estrés hídrico tanto a los 30 como a los 109 d causó el cierre estomático durante las 24 h y se detectaron asimilaciones negativas, indicando que las plantas se encontraban en el modo de MAC ralentizado (Fig. V.19 y V.20 A y B). Después de 29 d de riego de recuperación de las plantas MAC ralentizadas éstas mostraron tasas de asimilación de  $CO_2$  durante la noche

similares a los de las plantas testigo (Fig. V.19 C). Las variaciones en la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> fueron acompañadas por variaciones similares en la conductancia estomática ( $g_s$ ) y en la transpiración ( $Tr$ ) de las hojas de *A. salmiana* (Fig. V.20 y V.21), las cuales en las plantas testigo fueron mantenidas entre 0.015 y 0.003 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y 0.5 a 0.1 mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de  $g_s$  y  $Tr$  respectivamente, mientras que a los 30 y 109 d de estrés hídrico tanto la  $g_s$  como la  $Tr$  disminuyeron a 0.001 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y 0.04 mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> respectivamente (Fig. V.20 y V.21 A, B). Después de 29 d de riego de recuperación las plantas con estrés presentaron valores similares de  $g_s$  y  $Tr$  en comparación con las plantas testigo (Fig. V.20 y V.21 C).

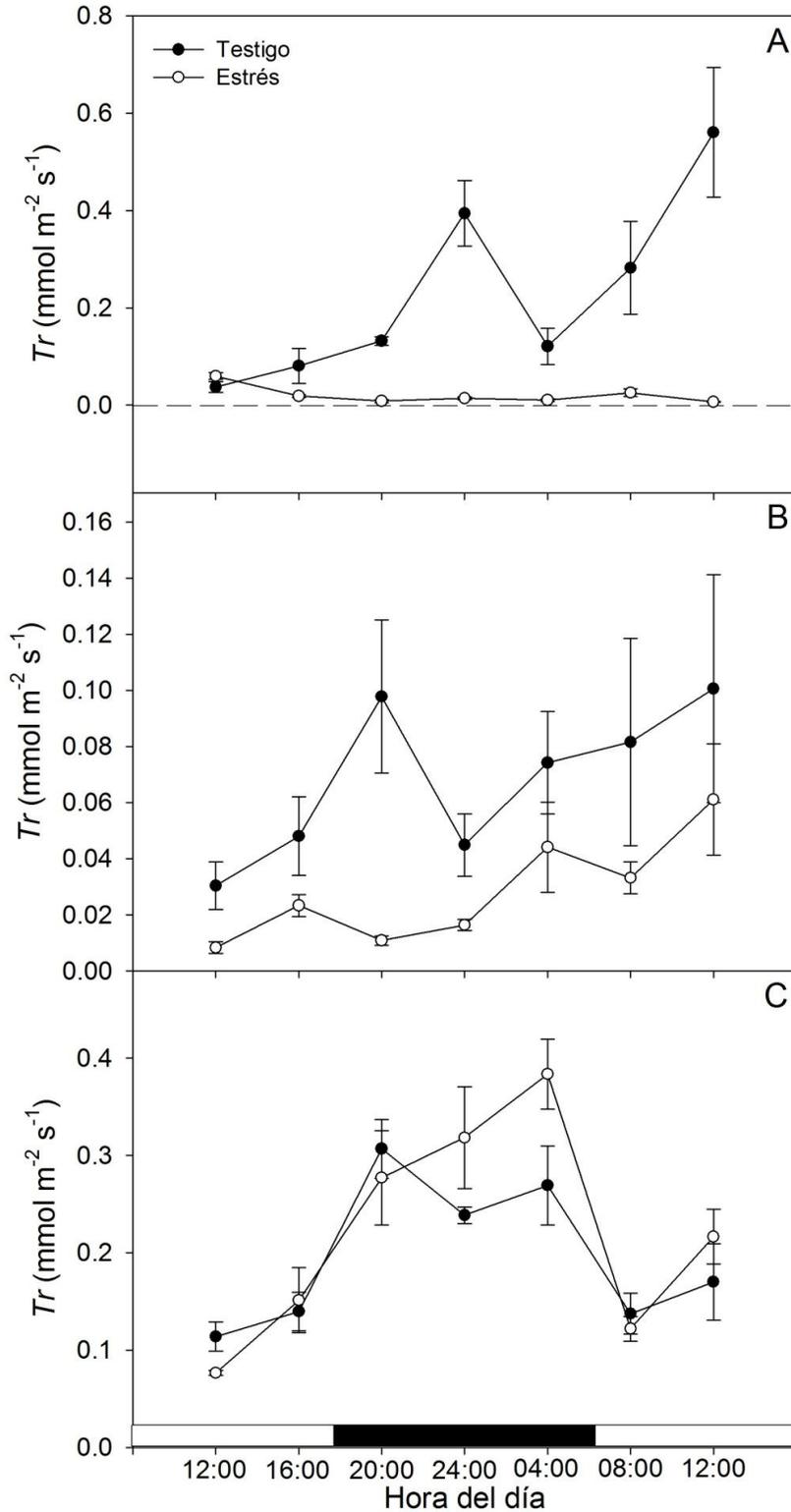
La Figura V.22 muestra que las plantas de *A. salmiana* presentaron un claro ciclo diurno en la acidez titulable de sus hojas, típico de un comportamiento MAC, con un aumento en la acumulación de la acidez titulable durante la noche y su abatimiento durante las horas con luz. En los primeros 30 d sin riego la acumulación de ácido málico fue ligeramente menor al de las plantas testigo (Fig. V.22 A). Después de 109 d de estrés hídrico la reducción en la acumulación nocturna de ácido málico fue más acentuada en comparación con las plantas testigo (Fig. V.22 B), presumiblemente todo el ácido málico acumulado en la noche fue resultado de la refijación de CO<sub>2</sub> respiratorio en las plantas con estrés hídrico. Sorprendentemente, después de 29 d de riego de recuperación las plantas que fueron sujetas a estrés presentaron una mayor acumulación nocturna de ácido málico en comparación con las plantas testigo (Fig. V.22 C), por lo que al parecer aumentaron la capacidad vacuolar para el almacenamiento del ácido málico como una respuesta de aclimatación al estrés.



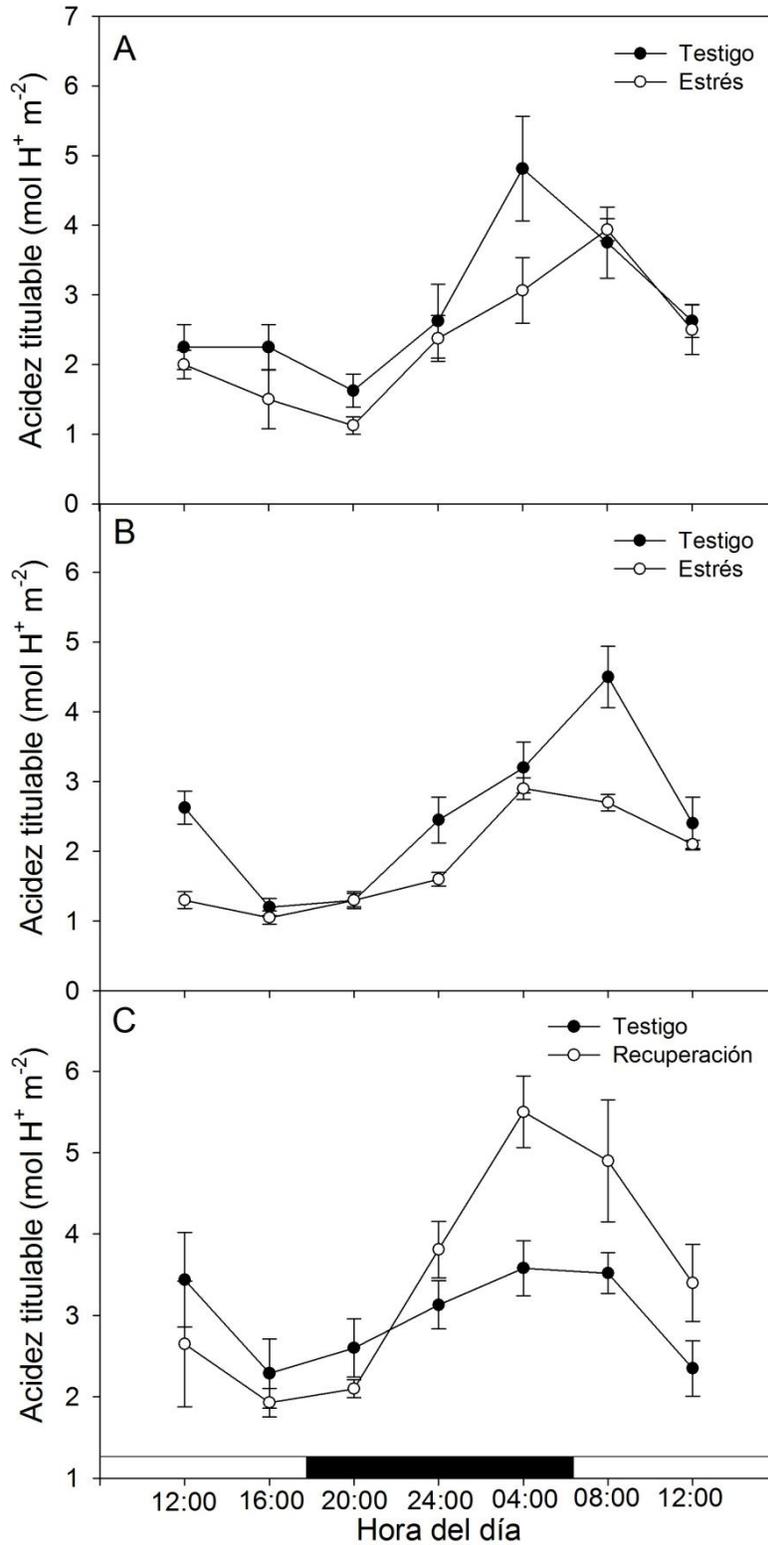
**Figura V.19.** Patrón de la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  en hojas de *A. salmiana* durante la imposición del cese de riego por 30 d (A), 109 d (B) y posteriormente a 29 d de riego de recuperación (C). Los datos son el promedio  $\pm$  e.e. ( $n = 15$ ). El periodo nocturno es indicado por la barra negra.



**Figura V.20.** Patrón de la conductancia estomática ( $g_s$ ) en hojas de *A. salmiana* durante la imposición del cese de riego por 30 d (A), 109 d (B) y posteriormente a 29 d de riego de recuperación (C). Los datos son el promedio  $\pm$  e.e. ( $n = 15$ ). El periodo nocturno es indicado por la barra negra.



**Figura V.21.** Patrón de la tasa transpiratoria ( $Tr$ ) en hojas de *A. salmiana* durante la imposición del cese de riego por 30 d (A), 109 d (B) y posteriormente a 29 d de riego de recuperación (C). Los datos son el promedio  $\pm$  e.e. ( $n = 15$ ). El periodo nocturno es indicado por la barra negra.



**Figura V.22.** Patrón de acidez titulable en hojas de *A. salmiana* durante la imposición del cese de riego por 30 d (A), 109 d (B) y posteriormente a 29 d de riego de recuperación (C). Los datos son el promedio  $\pm$  e.e. ( $n = 5$ ). El periodo nocturno es indicado por la barra negra.

### V.5.5. Contenido de clorofila en la hoja

El contenido de clorofilas *a*, *b* y la proporción *a/b* por unidad de área foliar se muestran en el Cuadro V.2. El avance del estrés hídrico solo causó un incremento significativo en el contenido de Chl *b* en las plantas con estrés para el día 45, mientras que en los otros días de muestreo tanto en los días de suspensión de riego y posteriormente al riego de recuperación no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en el contenido de Chl *a* y *b*. Contrariamente, la proporción de Chl *a/b* presentó decrementos significativos ( $P < 0.05$ ) en las plantas con estrés en comparación con el testigo a los 45 y 114 d de estrés, presentando valores similares después de 29 d de riego (Cuadro V.2).

**Cuadro V.2.** Contenido de clorofila *a*, *b* ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) y *a/b* de la hoja de *A. salmiana* a los 5, 45 y 114 d de suspendido el riego y a los 29 d de riego de recuperación.

Días	Chl <i>a</i>		Chl <i>b</i>		Chl <i>a/b</i>	
	Testigo	Estrés	Testigo	Estrés	Testigo	Estrés
5	35.7±1.7ab	34.2±1.5ab	18.7±0.9b	17.7±0.9b	1.91±0.01abc	1.93±0.04ab
45	35.7±0.8ab	40.3±1.3a	20.2±0.4b	24.7±1.0a	1.76±0.007d	1.63±0.01e
114	32.3±1.2b	36.0±2.6ab	16.4±0.8b	20.4±1.6ab	1.97±0.03a	1.77±0.03cd
Riego de recuperación						
29	32.5±1.1b	30.7±1.2b	17.8±0.7b	17.3±0.8b	1.82±0.01bcd	1.78±0.02cd

Los datos son el promedio  $\pm$  e.e. ( $n = 6$ ). Las letras muestran las diferencias significativas dentro de cada variable obtenidas mediante la prueba de Tukey con  $\alpha = 0.05$ .

### V.5.6. Crecimiento y partición de biomasa seca

La suspensión del riego por 115 d causó una disminución significativa en la biomasa seca de hoja y raíz, exhibiendo un decremento del 48 y 46% respectivamente en comparación con las plantas testigo (Cuadro V.3). Por el contrario no se encontró un cambio estadísticamente significativo en la biomasa seca del tallo entre tratamientos (Cuadro V.3). El área foliar total por planta disminuyó significativamente en un 57% después de 115 d de estrés en comparación con las plantas testigo (Cuadro V.3), como resultado de reducciones en el área foliar por planta y en la producción de nuevas hojas. Después de 29 d de riego de recuperación las plantas con estrés recobraron niveles similares a las plantas testigo en la biomasa seca de hoja, tallo, raíz y área foliar (Cuadro V.3), debido a la reanudación del crecimiento y producción de hojas.

**Cuadro V.3.** Área foliar y biomasa seca de hojas, tallo y raíz de *A. salmiana* a los 115 d de suspendido el riego y después de 29 d de riego de recuperación.

Variable	115 d de estrés		29 d de riego	
	Testigo	Estrés	Testigo	Estrés
Área Foliar (cm <sup>2</sup> )	128±15a	54±6b	131±16a	120±14a
Hoja (g)	1.39±0.1a	0.72±0.08b	1.4±0.2a	1.05±0.13ab
Tallo (g)	0.45±0.05a	0.28±0.03a	0.47±0.09a	0.24±0.04a
Raíz (g)	0.32±0.03a	0.17±0.01c	0.31±0.04ab	0.18±0.03bc

Los datos son el promedio ± e.e. ( $n = 8$ ). Las letras muestran las diferencias significativas dentro de cada variable obtenidas mediante la prueba de Tukey con  $\alpha = 0.05$ .

## V.6. Discusión

### V.6.1. Relaciones hídricas

El metabolismo ácido de Crasuláceas (MAC) con su patrón de apertura estomática que permite la reducción de la pérdida de agua mediante la toma nocturna de CO<sub>2</sub>, conjuntamente con la presencia de tejido suculento que actúa como un medio de almacenamiento de agua permite a las especies de hojas suculentas la sobrevivencia en ambientes áridos (Schulte, 2009). Considerando lo anterior, no debe pensarse en las plantas suculentas como especies tolerantes a la desecación y con tejidos que toleran bajos potenciales de agua o contenidos de agua. En correspondencia, el RWC y el  $\Psi_L$  de la hoja disminuyó durante 115 d de suspensión de agua hasta alcanzar un valor de  $39.6 \pm 5.13\%$  y  $-1.1 \pm 0.1$  MPa en las plantas de *A. salmiana* respectivamente (Fig. V.2 y V.3). Contrariamente algunos arbustos del desierto como *Larrea tridentata* alcanzan potenciales de agua en el tejido de -6 a -8 MPa (Smith *et al.*, 1997). Sin embargo, la mayoría de las características de las especies suculentas que les permiten sobrevivir a la sequía tienen que ver con la adquisición y mantenimiento de grandes cantidades de agua almacenada y a la reducción en la pérdida de esta agua hacia la atmósfera durante la sequía (Schulte, 2009). De esta manera, una de las asombrosas habilidades de *A. salmiana* fue el mantener potenciales de agua relativamente altos después de más de tres meses sin agua.

Se ha reconocido que la suculencia juega un papel importante en las relaciones hídricas de muchas plantas de ambientes áridos ya que les provee una fuente de agua durante los periodos cuando el agua no está disponible en el suelo (Schulte, 2009). Un estudio en *Agave deserti* mostró que su almacenamiento de agua le permitió a esta planta

mantener la turgencia en el clorénquima durante 8 meses de sequía lo que la llevó a una pérdida de cerca de la mitad de su contenido de agua foliar total (Schulte y Nobel, 1989). En el presente estudio, las plantas de *A. salmiana* sin riego durante 115 d perdieron el 61% del contenido relativo de agua foliar y recuperaron el 80% del RWC durante los 11 días posteriores al riego (Fig. V.2). En las plantas suculentas la habilidad de almacenar agua y retranslocarla de las zonas de almacenamiento hacia el clorénquima permite al tejido fotosintético mantener turgencia, dicha redistribución es un componente importante para mantener la sobrevivencia durante la extensión del periodo de estrés hídrico (Schulte, 2009).

#### V.6.2. Fotosíntesis durante el estrés hídrico y recuperación

La regulación de la fotosíntesis durante la imposición del estrés hídrico y recuperación fue analizada en un experimento de 145 d utilizando plantas suculentas de *A. salmiana* que están adaptadas para crecer en ambientes áridos y semiáridos y que presentan el metabolismo fotosintético MAC. Las plantas MAC obligadas y facultativas utilizan tanto el reservorio de CO<sub>2</sub> fijado como ácidos C<sub>4</sub> durante la noche previa como algo de CO<sub>2</sub> atmosférico fijado directamente por el ciclo de Calvin (Lüttge, 2004; Borland *et al.*, 2011). Para que la fisiología MAC funcione es esencial la operación de ciclos circadianos precisos (Duarte y Lüttge, 2007). Cambios diurnos en los parámetros de fluorescencia por pulso de amplitud modulada o PAM (particularmente NPQ) han sido descritos previamente para *Clusia minor* (Lüttge, 2008) y *Mesembryanthemum crystallinum* (Broetto *et al.*, 2007) que son especies MAC facultativas, y en plantas con riego de *Kalanchoë daigremontiana* y *K. pinnata* que son especies MAC obligadas (Griffiths *et al.*, 2008). Cuando los estomas están

cerrados, los tallos y las hojas de las plantas MAC se vuelven compartimentos sellados que imposibilitan la medición de la fotosíntesis por cualquier método de intercambio de gases. Las técnicas de fluorescencia de clorofila particularmente la técnica de fluorescencia modulada, puede proveer información única de la actividad fotosintética de plantas MAC como el *Agave*. Los resultados mostraron que las plantas de *A. salmiana* con riego presentaron el clásico ciclo de fijación de carbono de una planta MAC obligada (Fig. V.19 y V.22), en la cual los ácidos C<sub>4</sub> fueron fijados en la noche y movilizados durante el día. La fotosíntesis MAC es una adaptación tremendamente exitosa que permite a las plantas habitar o concurrir en ambientes estresantes con una disponibilidad limitada de agua (Borland *et al.*, 2011). Las variaciones del metabolismo MAC pueden presentarse en una variedad de combinaciones como el MAC cíclico (CAM cycling) que describe la refijación de CO<sub>2</sub> respiratorio en la noche vía PEPC con la resultante ruptura del ácido málico durante el día para liberar CO<sub>2</sub> para la Rubisco mientras los estomas permanecen abiertos; el MAC típico que indica que la toma de CO<sub>2</sub> es en la noche mediante la PEPC con el sustrato (fosfoenolpiruvato o PEP) provisto por la degradación nocturna de los carbohidratos con la acumulación de ácido málico durante la noche. En ésta, los principales periodos de la apertura estomática (en la noche, Fase I) y el cierre (al medio día; Fase III) pueden estar rodeados por periodos de duración variable en los que los estomas se abren para la toma directa de CO<sub>2</sub> al inicio (Fase II) y final del día (Fase IV), dando lugar a cuatro fases típicas del intercambio de gases del modo MAC (Borland *et al.*, 2011); finalmente el MAC ralentizado (CAM idling) describe la situación donde los estomas permanecen cerrados durante las 24 horas del día y no hay una toma neta de CO<sub>2</sub> pero los esqueletos de carbono son reciclados a través de la síntesis de ácido málico en la noche mediante la recaptura del CO<sub>2</sub> respiratorio y la subsecuente descarboxilación del ácido málico en el siguiente día para

recuperar carbohidratos. Como se mencionó en el inicio, la flexibilidad fotosintética en otras plantas MAC ha sido bien caracterizada y relacionada a salinidad o estrés por sequía. En las plantas de *A. salmiana* con 30 y 109 d sin agua la toma de CO<sub>2</sub> fue nula (Fig. V.19 A y B), sin embargo se presentó el aumento nocturno en la acidez titulable (Fig. V.22 A y B), esto implica que como se ha reportado para otras especies MAC (Borland y Griffiths, 1990) con el aumento de la sequía la proporción de reciclaje de CO<sub>2</sub> respiratorio aumenta hasta el estado de MAC ralentizado durante el estrés severo, cuando todo el ácido acumulado en la noche puede ser atribuido a la refijación del CO<sub>2</sub> interno (Martin, 1996; Ceusters *et al.*, 2009), aún más se piensa que las hojas suculentas y densamente empacadas de las plantas MAC minimizan el eflujo de CO<sub>2</sub> respiratorio a la atmósfera y así ayudan a maximizar la ganancia de carbón nocturno (Nelson y Sage, 2008). Sorpresivamente, después de 29 d de riego de recuperación las plantas que padecieron estrés mostraron un aumento substancial en la acumulación de ácido nocturno y un mayor gasto durante el día en comparación con las plantas testigo (Fig. V.22 C), por lo que este cambio en el patrón fotosintético es presuntamente una ventaja debido a la aclimatación de las plantas en términos de eficiencia fotosintética dado que la descarboxilación del ácido málico acumulado durante la noche debió aumentar substancialmente la concentración interna de CO<sub>2</sub> disponible para la fotosíntesis durante el día.

Para probar si las modificaciones a la capacidad fotosintética estuvieron asociadas al aumento en la severidad del estrés hídrico en las plantas de *A. salmiana* la producción cuántica efectiva del FSII ( $\Delta F/F_m'$ ) fue medida durante el transcurso del experimento (Fig. V.10). Este parámetro indica la fracción de luz absorbida por las clorofilas asociadas con la

actividad del FSII y que es utilizada en los procesos fotoquímicos (Maxwell y Johnson, 2000). En condiciones controladas este parámetro se correlaciona fuertemente con la eficiencia en la fijación de carbono (Mattos *et al.*, 1999). El estrés hídrico solo disminuyó significativamente ( $P < 0.05$ ) los valores promedio de  $\Delta F/F_m'$  a los 102 d de estrés y después de un día de riego de recuperación (Fig. V.10 D y F) con valores de  $0.62 \pm 0.01$  y  $0.61 \pm 0.02$  en comparación con el testigo respectivo con valores de  $0.67 \pm 0.02$  y  $0.71 \pm 0.01$  (Fig. V.10 C y E). Acorde a Winter y Gademann (1981) en plantas de *M. crystallinum* la salinidad puede causar una menor eficiencia en el uso de los fotones durante el transporte de electrones no cíclico o lineal. Las observaciones que reportamos indican que en analogía al estrés salino, el estrés hídrico actuó reduciendo la eficiencia fotosintética durante la Fase III del metabolismo MAC.

Las curvas de emisión de fluorescencia a lo largo del día mostraron un patrón diurno en las plantas testigo (Fig. V.4 a V.7), así antes del amanecer la  $F_s$  aumentó de 230 a 400 u.a. en los cinco primeros pasos de luz actínica, mientras que a las 8:00 y 12:00 se incrementó de 230 a 600 u.a., lo que indica que una gran proporción de los centros de reacción del FSII se vuelven inactivos. Posteriormente a las 16:00 horas  $F_s$  fue de 230 a 475 u.a. lo que significa que se genera una capacidad de sumidero insuficiente para remover la mayoría de los electrones. La alta producción de fluorescencia está ligada normalmente con la construcción de un gradiente de protones a través de la membrana tilacoidal ( $\Delta pH$ ). El  $\Delta pH$  es la fuerza conductora para la producción de ATP mientras que la actividad en el ciclo de Calvin es el principal sumidero de ATP (Ralph y Gademann, 2005). Conforme  $F_s$  aumenta y permanece elevado, es indicativo de que la hoja tiene un sumidero

de electrones reducido (actividad del ciclo de Calvin) por lo que se está presentando poca fijación de CO<sub>2</sub>. En la noche la  $F_s$  fue de 230 a 380 u.a., similar a la fluorescencia registrada antes del amanecer. Contrariamente y de manera interesante, en las plantas con estrés hídrico el patrón descrito en las plantas testigo no se presentó y la  $F_s$  fue muy estable con valores de 350 u.a. a los 27 DDIT y de 220 u.a. a los 102 DDIT (Fig. V.4 y V.5), por lo que la capacidad de sumidero para la energía capturada en dichas hojas fue capaz de lidiar con todo el rango de cuantos de luz entrantes, sin embargo, dado que la fluorescencia durante los pulsos de saturación de luz ( $F_m'$ ) al incrementar la irradianza disminuyeron de 800 a 300 u.a. desde los 27 d de estrés hídrico (Fig. V.4) e inclusive el descenso fue más abrupto en las plantas con 102 d de estrés hídrico, con disminuciones de  $F_m'$  de 450 a 200 u.a. con el aumento de la irradianza (Fig. V.5). Lo anterior sugiere un mecanismo bien desarrollado para disipar la energía vía rutas no fotoquímicas (NPQ). Esto es normalmente asociado con el ciclo de las xantofilas (Barker y Adams, 1997). El NPQ disipa la energía fotónica entrante, previniendo el daño a la ruta fotoquímica antes de que la energía sea acumulada como sustancias intermedias reactivas en la cadena fotosintética (Ralph *et al.*, 2002).

Es interesante notar que en la condición de suspensión de riego conforme el estrés hídrico se hacía más severo el valor de  $F_v/F_m$  o  $TR_0/ABS$  disminuyó hasta  $0.74 \pm 0.01$  a los 115 d en comparación con el testigo ( $P < 0.01$ ) que presentó un valor de  $0.8 \pm 0.003$  lo que indicó que en las plantas con estrés se presentó un estado de fotoinhibición crónica dada la gradual recuperación después del riego (Fig. V.15), lo que sugiere que los niveles de irradianza fueron mayores a la capacidad de utilización por la fotosíntesis, originando una

desactivación de las reacciones asociadas con el FSII. De hecho, la fotoinhibición ha sido observada en hojas de plantas en temperaturas extremas o estrés hídrico (Foyer *et al.*, 1994; Cela *et al.*, 2009). Cuando plantas MAC de *Aptenia cordifolia* fueron expuestas a déficit de agua, Cela *et al.* (2009) observaron una disminución en  $F_v/F_m$  y un aumento sostenido en el estado de de-epoxidación del ciclo de las xantofilas, por lo que sugieren que el estrés hídrico provoca una fotoinhibición y aumenta la disipación de energía térmica mediante el ciclo de las xantofilas, lo que lo hace un proceso de fotoprotección más que un proceso de fotodaño.

El parámetro de extinción no fotoquímica (NPQ) expresa la cantidad de energía absorbida como luz por el FSII que no es utilizada en la fotoquímica y es perdida como calor (Ritchie y Bunthawin, 2010b). Se observó un aumento en el NPQ en las plantas con estrés hídrico medio (27 DDT) y severo (102 DDT) en comparación con las plantas testigo (Fig. V.9) lo que sugiere que en las plantas con estrés el sumidero de electrones fue insuficiente lo que aumentó la necesidad de implementar mecanismos no fotoquímicos de disipación de la energía. Este aumento en el NPQ también ha sido observado en plantas de *Peperomia carnevalii* con metabolismo MAC sujetas a sequía (Herrera *et al.*, 2000). Así, en niveles de luz que exceden su utilización por la fotosíntesis, una proporción de la energía luminosa absorbida puede ser disipada sin causar daño de los complejos de cosecha de luz mediante un proceso fotoprotector que es manifestado como un aumento en la extinción no fotoquímica de la fluorescencia de clorofila (Borland *et al.*, 2000). Casi sin excepción la disipación está ligada con la de-epoxidación de los carotenoides violaxantina a anteraxantina y zeaxantina dentro de los complejos de cosecha de luz, en reacciones que

comprenden el ciclo de las xantofilas (Demmig-Adams y Adams, 1996). Adicionalmente, en la Figura V.9 se muestra que el parámetro NPQ muestra una variación sistemática obvia durante el ciclo diurno, con grandes incrementos en el NPQ muy temprano en la mañana y en la noche. Estas observaciones refuerzan el concepto de un aumento en el requerimiento de la disipación térmica cuando el uso de la luz es bajo (Borland *et al.*, 2000). Los altos valores de NPQ antes del amanecer (05:00-06:30 h) sugieren que el transporte de electrones está inhibido por lo que se requiere un aumento en la actividad de disipación de la energía. De hecho, Ritchie y Bunthawin (2010b) mencionan que el NPQ aumenta mucho en la noche cuando la fotosíntesis normalmente no ocurre y la Rubisco en las plantas MAC está parcialmente desactivada. Así, los altos valores de NPQ durante el periodo de oscuridad indican que si las plantas son expuestas a la luz en la noche el aparato fotosintético dispersa la luz absorbida como calor en lugar de generar una fuerza protón motriz, en otras palabras la cadena de transporte de electrones está desacoplada (Ritchie y Bunthawin, 2010b). Posteriormente durante el transcurso del día la disipación de energía disminuye (Fig. V.9), este efecto es atribuido al aumento en la capacidad de sumidero de electrones por el ciclo de reducción de carbono fotosintético debido a las elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub> que predominan durante la fase III del ciclo MAC originadas por la descarboxilación del ácido málico almacenado durante la noche (Niewiadomska y Borland, 2008).

El parámetro de la tasa aparente del transporte de electrones (ETR) es un estimado del número de electrones que pasan a través del FSII (cuatro electrones pasan a través del FSII por O<sub>2</sub> producido en la fotosíntesis) y por ello puede ser utilizado como una estimación de la fotosíntesis bruta o más apropiadamente de la capacidad fotosintética

(Ritchie y Bunthawin, 2010a). Las curvas de respuesta al incremento en la intensidad luminosa versus el ETR aparente se muestra en la Figura V.11. Los puntos cardinales de las curvas de dependencia a la luz de los parámetros fotosintéticos indican propiedades intrínsecas de las hojas y especialmente la tasa del transporte de electrones máximo aparente ( $ETR_{max}$ ), se relaciona con la capacidad fotosintética intrínseca (Rascher *et al.*, 2000). En el presente estudio se detectó una reducción significativa en la capacidad fotosintética expresada como una reducción en  $ETR_{max}$ , así éstas se redujeron en un 29 y 43% a los 27 y 102 días de estrés hídrico en comparación con las plantas testigo (Cuadro V.1). Inclusive la inducción del MAC ralentizado en condiciones de estrés disminuye la conductancia estomática (Fig. V.20 A y B) lo que puede reducir las concentraciones de carbono interno ( $C_i$ ) originando una limitación en las tasas de fijación de  $CO_2$ . Además dado que hubo signos de fotoinhibición (Fig. V.15) y de activación de los mecanismos de extinción no fotoquímicos durante las condiciones de estrés hídrico (Fig. V.9 B y D), nuestros hallazgos apuntan hacia un efecto directo del estrés hídrico en la fotosíntesis de *A. salmiana* a través de limitaciones difusivas, una disminución en el uso de la energía en el fotosistema II y un aumento en los procesos de extinción no fotoquímicos.

Basados en el concepto de la cinética de las trazas de fluorescencia de Chl *a*, la inducción de la fluorescencia de clorofila reveló el aumento polifásico OJIP característico cuando las trazas son graficadas en una escala logarítmica (Fig. V.12). El análisis adicional de las trazas reveló más información acerca de los efectos de la suspensión del riego en la cadena de transporte de electrones fotosintético de las plantas de *A. salmiana*. Para evaluar las diferencias entre los distintos tratamientos se emplearon normalizaciones adicionales y

las sustracciones correspondientes (diferencias entre las cinéticas). Las diferencias en la cinética revelan bandas que están escondidas entre los pasos O, J, I y P de las trazas normalizadas o directas. En la Fig. V.14 los datos de fluorescencia fueron normalizados entre los pasos O (50  $\mu$ s) y K (300  $\mu$ s) como  $W_{OK} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$  y graficados con la diferencias en la cinética  $\Delta W_{OK} = W_{OK(\text{estrés})} - W_{OK(\text{testigo})}$  en el rango de tiempo de 50-300  $\mu$ s. La banda L es revelada por dicha sustracción (a cerca de 150  $\mu$ s) y es indicadora de la conectividad energética (agrupamiento) entre las antenas de las unidades del FSII, la amplitud es mayor cuando la conectividad es menor (Oukarroum *et al.*, 2007). Por lo tanto, la Fig. V.14 A demuestra que conforme el estrés hídrico se hacía más severo se presentó un decremento en la conectividad energética (bandas L positivas), de manera inversa conforme las plantas fueron regadas las plantas mostraron una recuperación de la conectividad con la consecuente pérdida de la amplitud (Fig. V.14 B). Una mayor conectividad resulta en una mejor utilización de la energía de excitación y una mayor estabilidad del sistema (Strasser *et al.*, 2004). En la Figura V.13 los datos fueron normalizados entre los pasos O (0.05 ms) y J (2 ms) como  $W_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$  y graficada como la diferencia de las cinéticas  $\Delta W_{OJ} = W_{OJ(\text{estrés})} - W_{OJ(\text{testigo})}$  en el rango de tiempo 50  $\mu$ s - 2 ms. La banda K positiva (a cerca de 300  $\mu$ s) refleja una inactivación del complejo productor de oxígeno y/o un aumento del tamaño funcional de la antena del FSII (Yusuf *et al.*, 2010). La Fig. V.13 muestra la misma tendencia que la Fig. V.14, conforme el estrés hídrico se hacía más severo se presentó un aumento en la amplitud positiva de la banda K (Fig. V.13 A), de manera inversa conforme las plantas fueron regadas las plantas mostraron una disminución en la amplitud (Fig. V.13 B).

Las trazas de fluorescencia presentadas en la Figura V.12 también fueron analizadas mediante la prueba JIP para deducir 14 parámetros estructurales y funcionales que cuantifican el comportamiento fotosintético de las muestras (Strasser *et al.*, 2004; 2010). Para cada parámetro los valores fueron normalizados con respecto al testigo el cual es representado en las gráficas como una línea con un valor de uno, de tal manera que la desviación de la unidad en cada caso demuestra el impacto fraccional del tratamiento de suspensión de riego en comparación con el testigo. Los flujos de energía por RC son parámetros funcionales (flujos de energía específicos; Fig. V.16) mientras que los flujos de energía por ABS expresan por definición las producciones cuánticas correspondientes que son parámetros estructurales (Fig. V.15) (Strasser *et al.*, 2010). Aquí se incluye la proporción RC/ABS en la cascada de energía ya que ésta es proporcional a la fracción de energía absorbida por antena del FSII (excitación) que alcanza a los RCs. Los distintos parámetros fueron afectados de manera diferenciada: (a) los flujos específicos aumentaron durante el incremento de la condición de estrés hídrico y decrecieron posteriormente al riego de recuperación; (b) las producciones cuánticas disminuyeron durante la suspensión del riego, excepto  $RE_0/ABS$  en el que se observó un aumento, esto fue porque  $RE_0/ET_0$  aumentó considerablemente y  $RE_0/ABS = (ET_0/ABS) \cdot (RE_0/ET_0)$  y regresaron a niveles similares a los de las plantas testigo después del riego de recuperación; (c) RC/ABS disminuyó y se restableció días después del riego de recuperación. De entre todos los parámetros ABS/RC exhibió un aumento durante el estrés hídrico y dado que los flujos específicos son el producto de las producciones cuánticas correspondientes y ABS/RC, también aumentaron durante el estrés (Fig. V.16). Un aumento de ABS/RC, el cual es una medida del tamaño aparente de la antena (absorción total o Chl total por RC activo) puede

significar que (i) una fracción de los RCs están inactivos, por ejemplo son transformados a centros no reductores de  $Q_A$ , o (ii) la antena funcional, por ejemplo la antena que suministra energía de excitación a los RCs ha aumentado en tamaño (Yusuf *et al.*, 2010). De suceder lo primero  $TR_0/RC$  puede no ser afectado (dado que este solo se refiere a los RCs activos) y entonces  $TR_0/ABS$  (el cual se debe a la captura de la energía de excitación por los RCs activos por la absorción total) puede disminuir proporcionalmente a  $RC/ABS$ . En el segundo caso,  $TR_0/ABS$  puede seguir proporcionalmente a  $ABS/RC$  y entonces  $TR_0/ABS$  no es afectado (Yusuf *et al.*, 2010). En el presente estudio se observó que el aumento en  $ABS/RC$  fue acompañado por un aumento en  $TR_0/RC$  (Fig. V.16), el cual sin embargo tiene un valor ligeramente distinto (y nótese que  $TR_0/ABS$  disminuye). Esto sugiere que los cambios tomaron lugar tanto en la fracción de los RCs transformados a centros no reductores de  $Q_A$  como en el tamaño de la antena funcional. De hecho, la presencia de una banda K positiva puede indicar un aumento en el tamaño de la antena funcional del FSII como lo reporta Yusuf *et al.* (2010) y Redillas *et al.* (2011); en la Fig. V.13 se observa la formación de bandas K positivas que se presentaron en las plantas con estrés hídrico, lo que sugiere que la suspensión del riego afectó el tamaño de la antena de las unidades fotosintéticas. Los resultados también indican que la transformación de los RCs a centros no reductores de  $Q_A$  fue debido en parte a la progresiva inactivación del complejo productor de oxígeno y/o a su transformación estructural en sumideros de calor (denotados también como centros ‘silenciosos’; Strasser *et al.*, 2004) que disipan su energía de excitación como calor en lugar de utilizarla para reducir a la  $Q_A$ , esta última idea parece estar reforzada por el gran incremento en la disipación por centro de reacción indicada por el parámetro  $DI_0/RC$  durante el avance del estrés hídrico (Fig. V.16). La inactivación de

una fracción de los RC puede ser una respuesta de la planta para evitar la sobreproducción de  $Q_A^-$  la cual puede llevar a una fotoinhibición.

El nivel J está ligado al balance entre la eficiencia e ineficiencia de las reacciones de oscuridad después de la  $Q_A^-$  expresado por  $\psi_{E_0} = ET_0/TR_0$ . La probabilidad  $\phi_{E_0} = ET_0/ABS$  representa la producción cuántica máxima para el transporte de electrones que va más allá de la  $Q_A^-$ . La producción cuántica máxima de la fotoquímica primaria  $\phi_{P_0} = TR_0/ABS$ , refleja la eficiencia de las reacciones de luz (Srivastava *et al.*, 1998; Strasser *et al.*, 2004). En el caso de las plantas con estrés hídrico la ligera disminución en  $\psi_{E_0}$  (Fig. 17),  $\phi_{E_0}$  y  $\phi_{P_0}$  (Fig. V.15) indican que el estrés hídrico presentó cierta inhibición en las reacciones de luz primarias y en las reacciones redox posteriores a la  $Q_A$ . El índice de desempeño ( $PI_{ABS}$ ) combina las respuestas debidas a las propiedades fotoquímicas y no fotoquímicas, así como a las debidas a la densidad de los centros de reacción activos por absorción de clorofila indicado por el símbolo  $\gamma_{RC}$  (Strasser *et al.*, 2004, 2010). La suspensión del riego causó marcados decrementos en el índice  $PI_{ABS}$  (Fig. V.17). Dicho índice está compuesto de tres componentes independientes  $\gamma_{RC}$  (la densidad de RCs en el dominio de clorofilas)  $\phi_{P_0}$  y  $\psi_{E_0}$  (Strasser *et al.*, 2004, 2010). Una gran disminución de los valores de  $PI_{ABS}$  puede ser atribuida al cambio de uno, dos o tres de los parámetros que lo conforman. El estrés hídrico actuó mayoritariamente en  $\gamma_{RC}$  denotado por la gran reducción en los centros de reacción reductores de  $Q_A$  por antena de Chl del FSII (Fig. V.15, RC/ABS) y contribuyeron también en menor medida las ligeras reducciones en  $\psi_{E_0}$  (Fig. V.17) y  $\phi_{P_0}$  (Fig. V.15). Los grandes cambios que se presentaron en el  $PI_{ABS}$  pueden ser interpretados como evidencia de una

considerable modulación de la función del FSII en condiciones de estrés hídrico. Los resultados presentados implican que hubo un decline en la regulación de la actividad fotoquímica durante el periodo de suspensión de riego, predominantemente a través de una desactivación de los centros de reacción del FSII con una progresiva restitución de los mismos después del riego de recuperación. La investigación mostró que el  $PI_{ABS}$  es un indicador muy sensitivo del estado fisiológico de *A. salmiana* en condiciones de estrés hídrico concordando con lo que ya se ha señalado en especies arbustivas de zonas áridas sujetas a variaciones en la disponibilidad de humedad (van Heerden *et al.*, 2007). La recuperación en cada parámetro de la prueba después de 29 d de riego de recuperación confirmó la reversibilidad del fenómeno.

La fase I-P es la última fase del aumento inicial de la fluorescencia en la transición de la oscuridad a la luz y el último paso en una secuencia de reacciones que llevan a la reducción de la cadena de transporte de electrones (Schansker *et al.*, 2005). Ceppi *et al.* (2012) encontraron una correlación entre el parámetro  $\Delta V_{IP}$  y el contenido de FSI en la cual una disminución en  $\Delta V_{IP}$  fue acompañada por un decremento en el contenido de FSI por lo que proponen que el parámetro  $\Delta V_{IP}$  es un buen estimador de la proporción de FSII:FSI en la hoja y sugieren que los cambios en el  $\Delta V_{IP}$  pueden ser utilizados como indicadores semi-cuantitativos de cambios en el contenido de FSI. En el presente trabajo se encontró un aumento en la contribución relativa de la fase I-P al aumento OJIP o en el  $\Delta V_{IP}$  durante el estrés hídrico y una gradual recuperación a valores similares con el testigo durante el riego de recuperación (Fig. V.18). Oukarroum *et al.* (2009) encontraron en cebada (*Hordeum*

*vulgare* L.) que el  $\Delta V_{IP}$  aumentó en Aït Baha y Taroudant que son dos variedades marroquíes consideradas tolerantes al estrés por sequía. De hecho hallaron una correlación entre los cambios en el parámetro  $\Delta V_{IP}$  y el cambio en la transmisión de luz inducible máxima a 820 nm que representa el P700 más el contenido de plastocianina del FSI en la hoja. En otras palabras es probable que como en el caso descrito, en el presente estudio los cambios en  $\Delta V_{IP}$  sigan a cambios en el contenido de FSI. Van Heerden (2007) encontró una disminución en  $\Delta V_{IP}$  en dos arbustos  $C_3$  del desierto con estrés por sequía. Esos autores sugirieron que el estrés causa una restricción en el lado aceptor del FSI lo que lleva a un aumento en la reducción del reservorio de plastoquinona. Sin embargo el fenómeno parece ser más complejo, Schansker *et al.* (2005) demostraron que la fase I-P depende del flujo de electrones a través del FSI, de un bloqueo transitorio del flujo de electrones en el lado aceptor del FSI y también depende del contenido de FSI (Ceppi *et al.*, 2012), aún más no han sido estudiados en plantas MAC por lo que se necesita más investigación en plantas con este metabolismo.

El tratamiento de los datos en el párrafo anterior es independiente del modelo utilizado en la prueba JIP es decir está basado en la extracción directamente de las trazas de fluorescencia. Como se ha demostrado con anterioridad (Schansker *et al.*, 2003) la fase I-P sigue a la re-reducción de la  $PC^+$  y  $P700^+$  (seguido de una oxidación inicial) y depende del reservorio disponible de aceptores de electrones en el lado aceptor del FSI. Basados en el trabajo de Paillotin (1976), es posible definir la producción cuántica con la cual los electrones reducen los aceptores de electrones finales del FSI ( $RE_0/ABS = \phi_{R_0}$ ) y la eficiencia con la cual un electrón puede moverse de los aceptores de electrones

intersistemas hacia los aceptores de electrones finales del FSI ( $RE_0/ET_0 = \delta_{Ro}$ ) (Strasser *et al.*, 2010). De manera muy interesante se encontró un aumento pronunciado en  $RE_0/ABS$  y  $RE_0/ET_0$  durante el avance del estrés hídrico (Fig. V.15 y V.17). Se ha reportado un aumento en estos parámetros en cebada Ait Baha una variedad tolerante al estrés por sequía (Oukarroum *et al.*, 2009) lo que tal vez indica que el cambio en estos parámetros depende de la tolerancia a la sequía de la especie, sin embargo se necesita más investigación en este comportamiento para explicar este hallazgo.

El índice de desempeño  $PI_{total}$  es el parámetro más sensitivo de la prueba JIP. Nótese que un valor por debajo de uno expresa una “pérdida” y uno por encima una “ganancia” en la habilidad para la conservación de la energía de la hoja (Yusuf *et al.*, 2010). En la Figura V.17 se muestra un comportamiento un tanto errático con un decremento del parámetro en los días de estrés hídrico severo con el consecuente aumento en los días posteriores al riego de recuperación. Este parámetro por definición considera los siguientes efectos individuales de los parámetros que lo componen: la densidad de los RCs en la cama de clorofilas ( $RC/ABS$ ), el desempeño debido a la eficiencia cuántica de la fotoquímica primaria [ $\phi_{Po}/(1-\phi_{Po})$ ], el desempeño debido a la eficiencia cuántica en la conversión de la energía de excitación para el transporte de electrones [ $\psi_{Eo}/(1-\psi_{Eo})$ ] y el desempeño debido a la eficiencia cuántica de la reducción en los aceptores finales [ $\delta_{Ro}/(1-\delta_{Ro})$ ], lo que indica que el estrés hídrico tuvo un efecto en toda la cadena del transporte de electrones fotosintético desde cambios en la densidad de los centros de reacción, en la eficiencia de captura y en la eficiencia en el transporte de electrones, además muchos de los parámetros de la prueba JIP fueron afectados en las plantas de *A. salmiana* con estrés hídrico, sugiriendo que las

restricciones difusivas de CO<sub>2</sub> no es el único mecanismo involucrado en la reducción de la fotosíntesis durante la sequía y que varios procesos fotosintéticos son influidos a través de ella.

De manera general las plantas de *A. salmiana* en la condición de estrés mostraron un aumento en el contenido de clorofila *a* y *b* pero estadísticamente significativo en el contenido de clorofila *b* a los 45 d de suspensión del riego y una disminución significativa en la proporción Chl *a/b* a los 45 y 114 d sin riego en comparación con el tratamiento testigo (Cuadro V.2). En respuesta al estrés hídrico algunas especies como cebada, café, uva y otros mantienen un alto contenido en la concentración de clorofilas y por lo tanto una alta capacidad de utilización de la cosecha de luz, aunque presenten una capacidad disminuida para la utilización de la energía solar en la fotosíntesis (De Matta *et al.*, 1997; Flexas *et al.*, 2002; Flexas y Medrano, 2002; Bukhow y Carpentier, 2004). Este comportamiento en el contenido de pigmentos y composición de las plantas de *A. salmiana* en condiciones de estrés indicaron cierta capacidad para preservar el aparato fotosintético. No obstante, evidencia reciente sugiere que los cambios en la capacidad de cosecha de luz juega tan solo un papel pequeño en la fotoprotección (Baroli *et al.*, 2003). Sin embargo, el mantenimiento de una alta eficiencia fotoquímica y contenido de clorofila durante el estrés por sequía ha sido asociado a una mejor recuperación del crecimiento del vástago después del riego en *Festuca arundinaces* Scrb. y *Poa pratensis* L. (Huang *et al.*, 1998; Abraham *et al.*, 2004).

### V.6.3. Crecimiento durante el estrés hídrico y recuperación

La disponibilidad de agua afecta varios aspectos del metabolismo de carbono como la partición de carbohidratos entre el crecimiento y el almacenamiento, los patrones diferenciales de asignación entre las raíces y el vástago, así como el consumo de carbono y disponibilidad durante y después del estrés (Chaves, 1991). El déficit en el contenido de agua del suelo afectó la acumulación de biomasa y el crecimiento de las plantas jóvenes de *A. salmiana* (Cuadro V.3). Al final de los 115 d de suspensión de riego las plantas con estrés redujeron en un 58% el área foliar en comparación con las plantas testigo (Cuadro V.3) y el déficit de agua redujo la biomasa seca total en proporción con el área foliar. Por lo que en parte la reducción en la acumulación de biomasa seca en las plantas con estrés fue resultado de la disminución en el área foliar y la consecuente disminución en el área de tejido fotosintéticamente activo. Además de la disminución en el área foliar, el déficit de agua resultó en una disminución en la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> por unidad de área foliar debido a una disminución en la fotoquímica primaria de la hoja, una reducción en el acarreo del transporte de electrones fotosintético y un aumento en la disipación de la energía de excitación mediante procesos no fotoquímicos. Estos efectos también estuvieron relacionados a la inducción del modo MAC ralentizado durante el estrés hídrico, con la consecuente reducción en el almacenamiento de ácidos orgánicos de 4 carbonos durante la noche (reducción de la acidez titulable en la condición de estrés) y la posible re-fijación del CO<sub>2</sub> respirado por las plantas con estrés hídrico. Inclusive se ha encontrado en la bromelia *Aechmea* 'Maya' una especie MAC que el reciclaje del CO<sub>2</sub> respiratorio puede mantener la ganancia nocturna de carbono durante los momentos iniciales de desarrollo de la sequía (Ceusters *et al.*, 2009).

Las plantas con estrés hídrico de *A. salmiana* detuvieron el desarrollo de hojas nuevas y asignaron menos biomasa al compartimento hojas que las plantas testigo (Cuadro V.3). Similarmente, en *Eucaliptus globulus* se ha reportado una disminución en la producción de nuevas hojas y en la expansión foliar, lo que contribuyó en gran medida a los cambios en la producción de biomasa en las plantas con déficit de agua (Osório *et al.*, 1998). En analogía, la reducción en la producción de nuevas hojas fue la principal responsable para la disminución en la intercepción de luz y producción de biomasa causada por la suspensión del riego en las plantas de *A. salmiana*. De hecho, además de la reducción en la producción de nuevas hojas suponemos que la reducción en el número de hojas y en la tasa de expansión foliar contribuyeron sustancialmente a la disminución del área foliar por planta en la condición de estrés hídrico como se reporta para otras especies (DaCosta y Huang, 2009).

Las plantas de *A. salmiana* respondieron rápidamente al riego de recuperación reasumiendo el crecimiento y la producción de nuevas hojas, así después de 29 d de riego en las plantas con estrés, el área foliar y los compartimentos de hoja, tallo y raíz no mostraron diferencias significativas con las plantas testigo, pero durante el periodo evaluado no alcanzaron los mismos valores que las plantas que continuamente estuvieron con riego (Cuadro V.3). La habilidad de reasumir la expansión foliar después de un periodo de estrés hídrico ha sido demostrada en varias especies cultivadas y puede ser

particularmente importante para el establecimiento y productividad temprana de las plántulas en ambientes propensos a la sequía (Rawson y Turner 1982; Palta, 1984).

## V.7. Conclusiones

En conclusión, el análisis del cambio en los procesos de partición de biomasa y de asignación de carbono reveló que el estrés hídrico actuó disminuyendo el crecimiento y ajustando el tamaño de la planta acorde a las cantidades disminuidas de carbono asimilado como resultado de las limitaciones difusivas, fotoquímicas y metabólicas de la fotosíntesis y por la reducción del área foliar en las plantas jóvenes de *A. salmiana*. Se sugiere que en las plantas con estrés hídrico el sumidero de electrones utilizado en la fijación de CO<sub>2</sub> fue insuficiente, lo que aumentó la necesidad de implementar mecanismos no fotoquímicos de disipación del exceso de energía. Así, los resultados indicaron la transformación de los centros de reacción a centros no reductores de Q<sub>A</sub>, debido en parte a la progresiva inactivación del complejo productor de oxígeno en el FSII y a su transformación estructural en sumideros de calor que disipan la energía de excitación como calor en lugar de utilizarla para reducir al aceptor de electrones primario, lo que indica que el estrés hídrico tuvo un efecto en toda la cadena del transporte de electrones fotosintético promoviendo cambios en la densidad de los centros de reacción, en la eficiencia de captura y en la eficiencia en el transporte de electrones hasta la reducción de los aceptores finales en el lado aceptor del FSI. El mantenimiento del contenido de clorofilas en las plantas denotó una alta capacidad de utilización de la luz capturada aunque se haya presentado una disminución notable en la capacidad para su utilización en el proceso de fotosíntesis debido al estrés. Por lo tanto, la disipación térmica del exceso de energía mediante procesos no fotoquímicos parece ser un

mecanismo de aclimatación importante para proteger el aparato fotosintético de las plántulas de *A. salmiana*, lo que le permite sobrevivir durante el desarrollo del estrés además de ayudar a preservar la integridad del aparato fotosintético y presentar una recuperación eficiente cuando se reanuda la disponibilidad de agua en el suelo. No obstante, esto puede ser insuficiente para el establecimiento exitoso en campo de plántulas pequeñas y jóvenes en áreas semiáridas y áridas donde enfrentan una combinación de sequía, alta luminosidad y altas temperaturas.

## **VI. Estudio paralelo de la asimilación de CO<sub>2</sub> y la cinética de fluorescencia OJIP en plantas de Chile pimiento morrón durante estrés hídrico**

### **VI.1. Resumen**

La disponibilidad de agua es una de las limitaciones más importantes para la fotosíntesis y la productividad de las plantas. Por lo tanto, el monitoreo apropiado del estrés hídrico es esencial para el desarrollo de programas de riego adecuados y sostenibles para la producción de cultivos en áreas semiáridas. En el presente trabajo se desarrolló un experimento de laboratorio con plantas de Chile pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) que fueron sometidas a estrés hídrico mediante la reducción del agua de riego. Se realizaron mediciones del potencial de agua del suelo ( $\Psi_s$ ), hoja ( $\Psi_L$ ), intercambio de gases y del aumento rápido de la fluorescencia de clorofila a distintos intervalos durante el progreso del estrés para obtener un gradiente del estrés hídrico. Los resultados mostraron que conforme el estrés hídrico aumenta, se presentó una disminución progresiva del  $\Psi_s$  and  $\Psi_L$ . Similarmente, la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> ( $A$ ), la conductancia estomática ( $g_s$ ) y la transpiración ( $Tr$ ) disminuyeron con el estrés hídrico. Los parámetros obtenidos del análisis de fluorescencia por la prueba JIP revelaron que varios eventos fueron afectados por el estrés e incluyeron la inactivación de los centros de reacción del FSII, una disminución en el transporte de electrones más allá de la  $Q_A^-$  y un decremento en la reducción de los aceptores de electrones finales del FSI. Se encontró una correlación directa entre el parámetro  $PI_{total}$  y los parámetros del intercambio de gases  $A$  y  $g_s$  en las hojas de *C. annuum*. La significancia de estas relaciones para el monitoreo del estrés hídrico y la programación del riego es discutida. El  $PI_{total}$  medido con un instrumento de fluorescencia portátil (PEA) provee un método bueno para la detección temprana del estrés hídrico y puede ser una guía útil en la determinación del riego.

## VI.2. Abstract

Water availability is one of the most important limitations to photosynthesis and plant productivity. Thus, proper monitoring of plant water stress is essential for the development of appropriate, sustainable, irrigation programs for crop production in semiarid areas. A laboratory experiment was performed with bell peppers (*Capsicum annuum* L.) plants that were water stressed by reducing irrigation amounts. Soil ( $\Psi_S$ ) and leaf water potential ( $\Psi_L$ ), gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence rise measurements were made at various intervals during the drought cycle to obtain a gradient of water stress situations. The results showed that, as water stress increases, there was a progressive decline of both  $\Psi_S$  and  $\Psi_L$ . Similarly, CO<sub>2</sub> assimilation rates (*A*), stomatal conductance ( $g_s$ ) and transpiration (*Tr*) decreased with increasing water stress. Parameters obtained from the chlorophyll *a* fluorescence rise by the JIP-test revealed that several events were affected by water stress and these include the inactivation of PSII reaction centers, a decline in electron transport beyond  $Q_A^-$  and a decrease in the reduction of end electron acceptors at the PSI. A direct correlation between a JIP-test parameter ( $PI_{total}$ ) and important gas exchange parameters (*A* and  $g_s$ ) is shown in *C. annuum* plants. The significance of these relationships for water stress monitoring and irrigation scheduling is discussed. The  $PI_{total}$  measured with a portable fluorescence instrument (PEA) provides a good method for the early detection of water stress, and may become a useful guide to irrigation requirements.

## VI.3. Introducción

La restricción de agua es una de las limitaciones que más afecta la fotosíntesis y productividad de las plantas (Tezara *et al.*, 1999). Su efecto en la fotosíntesis puede ser directo mediante limitaciones difusivas a través de los estomas y el mesófilo o mediante alteraciones en el metabolismo fotosintético (Chaves *et al.*, 2009). Los estomas se cierran en respuesta a la disminución de la turgencia de la hoja, al aumento del déficit de presión de vapor en la atmósfera o por señales químicas generadas en la raíz (Chaves *et al.*, 2009), lo

que limita el suministro de CO<sub>2</sub> hacia los sitios de carboxilación de la Rubisco. Lo anterior predispone al aparato fotosintético a un aumento en los procesos de disipación de energía y una disminución de la fotosíntesis. También pueden presentarse limitaciones fotoquímicas, como una disminución de la actividad fotoquímica y de la conversión cuántica fotosintética (Shangguan *et al.*, 2000), lo que disminuye la tasa fotosintética por el aumento proporcional de los centros de reacción (RCs) inactivos y la consecuente inhibición de la transferencia de electrones (Shao *et al.*, 2010).

Actualmente, el mejoramiento del rendimiento de los cultivos en condiciones de sequía con manejo genético o agronómico de la eficiencia en el uso del agua y/o tolerancia a la sequía por las plantas es limitado (Boyer, 1996). El recurso inicial para mejorar el rendimiento en condiciones de sequía es aumentar la eficiencia en el suministro de agua y el tiempo de aplicación del riego (Boyer, 1996). Por lo tanto, el monitoreo apropiado del estrés hídrico de la planta es esencial para el desarrollo apropiado y sostenible de programas de riego para la producción de cultivos en áreas semiáridas (Sellers *et al.*, 1992; Peñuelas y Filella, 1998).

Entre las técnicas disponibles actualmente para evaluar el nivel de estrés hídrico en términos de fotosíntesis, la medición de la fluorescencia de clorofila *a* (Chl *a*) es una opción viable ya que es un indicador muy sensitivo del proceso de transporte de electrones fotosintético (Tóth *et al.*, 2008). El análisis del aumento de la fluorescencia con la prueba JIP (Strasser *et al.*, 2004), ha probado ser una herramienta invaluable en el monitoreo de la integridad funcional de la planta (Stirbet y Govindjee, 2011). Evidencia experimental ha demostrado que las tres fases del aumento rápido de la fluorescencia (OJIP) (Strasser *et al.*,

1995), reflejan tres procesos diferentes de la reducción de la cadena de transporte de electrones (Schansker *et al.*, 2005). La fase O-J (0-3 ms) es la parte fotoquímica de la traza, cuya cinética depende fuertemente de la intensidad luminosa (Neubauer y Schreiber, 1987). La fase J-I (3-30 ms) corresponde a la reducción del almacén (“pool”) de plastoquinonas (PQ; Schreiber *et al.*, 1989) y la fase I-P representa la reducción del “pool” de ferredoxina (Fd), cuando la ferredoxina-NADP<sup>+</sup> reductasa está inactiva (Schansker *et al.*, 2005).

Las trazas OJIP dependen de las propiedades cinéticas de la cadena de transporte de electrones y una cuestión que debe conocerse es la relación entre dichas propiedades y el crecimiento de la planta. Van Heerden *et al.* (2007) observaron en dos arbustos del desierto (*Augea capensis* Thunb. y *Zygophyllum prismatocarpum* E. Meyer ex Sond.) una correlación alta entre la disminución de la capacidad de asimilación de CO<sub>2</sub> y la disminución del índice de desempeño (PI<sub>ABS</sub>). Ellos sugieren que esta observación es evidencia de la relación entre los cambios en las propiedades de la traza OJIP y la capacidad fotosintética total. Contrariamente, según Adams III y Demmig-Adams (2004) la eficiencia del FSII no provee información directa de la fotosíntesis neta, debido a que el flujo de electrones no es utilizado necesariamente en el metabolismo de carbono, pues puede ser redirigido a otras rutas bioquímicas, como la reducción de oxígeno (reacción de Mehler) o fotorespiración. No obstante, existe evidencia de que la disminución en los parámetros derivados de la prueba JIP como  $F_v/F_m$  y/o PI<sub>ABS</sub> pueden estar conectados con la disminución de la fotosíntesis (Van Heerden *et al.*, 2003; Albert *et al.*, 2008), dado que en ciertas condiciones ecológicas la eficiencia “potencial” y la “actual” tienden a estar relacionadas (Bussoti *et al.*, 2010). Recientemente, la incorporación de parámetros que describen la reducción de los aceptores finales del FSI ( $\phi_{Ro} = RE_0/ABS$  y  $\delta_{Ro} = RE_0/ET_0$ ) y

el parámetro relacionado  $PI_{total}$  (Tsimilli-Michael y Strasser, 2008) han proporcionado mayor información a la discusión acerca de la relación entre los parámetros del aumento polifásico de la fluorescencia y el intercambio de gases (Bussoti *et al.*, 2010). Además, las mediciones de la fluorescencia de Chl *a* son altamente sensitivas, no destructivas, rápidas y no requieren fuentes de alta energía, como los láser, y pueden realizarse remotamente, con métodos pasivos o activos (Baker y Rosenqvist, 2004). Sin embargo, un factor clave para la aplicación exitosa de las mediciones de la fluorescencia de clorofila en los programas de mejoramiento de cultivos es sin duda la selección cuidadosa de parámetros de la fluorescencia apropiados para identificar los cambios en el funcionamiento de la planta (Baker y Rosenqvist, 2004). En la presente investigación se evaluaron los efectos del estrés hídrico en las reacciones primarias de la fotosíntesis y en la asimilación de CO<sub>2</sub> en plantas de *Capsicum annuum* L., con el objetivo de examinar si existe una relación entre los parámetros derivados de la prueba JIP y la asimilación de CO<sub>2</sub>. Con lo anterior se espera probar la hipótesis de que los parámetros de la fluorescencia de Chl *a*, derivados de la prueba JIP, están relacionados con los procesos de fijación de CO<sub>2</sub>.

#### **VI.4. Materiales y Métodos**

##### *VI.4.1. Material vegetal y tratamientos*

Semillas de *C. annuum* cultivar Cannon (Zeraim Gedera) fueron germinadas en charolas germinadoras con turba como sustrato. Las plántulas fueron trasplantadas en contenedores de 250 mL con suelo y colocadas en una cámara de crecimiento con ambiente semi-controlado (Thermo Scientific, USA), con fotoperiodo de 12 h, con 382  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de radiación fotosintéticamente activa (PAR) a nivel de las plantas. La humedad

relativa varió en promedio entre 40 y 50%. Las macetas se regaron con una solución de Ultrasol Multipropósito 18-18-18, complementada con elementos menores (SQM, Chile), y fue aplicada diariamente con el agua de riego. Cincuenta días después de la siembra las plantas fueron divididas en dos grupos, un grupo se mantuvo con riego (testigo) y el otro con estrés hídrico. Las plantas testigo fueron regadas diariamente para mantener el contenido de agua volumétrico ( $\theta_v$ ) entre 30 y 45%. Contrariamente, en el otro grupo de plantas el estrés hídrico se indujo progresivamente mediante la reducción en la cantidad de agua de riego. Las mediciones fueron realizadas en varios intervalos, durante el ciclo de déficit hídrico (216 h de duración); con lo que se obtuvo un gradiente de condiciones de estrés hídrico. El experimento se llevó a cabo bajo un diseño completamente al azar.

#### *VI.4.2. Evaluación del estado hídrico del suelo*

El contenido de agua volumétrico del suelo ( $\theta_v$ ) se midió en los primeros 8 cm de la superficie del sustrato con un reflectómetro de tiempo HH2 moisture Meter, conectado a un sensor WET (Delta-T Devices). Previamente, se determinaron en el laboratorio distintos niveles del  $\theta_v$  del rango de capacidad de campo con 5% de humedad, mediante la adición de volúmenes conocidos de agua a volúmenes conocidos de sustrato seco y en cada uno se midió la constante dieléctrica aparente con el reflectómetro de tiempo; con esto se obtuvo la curva de calibración específica del suelo utilizado. Al mismo tiempo, se midió el potencial de agua del suelo ( $\Psi_s$ ) en dichos niveles de humedad con cámaras psicrométricas C-52 (Wescor Inc., USA) y se relacionó con la reflectometría de tiempo mediante el ajuste de una curva hiperbólica inversa, de esta forma se obtuvo un estimado indirecto del  $\Psi_s$  en cualquier momento.

#### *VI.4.3. Potencial de agua de la hoja*

El potencial de agua de la hoja ( $\Psi_L$ ) se midió en discos foliares de 0.5 cm de diámetro que fueron colocados en cámaras C-52 (Wescor Inc., Utah, USA), previamente equilibradas por 3 h a temperatura constante, mediante la técnica de punto de rocío. Para esta medición se usó un HR 33 Dewpoint Microvoltmeter (Wescor Inc., Utah, USA). Las mismas hojas en las que se midió el  $\Psi_L$  fueron previamente utilizadas para la medición del intercambio de gases y fluorescencia de la Chl *a*, como se describe enseguida.

#### *VI.4.4. Medición simultánea del intercambio de gases y fluorescencia de Chl a*

Se midió el intercambio de gases foliar de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O en hojas completamente desarrolladas, con un sistema portátil de análisis de gases en el espectro infrarrojo (Ciras-1, PP Systems, UK). Las hojas fueron previamente aclimatadas, por 5 min, con iluminación saturante, luz de 1050  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , concentración de CO<sub>2</sub>, 370 ppm, humedad relativa en la cámara foliar de 45-55% y temperatura de 25 °C. Simultáneamente, con la medición del intercambio de gases se midió, en la misma hoja, la fluorescencia de Chl *a* en tejido oscurecido por 1 h con clips foliares. Las trazas OJIP (50  $\mu\text{s}$  a 1 s) de la fluorescencia fueron medidas con un fluorómetro PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments Ltd, King's Lynn, Norfolk, UK). Se estipula que O es el nivel de fluorescencia inicial (50  $\mu\text{s}$ ), J (2 ms) e I (30 ms) son niveles intermedios y P (500 ms a 1 s) es el nivel máximo (Strasser *et al.*, 1995). Las trazas se obtuvieron al exponer (1.0 s) las hojas a un haz de luz roja (650 nm) de 3200  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , generado con seis diodos emisores,

enfocado en un punto de 5 mm de diámetro. Las trazas OJIP fueron analizadas con la prueba JIP, como se describe a continuación.

#### VI.4.5. Análisis de los datos de fluorescencia de clorofila

La investigación de la inducción de la fluorescencia de Chl *a* (curva de Kautsky) ha provisto información relevante de la estructura y función de la maquinaria fotosintética; por lo que a la fluorescencia de Chl *a* se le ha llamado “la firma de la fotosíntesis” (Papageorgiou y Govindjee, 2004). La prueba JIP es un análisis multiparamétrico del aumento rápido de la fluorescencia OJIP, desarrollado por Strasser y colaboradores (para una explicación detallada de la prueba JIP, ver Strasser *et al.*, 2004 y las referencias incluidas). En la oscuridad, el aceptor de electrones primario del FS II, una quinona ( $Q_A$ ), se asume está oxidado (cuando todos los centros de reacción están abiertos) y la intensidad de la fluorescencia al inicio de la iluminación  $F_0$  (al origen O) es mínima. El aumento rápido de la fluorescencia propiciado por la luz actínica refleja el cierre de los RCs (reducción de  $Q_A$ ). Con luz actínica intensa (por ejemplo,  $3000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) la intensidad de la fluorescencia  $F_P$  (al pico P) es igual a la fluorescencia máxima ( $F_M$ ), cuando  $Q_A$  está totalmente reducida (todos los RCs están “cerrados”). La secuencia de eventos, reflejada en el aumento de la fluorescencia, se realiza a diferentes velocidades y concomitantemente el aumento es polifásico (Strasser *et al.*, 1995).

La fase OJ refleja un evento fotoquímico de recambio individual, dado que (i) el paso J aparece al mismo tiempo que  $F_M$ , cuando la reoxidación de  $Q_A^-$  es bloqueada por un inhibidor en las muestras evaluadas, como el 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimetilurea

(DCMU), y (ii) las fases OJ de muestras con y sin DCMU son idénticas cuando las curvas son normalizadas entre los niveles O y J. La fase JI parece reflejar la reducción de los acarreadores de electrones intersistemas, como los aceptores de electrones secundarios quinona -Q<sub>B</sub>, plastoquinona-PQ, citocromo-Cyt y plastocianina-PC, mientras que la fase IP refleja la reducción de los aceptores de electrones del FSI, como la ferredoxina-Fd, otros intermediarios y NADP (Strasser *et al.*, 1995; 2004).

#### *VI.4.6. Ecuaciones de la prueba JIP – utilización de las señales de fluorescencia*

Las ecuaciones de la prueba JIP están basadas en la Teoría del Flujo de la Energía en Biomembranas (Strasser *et al.*, 2004). La prueba JIP representa un traslado de los datos originales de fluorescencia en parámetros biofísicos que cuantifican el flujo de energía representado por el conocido esquema Z de la fotosíntesis. Así, la cascada de energía inicia con la absorción (ABS) de luz por los pigmentos antena del FSII y finaliza con la reducción de los aceptores de electrones finales en el lado receptor de electrones del FSI (RE) impulsado por el FSI. Los flujos de energía intermedios son el flujo de captura (TR), definido como el flujo de energía que lleva a la reducción de los aceptores de electrones del FSII, feofitina-Pheo y Q<sub>A</sub>, y el flujo del transporte de electrones (ET) que se refiere al transporte de electrones más allá de la Q<sub>A</sub><sup>-</sup>.

Los siguientes parámetros fueron calculados (Anexo A1) y se refieren al tiempo cero (inicio de la inducción de la fluorescencia):

(a) los flujos de energía específica por centro de reacción (RC) para la absorción (ABS/RC), captura (TR<sub>0</sub>/RC), transporte de electrones (ET<sub>0</sub>/RC) y reducción de los aceptores finales en el lado aceptor del FSI (RE<sub>0</sub>/RC);

(b) las proporciones de flujo o producciones, como la producción cuántica máxima de la fotoquímica primaria ( $\varphi_{P_0} = 1 - (F_0/F_M) = F_V/F_M$ ).  $\varphi_{P_0}$  corresponde a la eficiencia con la cual un fotón absorbido puede ser capturado por los centros de reacción del FSII (TR<sub>0</sub>/ABS). Este ha sido frecuentemente utilizado como una medida de la eficiencia máxima de la fotoquímica del FSII (Baker, 1991; Krause y Weis, 1991). La probabilidad de que un excitón capturado mueva un electrón hacia la cadena del transporte de electrones mas allá de la Q<sub>A</sub><sup>-</sup> ( $\psi_{E_0} = ET_0/TR_0$ ), la producción cuántica del transporte de electrones ( $\varphi_{E_0} = ET_0/ABS$ ), la producción cuántica para la reducción de los aceptores finales del FSI por fotón absorbido ( $\varphi_{R_0} = RE_0/ABS$ ) y la eficiencia con la cual un electrón puede moverse de los aceptores de electrones intersistemas reducidos hacia los aceptores de electrones finales del FSI ( $\delta_{R_0} = RE_0/ET_0$ );

(c) el índice de desempeño (PI<sub>ABS</sub>) es uno de los parámetros de la fluorescencia de clorofila que provee información útil y cuantitativa acerca del estado fisiológico de las plantas y su funcionalidad. La expresión para el índice de desempeño es derivada en analogía a la ecuación de Nernst que es utilizada para determinar el potencial redox de un sistema:

$$PI_{ABS} = \left[ \frac{\gamma_0}{1 - \gamma_0} \right] \left[ \frac{\varphi_{P_0}}{1 - \varphi_{P_0}} \right] \left[ \frac{\psi_0}{1 - \psi_0} \right]$$

El símbolo  $\gamma$  representa la tasa de clorofilas de los centros de reacción y la clorofila total del FSII. La expresión  $\gamma_o/(1 - \gamma_o)$  es proporcional a los parámetros estimados por la prueba JIP igual a la tasa de centros de reacción y la absorbancia (RC/ABS). Por lo tanto

$$\frac{\gamma_o}{(1 - \gamma_o)} \sim \frac{Chl_{RC}}{Chl_{antena}}$$

$$\frac{RC}{ABS} = \left[ \frac{(F_{2ms} - F_{50\mu s})}{4(F_{300\mu s} - F_{50\mu s})} \right] \frac{F_V}{F_M}$$

$\Psi_o=(1 - V_j)$  es la fracción de electrones transportados más allá de  $Q_A^-$  por excitón capturado por los centros de reacción (RC) del FSII;  $\Psi_o$  representa la probabilidad de que la energía de un excitón capturado sea utilizada en el transporte de electrones más allá de  $Q_A^-$ .

(d) El  $PI_{total}$  es el producto del índice de comportamiento y la probabilidad de que un electrón pueda moverse de los aceptores de electrones intersistemas reducidos hacia los aceptores finales de electrones del FSI y se define como sigue (Tsimilli-Michael y Strasser, 2008):  $PI_{total} = PI_{ABS} \cdot \delta_{Ro}/(1-\delta_{Ro})$ . El índice de desempeño  $PI_{total}$  es el parámetro más sensitivo de la prueba JIP debido a que incorpora varios parámetros que evalúan todo el proceso fotosintético de transporte de electrones a partir de las trazas de fluorescencia OJIP, por lo que cualquier cambio en las trazas OJIP es expresado en el  $PI_{total}$ , mientras que el comúnmente utilizado  $F_V/F_M$  solamente es sensitivo a la proporción ( $F_o/F_M$ ). De acuerdo a su definición,  $PI_{ABS}$  y  $PI_{total}$  son índices del desempeño fotosintético, basados en la absorción de luz.

#### VI.4.7. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante regresión lineal con Sigma Plot (versión 9.01; Systat Software, Inc., Point Richmond, CA, USA). El análisis de correlación entre todas las variables de fotosíntesis y las variables del estado hídrico de suelo y planta fueron realizados mediante el procedimiento PROC CORR de SAS con el coeficiente de correlación de Pearson (SAS 9.1, SAS Institute Inc., NC). Se realizaron pruebas de normalidad y pruebas de varianza constante previo al análisis estadístico mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y el rango de correlación de Spearman (Sigma Plot versión 9.01; Systat Software, Inc., Point Richmond, CA, USA), si no se cumplían se transformaron los datos mediante la transformación de Johnson y posteriormente se realizaron los análisis.

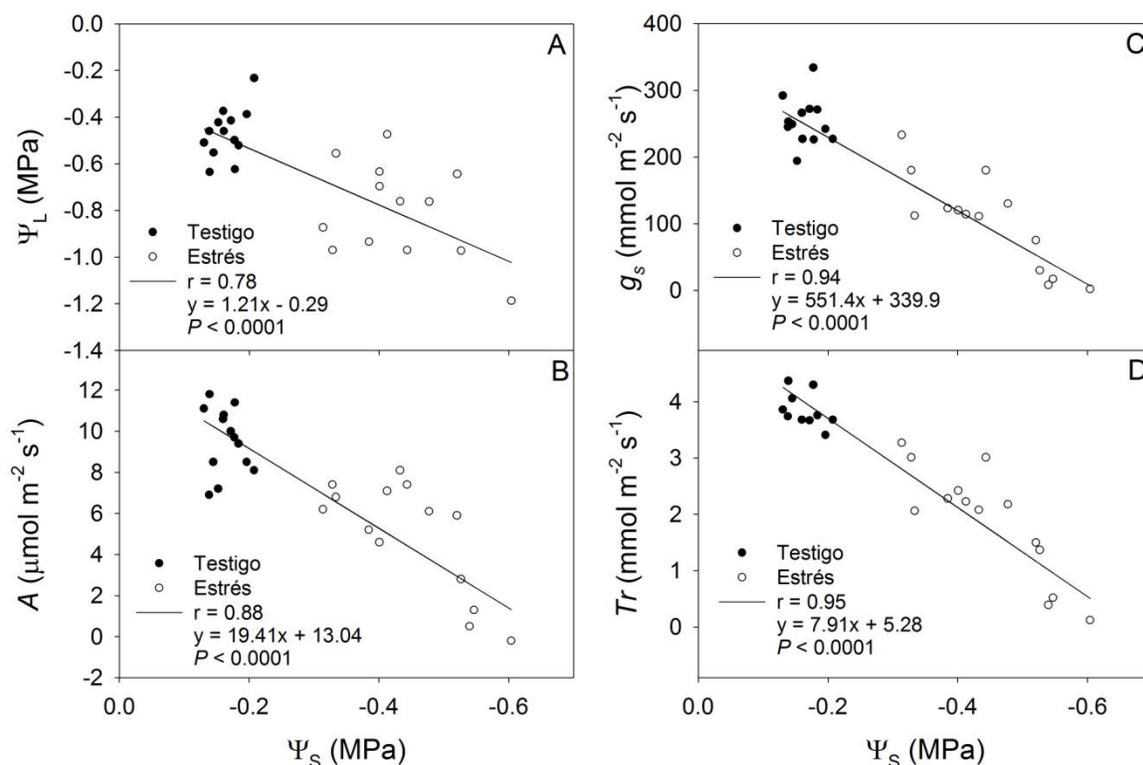
### VI.5. Resultados

#### VI.5.1. Relaciones hídricas e intercambio de gases

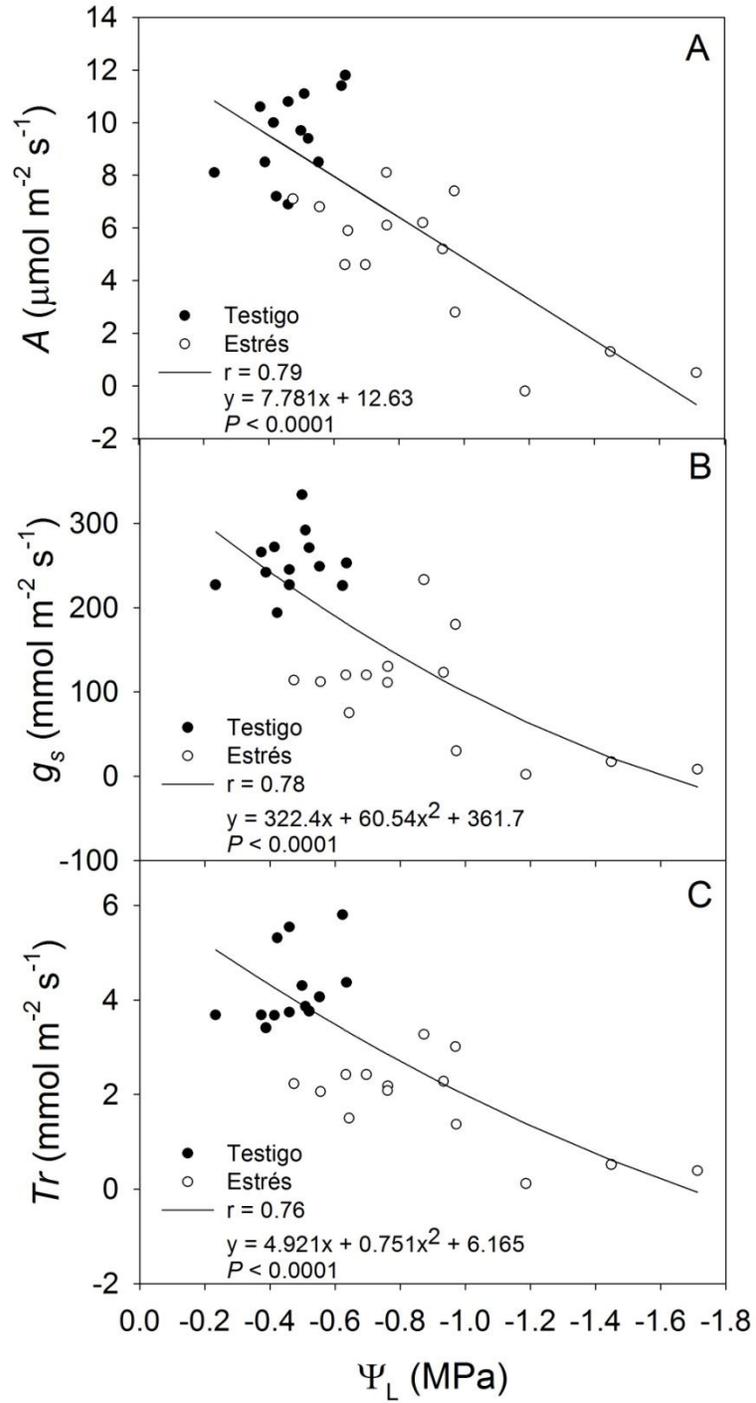
La caída del potencial de agua del suelo ( $\Psi_S$ ) por la restricción del suministro de agua causó que el potencial de agua de la hoja ( $\Psi_L$ ) disminuyera significativamente (Fig. VI.1 A), así como las tasas de asimilación de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) (Fig. VI.1 B). El cierre estomático es uno de los principales procesos que se presentan en la hoja en respuesta al estrés hídrico, en esta condición la relación entre la conductancia estomática ( $g_s$ ) y el  $\Psi_S$  en las plantas de *C. annuum* (Fig. VI.1 C) fue significativa, el mayor cierre estomático ocurrió con un  $\Psi_S$  relativamente alto entre -0.4 y -0.6 MPa. La regulación del cierre estomático en las plantas de *C. annuum* por la disminución moderada del  $\Psi_S$  permite considerar a la conductancia

estomática como un indicador preciso del desarrollo del estrés hídrico conjuntamente con el  $\Psi_S$ , a la vez la caída del  $\Psi_S$  disminuyó la pérdida de agua por transpiración ( $Tr$ ), como se muestra en la Figura VI.1 D.

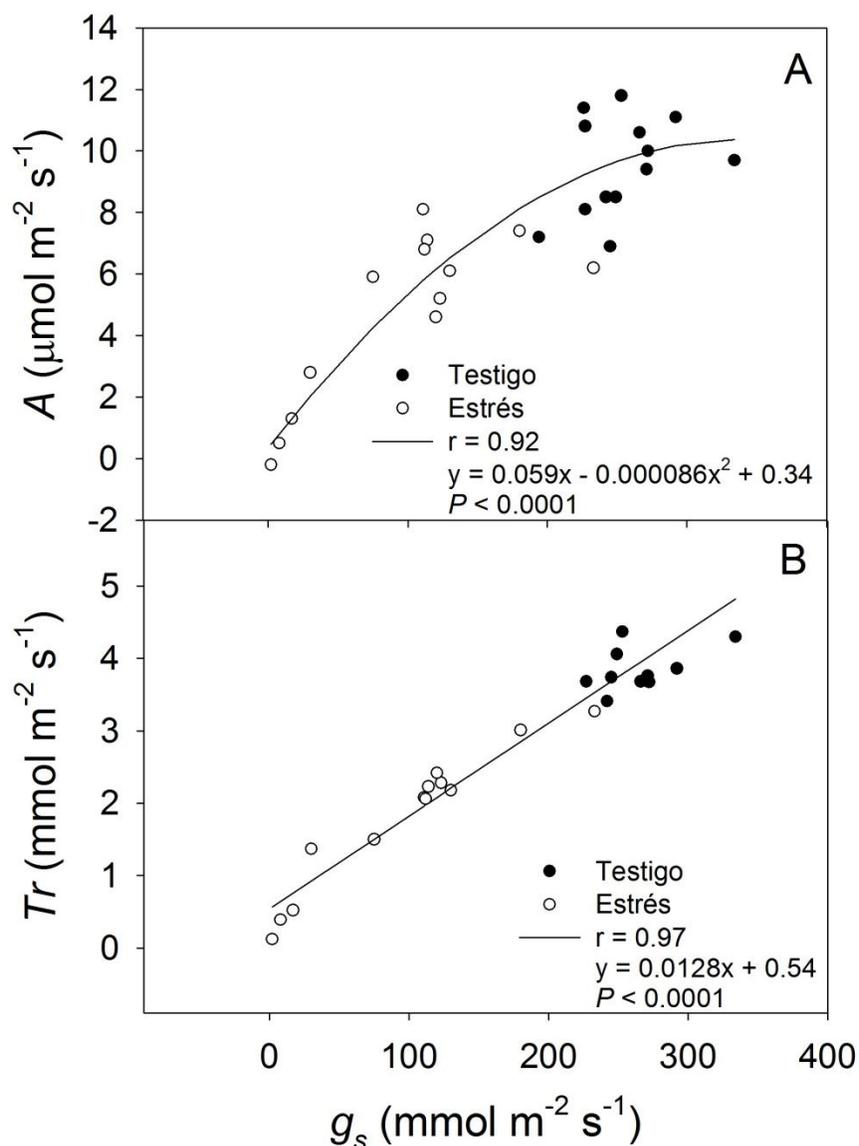
La respuesta de las plantas de *C. annuum* a la disminución en el potencial de agua de la hoja ( $\Psi_L$ ) mostró que el estrés hídrico medio sólo redujo ligeramente la  $A$ ,  $g_s$  y  $Tr$ , mientras que un estrés más severo redujo drásticamente los tres parámetros (Fig. VI.2 A-C). La  $g_s$  disminuyó drásticamente, de  $300 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  hasta cerca de  $0 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Fig. VI.2 B). Además, se encontró una relación no lineal, altamente significativa, entre la  $g_s$  y la  $A$  (Fig. VI.3 A) y una lineal entre la  $g_s$  y  $Tr$  (Fig. VI.3 B). No obstante, conforme el estrés se prolonga la disminución de la  $g_s$  limita la  $A$  junto con la  $Tr$  (Fig. VI.3 A y B).



**Figura VI.1.** Relación entre el potencial de agua del suelo y el potencial de agua de la hoja (A), tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  (B), conductancia estomática (C), y transpiración en plantas de *C. annuum* (D). Los valores corresponden a plantas individuales ( $n = 36$ ).



**Figura VI.2.** Relación entre el potencial de agua de la hoja y la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  (A), conductancia estomática ( $g_s$ ) (B), y transpiración ( $Tr$ ) (C) en plantas de *C. annuum*. Los valores corresponden a plantas individuales ( $n = 36$ ).

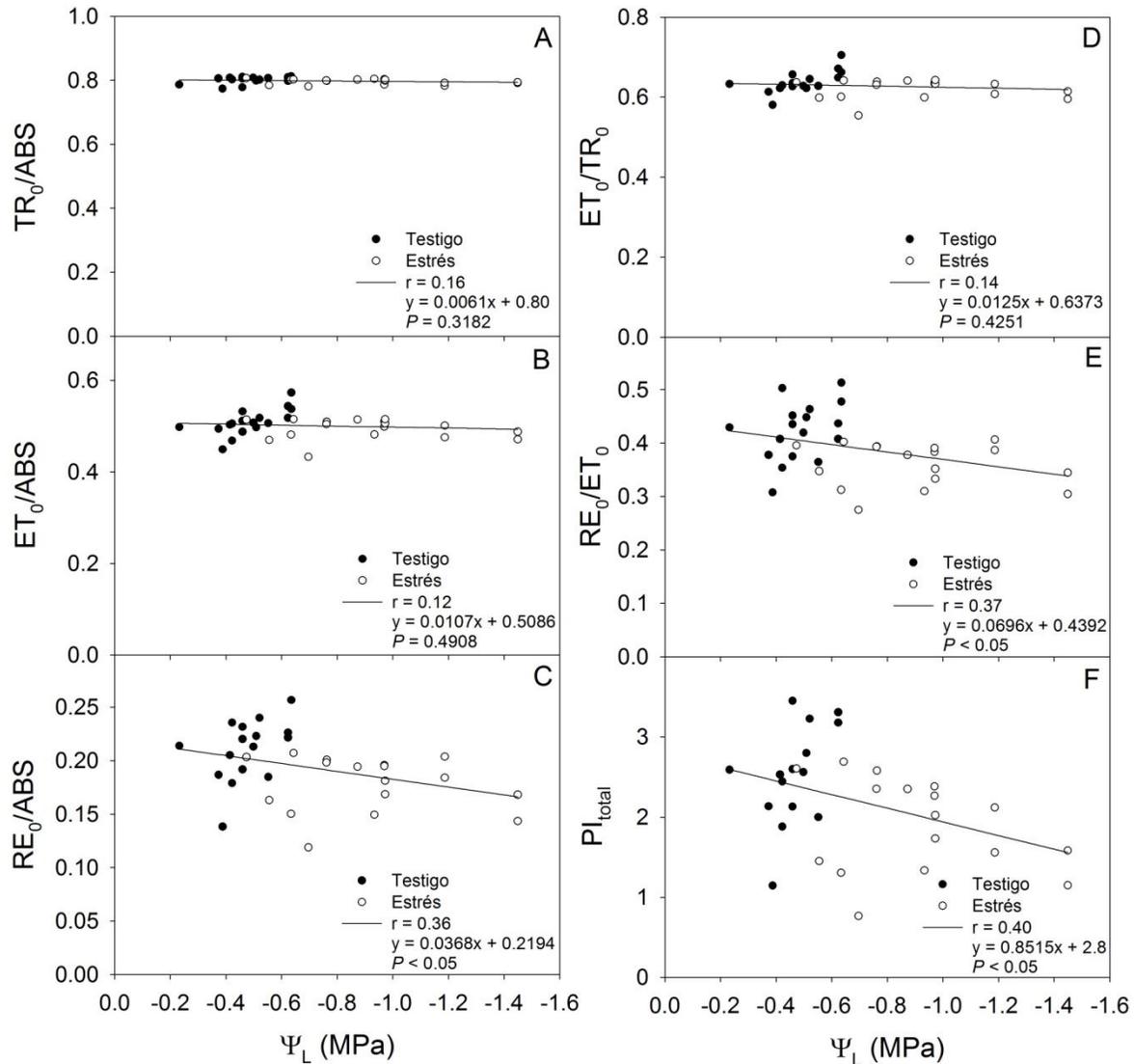


**Figura VI.3.** Relación entre la conductancia estomática ( $g_s$ ) y la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  (A) y la tasa de transpiración ( $Tr$ ) (B) en plantas de *C. annuum*. Los valores corresponden a plantas individuales ( $n = 36$ ).

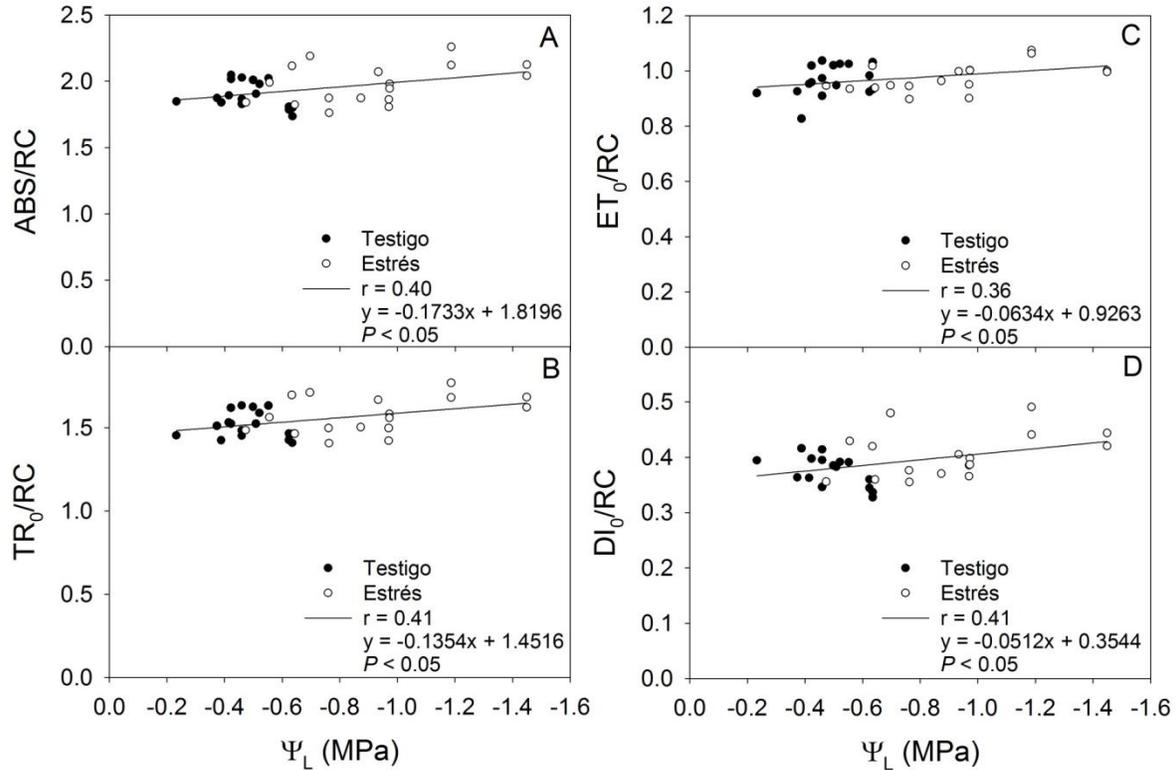
#### VI.5.2. Fluorescencia de clorofila a en hojas con estrés por déficit de humedad

El análisis con la prueba JIP mostró que la eficiencia máxima de la fotoquímica del FSII ( $\phi_{P_0} = F_V/F_M = TR_0/ABS$ ) de las plantas de *C. annuum* en los distintos  $\Psi_L$  de la hoja fueron altos y constantes con valores alrededor de 0.8 (Fig. VI.4 A). No obstante, se observó mayor efecto en algunas de las producciones (Fig. VI.4) y flujos específicos (Fig.

VI.5) durante el periodo de estrés hídrico. Particularmente, los parámetros  $\varphi_{R_0} = RE_0/ABS$  y  $\delta_{R_0} = RE_0/ET_0$  que están relacionados a las eficiencias cuánticas o tasas de flujo mostraron una tendencia a reducirse conforme el  $\Psi_L$  fue menor (Fig. VI.4 C y E). Contrariamente, aquellos parámetros relacionados a los flujos de energía específicos de los centros de reacción activos del FSII, mostraron una tendencia a aumentar, como por ejemplo la absorción (ABS/RC), la captura (TR<sub>0</sub>/RC), el transporte de electrones (ET<sub>0</sub>/RC) y la disipación (DI<sub>0</sub>/RC) (Fig. VI.5 A-D). Así, las plantas de *C. annuum* en condiciones de estrés mostraron un aumento en el tamaño aparente de la antena, representado por ABS/RC (Fig. VI.5 A). El aumento de ABS/RC (o decremento de los RCs activos) fue acompañado por un incremento en la captura por los centros de reacción activos (TR<sub>0</sub>/RC; Fig. VI.5 B), con lo cual se compensa en gran medida ‘el apagado’ de una fracción de los RCs y se mantiene a  $\varphi_{P_0}$  sin cambio (Fig. VI.4 A). El aumento de TR<sub>0</sub>/RC fue responsable del aumento ligero de ET<sub>0</sub>/RC (Fig. VI.5 C), porque este contribuye a mantener sin cambio  $\psi_{E_0} = ET_0/TR_0$  (nótese que  $ET_0/RC = TR_0/RC \cdot \psi_{E_0}$ ). Basados en el trabajo de Paillotin (1976), es posible definir  $RE_0/ABS$  ( $\varphi_{R_0}$ ) o la producción cuántica con la cual los electrones reducen los aceptores finales de electrones del FSI (Strasser *et al.*, 2010). En la Figura VI.4 C se muestra que la producción cuántica ( $RE_0/ABS$ ) disminuyó con el  $\Psi_L$  menor. Similarmente, la eficiencia con la cual un electrón puede moverse de los aceptores de electrones reducidos intersistemas hacia los aceptores finales de electrones del FSI ( $RE_0/ET_0 = \delta_{R_0}$ ) disminuyó con la caída del  $\Psi_L$  (Fig. VI.4 E).



**Figura VI.4.** Producciones cuánticas de la captura de energía, flujo de electrones, probabilidades de la energía de excitación capturada para mover electrones a lo largo del transporte de electrones lineal e índice de desempeño para la conservación de los fotones absorbidos por el FSII para la reducción de los aceptores finales del FSI en hojas de *C. annuum* con distinto potencial de agua foliar. A)  $TR_0/ABS$ , producción cuántica máxima para la fotoquímica primaria; B)  $ET_0/ABS$ , producción cuántica para el transporte de electrones; C)  $RE_0/ABS$ , producción cuántica para la reducción de los aceptores finales de electrones del lado aceptor del FSI; D)  $ET_0/TR_0$ , probabilidad de que un electrón se mueva más allá de  $Q_A^-$ ; E)  $RE_0/ET_0$ , probabilidad con la cual un electrón de los acarreadores intersistemas es transferido para reducir los aceptores finales de electrones en el lado aceptor del FSI; F) índice de desempeño  $PI_{total}$  para la conservación de los fotones absorbidos por el FSII para la reducción de los aceptores finales del FSI. Los valores corresponden a plantas individuales ( $n = 36$ ).



**Figura VI.5.** Flujos de energía específicos por centro de reacción activo del FSII en hojas de *C. annuum* con distinto potencial de agua foliar. ABS,  $TR_0$ ,  $ET_0$  y  $DI_0$  denotan la energía absorbida (A), energía capturada (B), transporte de electrones (C) y disipación de la energía (D), respectivamente. Los valores corresponden a plantas individuales ( $n = 36$ ).

### VI.5.3. Relación entre los parámetros derivados de la prueba JIP y el intercambio de gases

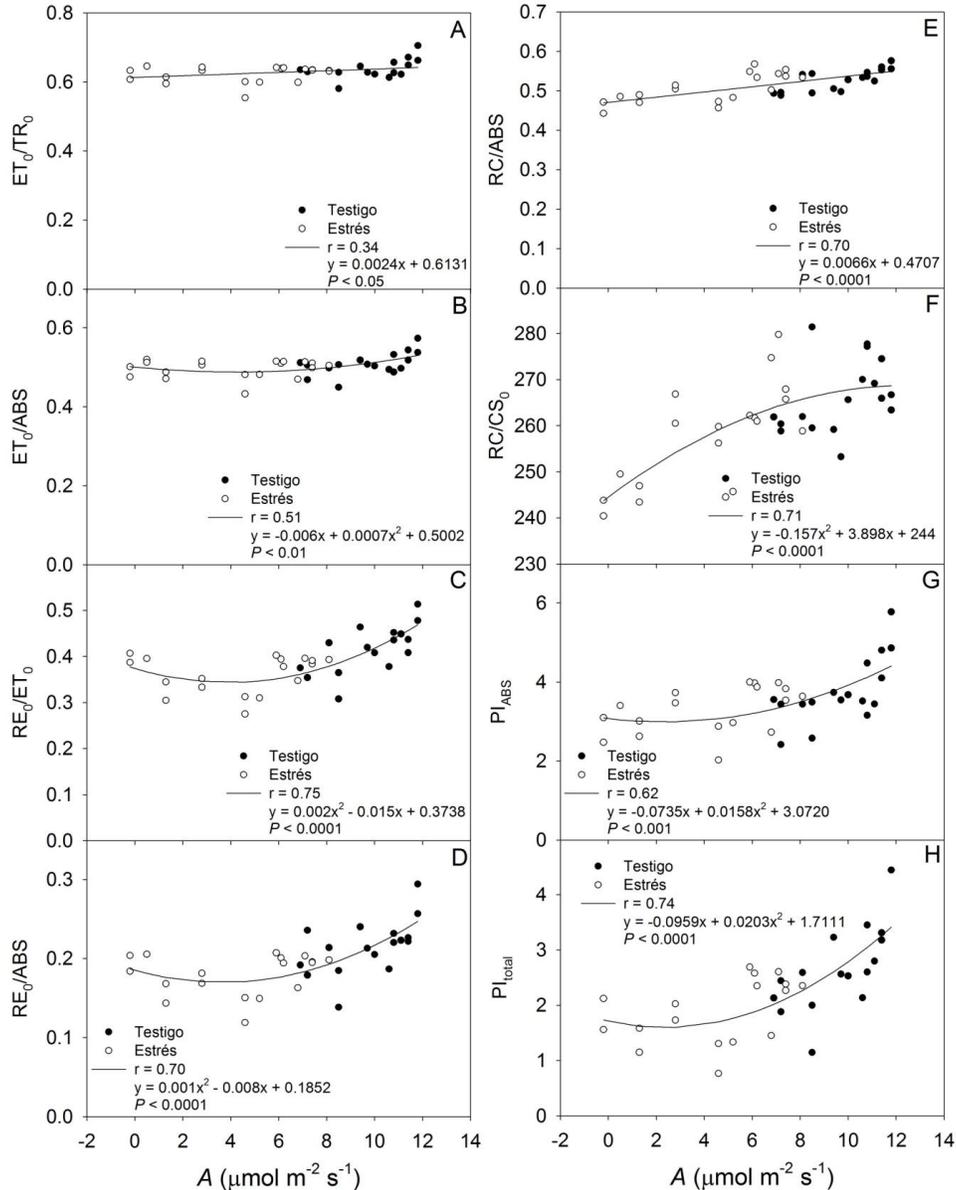
La asimilación de  $CO_2$  se correlacionó positivamente con la eficiencia con la cual un electrón puede moverse de los aceptores de electrones reducidos intersistemas hacia los aceptores de electrones finales del FSI ( $\delta_{R_0} = RE_0/ET_0$ ), con la producción cuántica de los aceptores finales reducidos del FSI ( $\phi_{R_0} = RE_0/ABS$ ), con la densidad de los centros de reacción ( $RC/CS_0$ ) y con los índices de comportamiento  $PI_{ABS}$  y  $PI_{total}$  (Cuadro VI.1). Similarmente, la tasa de asimilación de  $CO_2$  se correlacionó negativamente con el flujo de absorción específica ( $ABS/RC$ ) y con el flujo de captura específico máximo ( $TR_0/RC$ ).

Gráficamente se encontró una relación lineal positiva entre la probabilidad de que un excitón capturado mueva un electrón hacia la cadena de transporte de electrones más allá de la  $Q_A^-$  y la asimilación de  $CO_2$  (Fig. VI.6 A), así como con los centros de reacción reductores de  $Q_A$  por clorofila antena del FSII (Fig. VI.6 E). A su vez, la tasa de asimilación de  $CO_2$  aumentó de manera curvilínea con el incremento de la producción cuántica para el transporte de electrones (Fig. VI.6 B), con la eficiencia con la cual un electrón de los acarreadores de electrones intersistemas se mueve para reducir los aceptores de electrones finales en el lado aceptor del FSI (Fig. VI.6 C), con el aumento en la producción cuántica para la reducción de los aceptores de electrones finales en el lado aceptor del FSI (Fig. VI.6 D), con la cantidad de centros de reacción activos del FSII por sección cruzada al tiempo 0 (Fig. VI.6 F) (dado que solo una parte de la muestra da origen al aumento de la señal de fluorescencia medida, ésta consiste de capas de células de diferentes profundidades de la superficie irradiada, por lo tanto no son iluminadas de manera homogénea, por lo que por definición se usa el término ‘sección cruzada excitada’), con el aumento en el índice de desempeño (potencial) para la conservación de la energía de los fotones absorbidos por el FSII para la reducción de los aceptores de electrones intersistemas (Fig. VI.6 G) y con el aumento en el índice de desempeño (potencial) para la conservación de la energía de los fotones absorbidos por el FSII para la reducción de los aceptores finales del FSI (Fig. VI.6 H).

**Cuadro VI.1.** Correlaciones entre los parámetros derivados del intercambio de gases y los parámetros de las relaciones hídricas con los de la prueba JIP en plantas de *C. annuum* con déficit de agua en el suelo.

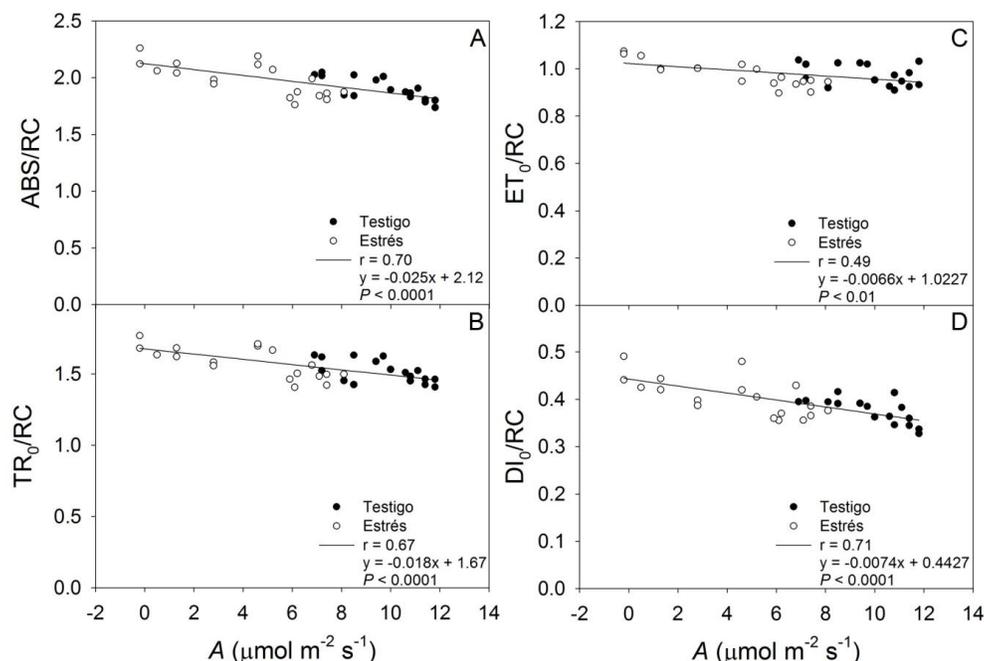
Parámetro	<i>A</i>	$g_s$	<i>Tr</i>	<i>Int</i> CO <sub>2</sub>	LT	$\Psi_S$	$\Psi_L$
$\Psi_S$	0.88***	0.93***	0.91***	0.88***	-0.43**	1	0.78***
$\Psi_L$	0.79***	0.78***	0.76***	0.79***	-0.53***	0.78***	1
$t_{FM}$	-0.38*	-0.47**	-0.24	0.30	0.76***	-0.31	-0.47**
Área	0.21	0.11	0.15	0.09	0.22	0.18	-0.08
$F_0$	-0.29	-0.16	-0.13	0.17	0.17	-0.05	0.07
$F_M$	0.03	0.09	-0.001	-0.07	-0.05	0.11	0.09
$F_V$	0.08	0.13	0.02	-0.10	-0.09	0.12	0.08
$M_0$	-0.49**	-0.32	-0.40*	0.17	0.04	-0.31	-0.15
EC/RC	0.17	0.05	0.16	0.14	0.28	0.13	-0.11
ABS/RC	-0.56***	-0.37*	-0.38*	0.31	0.28	-0.32	-0.40*
TR <sub>0</sub> /RC	-0.53***	-0.34*	-0.39*	0.27	0.24	-0.30	-0.24
ET <sub>0</sub> /RC	-0.35*	-0.23	-0.21	0.29	0.39*	-0.17	-0.26
RE <sub>0</sub> /RC	0.28	0.26	0.30	0.28	0.17	0.30	0.06
$\varphi_{P_0} = TR_0/ABS$	0.23	0.18	0.05	-0.19	-0.18	0.10	-0.004
$\psi_{E_0} = ET_0/TR_0$	0.34*	0.21	0.31	-0.03	0.15	0.23	0.01
$\varphi_{E_0} = ET_0/ABS$	0.35*	0.23	0.27	-0.09	0.06	0.22	0.01
$\delta_{R_0} = RE_0/ET_0$	0.44**	0.37*	0.41*	0.19	0.04	0.40*	0.18
$\varphi_{R_0} = RE_0/ABS$	0.46**	0.37*	0.41*	0.12	0.03	0.39*	0.15
RC/ABS	0.53***	0.35*	0.36*	-0.28	-0.26	0.29	0.38*
RC/CS <sub>0</sub>	0.57***	0.41*	0.48**	-0.29	-0.24	0.45**	0.46**
DI <sub>0</sub> /RC	-0.49**	-0.35	-0.27	0.32	0.29	-0.26	-0.14
PI <sub>ABS</sub>	0.46**	0.30	0.33*	-0.16	-0.08	0.28	0.08
$PI_{total}$	0.52***	0.38*	0.41*	0.02	-0.06	0.40*	0.14

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



**Figura VI.6.** Relación entre la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> y (A) la probabilidad de que un excitón capturado mueva un electrón hacia la cadena de transporte de electrones más allá de Q<sub>A</sub><sup>-</sup>, (B) la producción cuántica para el transporte de electrones, (C) la eficiencia con la cual un electrón de los acarreadores de electrones intersistemas se mueve para reducir los aceptores de electrones finales en el lado aceptor del FSI, (D) el aumento en la producción cuántica para la reducción de los aceptores de electrones finales en el lado aceptor del FSI, (E) con los centros de reacción reductores de Q<sub>A</sub> por clorofila antena del FSII, (F) la cantidad de centros de reacción activos del FSII por sección cruzada al tiempo 0, (G) el aumento en el índice de desempeño (potencial) para la conservación de la energía de los fotones absorbidos por el FSII para la reducción de los aceptores de electrones intersistemas y (H) con el aumento del índice de desempeño (potencial) para la conservación de la energía de los fotones absorbidos por el FSII para la reducción de los aceptores finales del FSI en plantas de *C. annuum*. Los valores corresponden a plantas individuales ( $n = 36$ ).

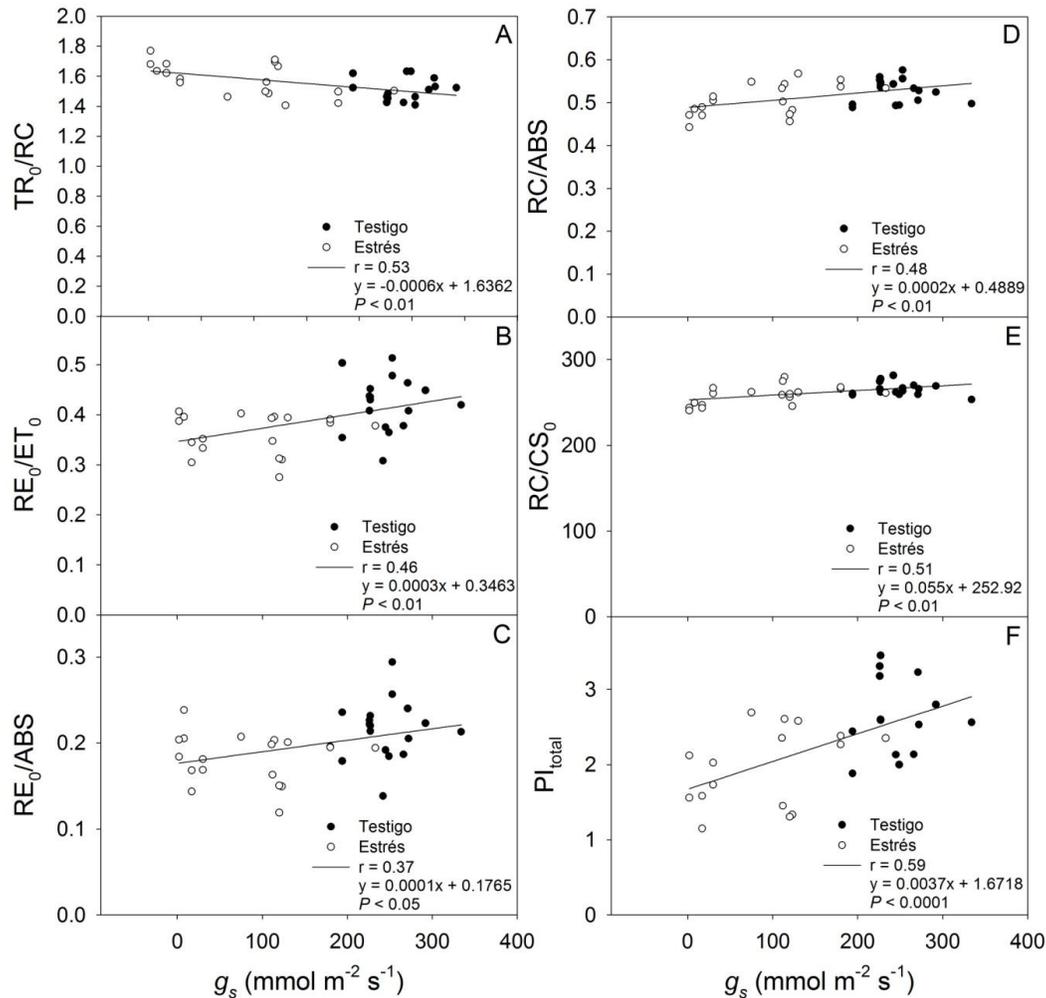
A su vez, el aumento en las tasas de asimilación de CO<sub>2</sub> estuvo asociado a una disminución del flujo de absorción por centro de reacción (Fig. VI.7 A), del flujo de energía capturada por centro de reacción (Fig. VI.7 B), del transporte de electrones por centro de reacción (Fig. VI.7 C) y del flujo de energía disipada por centro de reacción al tiempo 0 (Fig. VI.7 D).



**Figura VI.7.** Relación entre la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> y (A) el flujo de absorción por centro de reacción, (B) el flujo de energía capturada por centro de reacción, (C) el flujo de transporte de electrones por centro de reacción y (D) el flujo de energía disipada por centro de reacción al tiempo 0 en plantas de *C. annuum*. Los valores corresponden a plantas individuales ( $n = 36$ ).

Por otra parte, se encontró una relación lineal negativa significativa ( $P < 0.05$ ) entre el aumento en la  $g_s$  y el flujo de energía capturada por centro de reacción (Fig. VI.8 A). Similarmente,  $g_s$  aumentó ( $P < 0.05$ ) conforme incrementó la probabilidad con la cual un electrón de los acarreadores de electrones intersistemas es transferido para reducir los aceptores de electrones finales del lado aceptor del FSI (Fig. VI.8 B), con la producción cuántica para la reducción de los aceptores de electrones finales en el lado aceptor del FSI

(Fig. VI.8 C), con el aumento de los centros de reacción reductores de  $Q_A$  por Chl antenna del FSII (Fig. VI.8 D), con los centros de reacción reductores de  $Q_A$  por sección cruzada excitada (Fig. VI.8 E) y con el aumento en el índice de desempeño para la conservación de la energía de los fotones absorbidos por el FSII para la reducción de los aceptores finales del FSI (Fig. VI.8 F).



**Figura VI.8.** Relación entre la conductancia estomática ( $g_s$ ) y (A) el flujo de energía capturada por RC; (B) probabilidad con la cual un electrón de los acarreadores de electrones intersistemas es transferido para reducir los aceptores de electrones finales del lado aceptor del FSI; (C) la producción cuántica para la reducción de los aceptores de electrones finales en el lado aceptor del FSI; (D) centros de reacción reductores de  $Q_A$  por Chl antenna del FSII; (E) centros de reacción reductores de  $Q_A$  por sección cruzada excitada; y (F) el índice de desempeño para la conservación de la energía de los fotones absorbidos por el FSII para la reducción de los aceptores finales del FSI en plantas de *C. annuum*. Los valores corresponden a plantas individuales ( $n = 36$ ).

## VI.6. Discusión

### VI.6.1. Respuesta al estrés hídrico

La restricción en el suministro de agua disminuye la conductancia estomática, la conductancia del mesófilo, la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> y la capacidad fotosintética (Flexas *et al.*, 2006; Lawlor y Tezara, 2009). En el presente estudio, la suspensión del riego disminuyó el  $\Psi_S$  y el  $\Psi_L$  hasta -0.6 y -1.2 MPa respectivamente, lo que redujo la  $g_s$  hasta valores de 25 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Fig. VI.1 y VI.2). Dicha reducción en la capacidad difusiva de la hoja es debida al menos a dos componentes que son regulados casi simultáneamente: el cierre estomático y la reducción en la conductancia del mesófilo (Flexas *et al.*, 2006). Además, se encontró una relación no lineal entre la  $g_s$  y la  $A$  (Fig. VI.3 A) y una lineal entre la  $g_s$  y  $Tr$  (Fig. VI.3 B), lo que indica que puede presentarse un cierre considerable de los estomas sin cambios o decrementos muy ligeros en la fotosíntesis, pero que significan una reducción considerable en la pérdida de agua por transpiración en los estados iniciales de desarrollo del estrés. Posteriormente, el estrés hídrico redujo la  $A$  (Fig. VI.1 B y VI.2 A) e indujo una presión en el desempeño del FSII (Fig. VI.4 y VI.5). De esta manera, los resultados presentados en las Figuras VI.4 y VI.5 sugieren que en las condiciones de estrés hídrico generadas la maquinaria fotosintética fue regulada a nivel de los centros de reacción (inactivación) a nivel de la captura de la energía de excitación; y a nivel de la transformación de la energía de excitación capturada a energía para la reducción de los aceptores finales del FSI. En general, la disminución de la  $g_s$  y de la capacidad fotosintética causa un consumo menor de NADPH y ATP en el Ciclo de Calvin y aumenta la necesidad para disipar energía de manera controlada dentro del FSII y las rutas alternativas de electrones (Lawlor y Tezara, 2009). El desempeño del FSII se evaluó utilizando el  $PI_{total}$ , dicho índice depende de los parámetros que cuantifican cambios en la antena, los centros de

reacción, el transporte de electrones y la reducción de los aceptores finales de electrones. En consecuencia, el  $PI_{total}$  integra la respuesta de  $RC/ABS$ ,  $TR_0/ABS$ ,  $ET_0/TR_0$  y  $RE_0/ET_0$ . Los resultados mostraron que el estrés hídrico redujo el  $PI_{total}$  vía una reducción en  $RC/ABS$  y  $RE_0/ET_0$  en las plantas de *C. annuum* (Fig. VI.4). Esto es consistente con estudios previos que demuestran la respuesta del  $PI_{total}$  a la sequía en donde dicho comportamiento se debe principalmente a impactos en  $RE_0/ET_0$  (Oukarroum *et al.*, 2009; Albert *et al.*, 2011). La producción cuántica máxima  $TR_0/ABS$  ( $=F_V/F_M$ ) no fue afectado por el estrés hídrico (Fig. VI.4 A), lo que está acorde con otros estudios (Oukarroum *et al.*, 2009; Albert *et al.*, 2011), y confirma una estabilidad alta de la eficiencia fotoquímica potencial del FSII; sin embargo, este parámetro sólo es sensitivo a cambios en  $F_0$  y  $F_M$  (Yusuf *et al.*, 2010), aunque existe evidencia de la disminución de  $F_V/F_M$  en condiciones de sequía severa (Filella *et al.*, 1998).

#### VI.6.2. Relación entre la fluorescencia de clorofila a y la fotosíntesis

El estudio confirma el efecto del estrés hídrico en la fotosíntesis de la hoja observado en otras plantas (Oukarroum *et al.*, 2007; Van Heerden *et al.*, 2007). Sin embargo, se enfoca la atención hacia el hecho de que algunos de los parámetros del intercambio de gases de la hoja se correlacionaron significativamente con los parámetros del aumento polifásico de la fluorescencia de Chl *a* obtenidos con la prueba JIP (Cuadro VI.1). La fluorescencia monitoreada directamente es particularmente útil para la evaluación del estrés hídrico a largo plazo. A continuación se examina la relación entre la tasa de asimilación de  $CO_2$  y los parámetros de la prueba JIP de las curvas de inducción de la fluorescencia y su significado fisiológico.

La primera parte de la traza (O-J) es llamada “la región de recambio individual” que expresa los eventos fotoquímicos y representa un evento individual de reducción de  $Q_A$  (Strasser *et al.*, 2004). Valores menores de  $\Psi_{E_0} = ET_0/TR_0$  asociados a tasas bajas de asimilación de  $CO_2$  (Fig. VI.6 A) indican una disminución de la reducción primaria de  $Q_A$ . Esto es consecuencia de la disminución del transporte de electrones más allá de  $Q_A^-$ , lo que limita la reacción de reoxidación (Haldimann y Strasser, 1999). La región J-I-P (fase térmica) de la traza de fluorescencia y los parámetros relacionados de la prueba JIP ( $\delta_{R_0} = RE_0/ET_0$  y  $\phi_{R_0} = RE_0/ABS$ ) reflejan la velocidad de la reducción de ferredoxina más allá del FSI (Schansker *et al.*, 2003). Estos parámetros estuvieron correlacionados significativamente con las tasas de asimilación de  $CO_2$  (Fig. VI.6 C y D) y pueden ser considerados como indicadores tempranos del estrés hídrico. Además de la disminución de la reducción química de la ferredoxina se sabe que el estrés hídrico modifica la cantidad y actividad de la Rubisco (Lawlor y Tezara, 2009). Lo que aunado a las alteraciones que se presentan más allá del FSI pueden explicar la disminución de la fotosíntesis neta como una respuesta temprana al estrés hídrico.

Los índices de desempeño  $PI_{ABS}$  y  $PI_{total}$  son producto de los términos que expresan los potenciales parciales para la conservación de la energía desde el excitón hasta la reducción de los aceptores de electrones intersistemas y hasta la reducción de los aceptores finales del FSI respectivamente (Strasser *et al.*, 2010). El  $PI_{ABS}$  y  $PI_{total}$  se correlacionó de una manera no lineal positiva con las tasas de asimilación de  $CO_2$  (Fig. VI.6 G y H). La disminución de ambos índices fue debida a la disminución de  $RC/ABS$  y  $ET_0/TR_0$  en el

$PI_{ABS}$  y además de la menor  $RE_0/ET_0$  en el  $PI_{total}$ , que aunado a la disminución de las concentraciones de  $CO_2$  intercelular, debidas al cierre estomático, origina una discrepancia entre la tasa del transporte de electrones y  $A$ ; así, las hojas absorben más energía radiante que la que pueden utilizar para la fijación de carbono en condiciones de estrés hídrico. Las  $A$  se correlacionaron positivamente y de manera no lineal con  $RC/CS_0$  (Fig. VI.6 F), que expresa la densidad de los centros de reacción activos en relación a los inactivos (Strasser *et al.*, 2004), éstos últimos actúan como “pozas de calor” y son considerados parte de un mecanismo de regulación que disipa el exceso de energía absorbida en forma controlada (Bussotti *et al.*, 2011). En este sentido, la caída de la  $A$  se relacionó linealmente y de una manera negativa con  $DI_0/RC$ , que cuantifica el flujo de energía disipada por centro de reacción (Fig. VI.7 D). Así, el FSII cambia de un proceso que convierte energía lumínica en energía metabólica almacenada a un proceso de conversión de la energía lumínica absorbida en calor y protege al aparato fotoquímico. Además, la disipación segura del exceso de energía puede continuar a través de procesos de transporte de electrones incluso cuando la  $A$  disminuye (Flexas *et al.*, 2002). Estos procesos incluyen la fotorrespiración (Wu *et al.*, 1991), la ruta Mehler-ascorbato (Asada, 1999) y el flujo de electrones cíclico del FSII (Canaani y Havaux, 1990) o el FSI (Katona *et al.*, 1992).

Las trazas OJIP dependen de las propiedades cinéticas de la cadena de transporte de electrones y una cuestión relevante por describir es la relación entre estas propiedades y el crecimiento de la planta (Oukarroum *et al.*, 2009). Van Heerden *et al.* (2007) observaron una correlación alta entre la disminución en  $A$  y la reducción de los valores del índice de desempeño  $PI_{ABS}$  en dos arbustos del desierto *Augea capensis* y *Zygophyllum prismatocarpum*. Ellos sugieren que esta observación es evidencia de la relación entre los

cambios de la traza OJIP y la capacidad fotosintética total. Recientemente, la introducción de los parámetros RE ( $\varphi_{Ro} = RE_0/ABS$  y  $\delta_{Ro} = RE_0/ET_0$ ) y el parámetro relacionado  $PI_{total}$  (Strasser *et al.*, 2010) han aportado elementos a la discusión acerca de las relaciones entre el aumento rápido de la fluorescencia y el intercambio de gases (Bussotti *et al.*, 2011). En un estudio de estrés por ozono Cascio *et al.* (2010) encontraron una relación estrecha entre  $\varphi_{Ro}$  y  $A$  en condiciones de luminosidad alta. En el presente estudio los resultados mostraron una correlación significativa entre las  $A$  y  $RE_0/ET_0$ ,  $RE_0/ABS$  y  $PI_{total}$  en condiciones de estrés hídrico (Fig. VI.6 C, D y H). Similar a los efectos del ozono observados por Bussotti *et al.* (2011), es posible que este comportamiento se deba a que la eficiencia potencial total ( $PI_{total}$ ) de las plantas es en gran medida determinada por la forma de la región I-P del aumento polifásico de la fluorescencia y a que la amplitud de la fase I-P expresa la abundancia de FSI (Schansker *et al.*, 2003; 2005) por lo que existe una relación FSI/FSII alta, lo que permite la reducción rápida de la ferredoxina y en consecuencia valores de  $A$  potencialmente altos en condiciones de riego normales, por lo que lo opuesto puede ocurrir en la presencia de estrés hídrico.

### VI.6.3. Relación entre la conductancia estomática y la fluorescencia de clorofila *a*

La  $g_s$  está relacionada directamente con la fijación de  $CO_2$  fotosintético en el mesófilo (Farquhar y Wong, 1984; Mansfield *et al.*, 1990) y el presente estudio no es la excepción (Fig. VI.3 A). La cercana relación entre la fotosíntesis y el comportamiento estomático ha llevado a la hipótesis de que la respuesta de las células guarda está ligada a la capacidad fotosintética del mesófilo vía una señal de éste último o mediante la fotosíntesis de las células guarda, la que puede proveer un metabolito señal (Wong *et al.*, 1979;

Lawson, 2009). El tamaño de la reserva de ATP del cloroplasto fue propuesto por Farquhar y Wong (1984) como el posible metabolito, una teoría que fue construida después por Buckley *et al.* (2003), mientras que la zeaxantina fue propuesta posteriormente por Zeiger y Zhu (1998) en vista de la correlación alta entre la concentración de zeaxantina y la apertura estomática. Sin embargo, el debate de cuando los cloroplastos de las células guarda y/o la fotosíntesis de las células guarda tienen efecto directo en la coordinación de los movimientos estomáticos en relación a la demanda fotosintética de CO<sub>2</sub> del mesófilo permanece sin resolver (Lawson, 2009).

Los resultados de este estudio mostraron que algunos parámetros de la prueba JIP a partir del aumento rápido de la fluorescencia de Chl *a*, son indicadores adecuados de la disminución de  $g_s$  durante el estrés hídrico. En efecto, los parámetros consolidan la cascada de eventos que siguen al cierre estomático en respuesta al estrés hídrico (Fig. VI.8). Así, el aumento de  $g_s$  estuvo relacionado significativamente al aumento de RE<sub>0</sub>/ET<sub>0</sub> y RE<sub>0</sub>/ABS, parámetros que reflejan la velocidad de la reducción química de ferredoxina más allá del FSI (Schansker *et al.*, 2003), a un aumento de RC/ABS, que es proporcional a la fracción de energía absorbida por las antenas del FSII (excitación) que alcanza los centros de reacción (Yusuf *et al.*, 2010), al aumento de la densidad de los centros de reacción activos en relación a los inactivos (RC/CS<sub>0</sub>) y a un aumento en el índice de desempeño PI<sub>total</sub>, que expresa el potencial total para la conservación de la energía dependiente de todas las eficiencias para la transducción de energía secuencial; por lo que, se deduce que  $g_s$  potencialmente altas están asociadas a un desempeño fotosintético adecuado basado en la absorción de luz hasta la reducción de los aceptores de electrones finales del FSI. Esta relación puede ser, en parte, promovida por el componente estomático mediado por la

fotosíntesis y su respuesta a la luz. Se reconoce que la respuesta estomática a la luz tiene al menos dos componentes; uno de ellos es independiente de la fotosíntesis, es la respuesta específica a la luz azul que satura a bajas tasas de flujo y es generalmente asociado con la apertura estomática rápida (Zeiger *et al.*, 2002) y se cree involucra la activación de una H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática (Kinoshita y Shimazaki, 1999; Shimazaki *et al.*, 2007). El otro componente es una respuesta mediada por la fotosíntesis, satura a altas tasas de flujo similares a aquellas que saturan a la fotosíntesis de las células guarda y del mesófilo y es inhibida por la 3-(3,4-diclorofenil)- 1,1-dimetilurea (DCMU, un inhibidor del FSII), indicando que es dependiente de la fotosíntesis (Messinger *et al.*, 2006) y sugiriendo que la clorofila es el receptor (Assmann y Shimazaki, 1999; Zeiger *et al.*, 2002). Se cree que el segundo componente opera a través del consumo de CO<sub>2</sub> conducido por el mesófilo y reduce la concentración interna de CO<sub>2</sub> (Roelfsema *et al.*, 2006) a la cual el estoma responde (Mott, 1988). Además, la apertura estomática es regulada por factores fisiológicos internos y factores ambientales externos, y su respuesta sucede en segundos o en horas. En general, la apertura estomática dependiente de los movimientos de las células guarda es estimulado por la luz en la longitud de onda fotosintéticamente activa, concentraciones bajas de CO<sub>2</sub> y humedad alta, mientras que el cierre es promovido por la oscuridad, humedad baja, temperaturas altas, concentraciones altas de CO<sub>2</sub> y hormonas vegetales, como el ácido abscísico (ABA) (Lawson, 2009). Además, en condiciones de déficit de agua los cambios de  $g_s$  dependen de factores hidráulicos (CRA,  $\Psi$  y turgencia) en el aparato estomático, incluyendo transporte de agua a través de las membranas y procesos metabólicos, como los relacionados al ABA (Lawlor y Tezara, 2009). La regulación de  $g_s$

está entonces integrada al metabolismo fotosintético y al ambiente de una manera aún no entendida totalmente (Buckley, 2005).

#### *VI.6.4. El índice de desempeño $PI_{total}$ como una herramienta para monitorear el estrés hídrico y programar los riegos*

El  $PI_{total}$  es uno de los parámetros más sensitivos de la prueba JIP debido a que incorpora varios parámetros que son evaluados a partir de las trazas de fluorescencia y que son la producción cuántica máxima de la fotoquímica primaria ( $\phi_{P_0}$ ), la probabilidad para mover un electrón más allá de la  $Q_A^-$  ( $\psi_{E_0}$ ), la probabilidad para reducir un aceptor final de electrones ( $\delta_{R_0}$ ) y la proporción RC/ABS, por lo que cualquier cambio en la traza OJIP se expresa en el  $PI_{total}$  (Yusuf *et al.*, 2010). La relación observada entre el  $PI_{total}$  y la  $g_s$  (Fig. VI.8 F) puede proveer un método para la detección del estrés hídrico. Sin embargo, la correlación fue baja, lo que debería aumentar para considerarse como un prerrequisito para usarse como herramienta en el monitoreo del estrés hídrico. Aunque la dispersión de los datos puede deberse a cierta variabilidad entre los individuos, la principal causa para la dispersión de ellos fue la metodología de muestreo. Cuando se utilizó el CIRAS-1, para medir el intercambio de gases, y los clips foliares, para la medición de la fluorescencia, las mediciones se hicieron en áreas cercanas, pero distintas. Esta parece ser la principal causa de la dispersión mencionada, especialmente porque se conoce que la fotosíntesis de la hoja presenta una distribución heterogénea durante el estrés hídrico (Osmond *et al.*, 1999). La medición simultánea del intercambio de gases y fluorescencia sobre la misma área probablemente podría solventar este problema.

Interesantemente, la relación entre el  $PI_{total}$  y  $g_s$  fue lineal (Fig. VI.8 F), lo que implica que es un indicador sensible al cierre estomático durante todas las etapas de desarrollo del estrés hídrico en la planta. En plantas de *C. annuum* en condiciones de déficit de agua moderada por ejemplo, cuando la fotosíntesis es principalmente limitada por  $g_s$ , una recuperación completa de la fotosíntesis debe ocurrir posterior al riego, dado que se ha demostrado que en plantas de *C. annuum* con conductancias menores a  $25 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  la fotosíntesis se recupera dos días después del riego (Capítulo IV.4.2). Por lo tanto, el monitoreo apropiado del  $PI_{total}$  puede ser una herramienta útil para decidir cuándo debe ser aplicado el riego de manera que las plantas puedan mantenerse dentro de un límite entre un estrés incipiente y el consumo de agua máximo, y hacer así un uso racional del agua de riego. Además, medir y procesar los datos de fluorescencia es una rutina rápida y la señal de fluorescencia de Chl *a* medida *in situ* e *in vivo* son registradas en un fluorómetro portátil que hace el análisis adecuado para la aplicación en campo (Maldonado-Rodriguez *et al.*, 2003). Dicha tecnología que utiliza a la planta como un indicador del requerimiento de agua (antes que al estado hídrico del suelo) tiene el potencial de reducir en gran medida el uso del agua en la agricultura comercial, altamente mecanizada, e incrementar significativamente la producción de biomasa por unidad de agua utilizada (Morison *et al.*, 2008).

## VI.7. Conclusiones

La inhibición de la asimilación de  $CO_2$  durante el estrés probablemente fue el resultado de limitaciones difusivas en el mesófilo. Además, la prueba JIP, a través de la generación de parámetros que describen el transporte de electrones fotosintético, indicó un

desacoplamiento de la función del FSII por la desactivación de los centros de reacción, y la disminución consecuente de la capacidad del transporte de electrones hasta la reducción de los aceptores de electrones finales en el FSI. Ciertos parámetros que describen el transporte de electrones fotosintético derivados del aumento rápido de la fluorescencia de Chl *a* (medidos por la prueba JIP) se correlacionaron significativamente con  $A$  y  $g_s$ . Por lo tanto, la medición de la fluorescencia de Chl *a* con un instrumento portátil (PEA) es un método adecuado para la detección temprana del estrés hídrico y puede ser una guía útil para la programación de las aplicaciones de riego. Además, el uso de la fluorescencia puede potencializarse debido al desarrollo reciente de sistemas de imágenes de fluorescencia que acopladas a sistemas de muestreo automatizados para evaluar el nivel de estrés de las planta, podrían ser utilizados para controlar los sistemas de riego permitiendo a los sistemas agrícolas hacer un uso más eficiente del agua y optimizar la producción de los cultivos.

## VII. Discusión general

El déficit de agua en el suelo es uno de los principales factores limitantes del crecimiento de las plantas y de la productividad agrícola mundial (Morison *et al.*, 2011). La escasez de agua puede aumentar en el futuro cercano en varias regiones del mundo debido al cambio climático (IPCC, 2007) y a la urbanización. Se predice que la población mundial se duplicará en los siguientes 50 años, por lo que deben obtenerse mayores rendimientos de las áreas agrícolas actuales conjuntamente con áreas marginales (Chaves y Davies, 2010). La necesidad de más agua para las ciudades conforme la población crece significa menos agua disponible para la irrigación, por lo que la mayor proporción del alimento mundial debe provenir de áreas propensas a la sequía. La productividad de los cultivos en las mejores tierras y en los ambientes favorables se está aproximando a su máximo teórico, por lo que para satisfacer la demanda mundial de alimento se requiere producir en ambientes menos favorables y optimizar el uso de agua agrícola (Passioura y Angus, 2010).

La fotosíntesis es central para todos los aspectos de la biología de las plantas ya que es la proveedora de la energía y fotoasimilados necesarios para el crecimiento y la reproducción, a pesar de esto los mecanismos de regulación por el estrés abiótico como el generado por el déficit de agua, no son conocidos completamente (Lawlor *et al.*, 2009). La habilidad de las plantas para adaptarse y/o aclimatarse a diferentes ambientes está directa o indirectamente relacionada con la plasticidad y resistencia de la fotosíntesis, en combinación con otros procesos que determinan el crecimiento de las plantas y el desarrollo (Chaves *et al.*, 2011). El éxito evolutivo depende en la regulación integrada y efectiva de estos procesos a nivel de toda la planta (Lawlor, 2009). Identificar las limitaciones y los procesos regulativos de la fotosíntesis durante el déficit de humedad es

esencial para minimizar (o para perfeccionar a través del mejoramiento genético), el impacto negativo del estrés en los cultivos agrícolas y para proteger el funcionamiento del ecosistema (Chaves *et al.*, 2011). Además, actualmente las diferencias en la respuesta de plantas  $C_3$  y MAC son parcialmente conocidas y sus mecanismos son aún poco claros (Lawlor, 2009). Conjuntamente, las condiciones ambientales adversas como el exceso de luz y la limitada asimilación de  $CO_2$  debido a la sequía o a la poca disponibilidad de agua, causa un desbalance entre el transporte de electrones y las reacciones de oscuridad, perturbando la homeostasis de la fotosíntesis (Lawlor, 2009), incluso una gran parte de la resistencia de las plantas a la sequía está mediada por su habilidad para disipar el exceso de radiación incidente (Munns, 2011). Así, el estudio de los efectos del déficit de agua en la fotosíntesis de plantas cultivadas  $C_3$  y MAC es de interés y crucial para la predicción del crecimiento y rendimiento de las plantas, creciendo con agua suficiente y en situaciones de estrés hídrico.

#### *VII.1. Suculencia en la planta MAC en comparación con la planta $C_3$*

Los resultados de esta investigación mostraron que los cambios causados por el déficit de agua en la planta  $C_3$  fueron más rápidos (10 d) que en la plantas MAC (115 d), esta adaptación al déficit de agua en las plantas MAC se debió principalmente a la succulencia y al metabolismo ácido Crasuláceo. En las plantas, la succulencia es definida como la presencia de tejidos gruesos en los órganos foliares en los cuales la función primaria es para almacenar agua y en consecuencia la evasión de la sequía (Bobich y North, 2009). El tejido succulento está compuesto principalmente de parénquima con paredes engrosadas y con paredes celulares altamente extensibles que tienen un módulo de

elasticidad bajo comparado con las paredes celulares del clorenquima y de otros tejidos, como el esclerénquima y el xilema secundario (Goldstein *et al.*, 1991; Niklas y Buchman, 1994). Así, la planta MAC mantuvo  $\Psi_L$  altos conforme el contenido relativo de agua disminuía (Fig. V.2 y V.3). La habilidad para mantener la turgencia durante la desecación del tejido es uno de los factores que explican la tendencia de las suculentas para tener  $\Psi_L$  relativamente altos en condiciones de sequía (Ogburn y Edwards, 2010). Así aunque comúnmente se piensa que una de las características más importantes de las plantas suculentas es la habilidad de almacenar y mantener grandes cantidades de agua, las relaciones hídricas indican algo paradójico, su habilidad para perder grandes volúmenes de agua mientras se mantienen  $\Psi_L$  altos es también de importancia crucial.

## VII.2. Efecto del estrés hídrico en la fotosíntesis de las plantas estudiadas $C_3$ y MAC

### VII.2.1. Limitaciones estomáticas

Los resultados mostraron que el cierre estomático fue una de las primeras respuestas al estrés hídrico, tanto en la planta  $C_3$  (Fig. IV.2) como en la MAC (Fig. V.20), lo que las protege de la pérdida excesiva de agua. Sin embargo, las plantas MAC tienen una ventaja sobre las plantas  $C_3$  ya que el metabolismo ácido de Crasulácea substancialmente mejora la eficiencia en el uso del agua mediante la toma de  $CO_2$  parcial o predominantemente durante la noche (Fig. V.19) y mantiene cerrados los estomas durante el día minimizando la pérdida de agua por transpiración en los momentos de mayor demanda evaporativa (Fig. V.21 C). Aunado a la separación temporal de los procesos de carboxilación  $C_3$  y  $C_4$  que definen a las MAC y que las provee con una mayor plasticidad para optimizar la ganancia de carbono y el uso del agua en respuesta al estrés hídrico restringiendo el periodo de toma de  $CO_2$

durante un periodo de 24 h (Fig. V.19 A y B). En ese comportamiento, conocido como MAC ralentizado e inducido durante el estrés hídrico severo, los estomas permanecen completamente cerrados y el CO<sub>2</sub> respiratorio es reciclado vía la ruta MAC, permitiendo a la planta mantener las funciones metabólicas básicas mientras se minimiza la pérdida de agua (Ogburn y Edwards, 2010).

Se asume que el cierre de los estomas en respuesta al déficit de agua es la causa principal de la disminución de la fotosíntesis por el estrés hídrico, dado que el cierre estomático disminuye la disponibilidad de CO<sub>2</sub> en el mesófilo (Athar y Ashraf, 2005). Así, la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> de las hojas C<sub>3</sub> disminuyó con la caída del  $\Psi_L$  (Fig. IV.2), similarmente la ETR aparente de las hojas MAC, una medida de la capacidad fotosintética, disminuyó conforme se redujo el RWC y el  $\Psi_L$  de las hojas (Fig. V.8 B y D). Se considera que la limitación estomática reduce la A y las concentraciones de CO<sub>2</sub> en el interior de la hoja lo que inhibe el metabolismo (Athar y Ashraf, 2005). A pesar de la evidencia de que el estoma juega un papel importante en la limitación de la asimilación de CO<sub>2</sub> en condiciones de estrés hídrico en ambas rutas metabólicas, existen discrepancias que están principalmente relacionadas al inicio de las limitaciones estomáticas, las cuales se desarrollan rápidamente en la planta C<sub>3</sub> y de manera más aletargada en la planta MAC.

#### *VII.2.2. Limitaciones no estomáticas: efecto en los eventos fotoquímicos*

En condiciones de riego, las plantas C<sub>3</sub> usan una gran fracción de la luz absorbida a través de la fotosíntesis. En condiciones de estrés hídrico, el requerimiento de luz disminuye e incluso bajas intensidades de luz pueden saturar el aparato fotosintético

(Lawlor y Tezara, 2009), por lo que el exceso de luz absorbida por el aparato fotosintético puede causar fotoinhibición (Athar y Ashraf, 2005). Los resultados mostraron una predisposición a la fotoinhibición en respuesta al déficit de agua indicada como una disminución en  $F_v/F_m$  principalmente en la planta MAC después de 90 d sin agua (Fig. V.15; TR<sub>0</sub>/ABS), con un efecto casi nulo en la planta C<sub>3</sub> (Fig. IV.8 A), lo que sugiere que en esta última el estrés hídrico tiene poco efecto en la producción cuántica máxima de la fotoquímica primaria, similarmente a lo encontrado en *Hordeum vulgare* L. (Oukarroum *et al.*, 2007). Por otra parte, el resultado de la fotoinhibición es un desacoplamiento del transporte de electrones seguido de la degradación selectiva de la proteína D1 en el FSII (Murata, 2007), así en las plantas MAC cuando la actividad MAC es limitada por aspectos difusivos (cierre de estomas a las 24 h, Fig. V.20 A y B) y la capacidad de disipación de la energía por el ciclo de las xantofilas es rebasado por la sequía prolongada, sucede la acumulación de centros de reacción inactivos con la subsecuente degradación de D1 (Pieters *et al.*, 2003).

La fluorescencia, emitida principalmente por las moléculas de clorofila *a* en la antena del FSII, puede servir como una prueba intrínseca para monitorear los pasos sucesivos en la transformación de la energía de excitación (Stirbet y Govindjee, 2011). La parte variable de la fluorescencia está directamente relacionada a la reducción de la Q<sub>A</sub> y siempre aumenta durante la reducción fotoinducida del aceptor Q<sub>A</sub> (Goltsev *et al.*, 2012). Como el nivel de reducción de la Q<sub>A</sub> depende de los estados posteriores de transformación de la energía, la señal de fluorescencia es sensitiva al total de los procesos en la transferencia de electrones. Al utilizar el enfoque de la prueba JIP (Strasser *et al.*, 2004), los distintos pasos y fases del aumento rápido de la fluorescencia (trazas OJIP) pueden ser

ligados con las eficiencias de la transferencia de electrones en el FSII, FSI y entre los dos fotosistemas. La forma de la curva de inducción de la fluorescencia fue sensitiva al desarrollo del estrés hídrico en el tejido foliar en la planta C<sub>3</sub> (Fig. IV.4) y en la MAC (Fig. V.12 A). El análisis de varios parámetros de la prueba JIP permitió localizar las modificaciones inducidas por el estrés hídrico en la cadena del transporte de electrones tanto en la planta C<sub>3</sub> (Fig. IV.5 y IV.6) como en la planta MAC (V.15-V.17). Se encontró que las reacciones redox fueron fuertemente afectadas por el estrés hídrico, similar a lo reportado por Goltsev *et al.* (2012) en frijol. Las producciones cuánticas de las reacciones cercanas a los centros de reacción del FSII fueron más tolerantes al déficit de agua (Fig. IV.5 y V.15). Los tres parámetros JIP que reflejan las producciones cuánticas de la transferencia de electrones fotoinducidas del P680 a la Q<sub>A</sub> ( $\varphi_{P_0} = TR_0/ABS$ ), de la Q<sub>A</sub> a la PQ ( $\varphi_{E_0} = ET_0/ABS$ ) y de la PQ al aceptor de electrones del FSI ( $\varphi_{R_0} = RE_0/ABS$ ), pueden ser arreglados acorde a su disminución en la sensibilidad al déficit de agua en la secuencia  $\varphi_{R_0} > \varphi_{E_0} > \varphi_{P_0}$  tanto en la planta C<sub>3</sub> como en la MAC. Sin embargo entre las dos rutas metabólicas resalta una diferencia notable, en la planta MAC el  $\varphi_{R_0}$  aumenta marcadamente en respuesta al estrés (Fig. V.15;  $RE_0/ABS$ ) mientras que en la C<sub>3</sub> disminuye (Fig. IV.6;  $RE_0/ABS$ ), aun más en las plantas MAC el parámetro que cuantifica la eficiencia con la cual los electrones son transferidos de los acarreadores intersistemas a los aceptores finales en el FSI ( $\delta_{R_0} = RE_0/ET_0$ ) también aumentó (Fig. V.17), mientras que en la planta C<sub>3</sub> tendió a disminuir (Fig. IV.6). A este respecto Li y Ma (2012) encontraron, durante la deshidratación en luz artificial de hojas de *Malus domestica* un aumento en dos parámetros de fluorescencia que cuantifican la eficiencia, que un electrón se mueva para reducir los aceptores de electrones finales en el lado aceptor del FSI ( $RE_0/TR_0$ ) y  $\delta_{R_0}$ , lo que significa

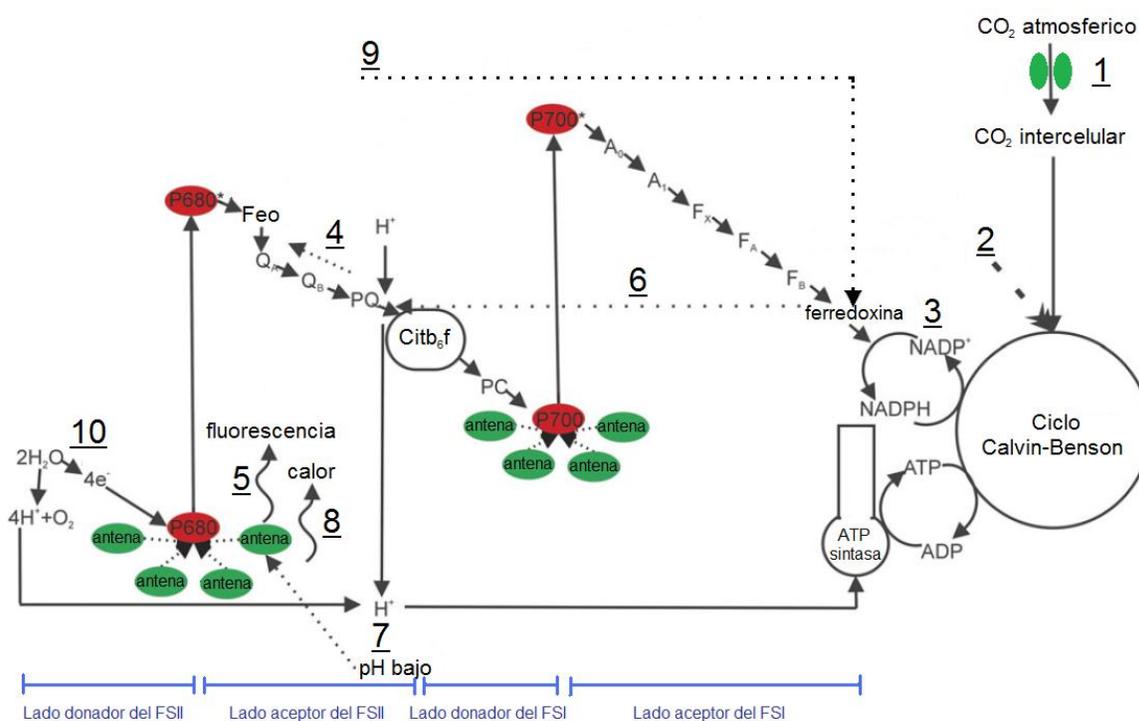
que en comparación con la capacidad de captura de electrones o del transporte de electrones provenientes de los acarreadores de electrones intersistemas del lado donador, la capacidad de aceptar electrones en el lado aceptor del FSI es mayor y está principalmente determinada por los contenidos de plastocianina y P700. Así, parece que en la planta MAC la tolerancia del aparato fotosintético al estrés hídrico está en parte ligada al mantenimiento o aumento de la actividad del FSI y la consecuente función protectora del transporte de electrones cíclico alrededor del FSI, lo cual ya ha sido demostrado en cebada (Golding y Johnson, 2003).

Las plantas superiores que crecen en los ambientes áridos y calientes usualmente exhiben un paso K en la traza de fluorescencia (Srivastava *et al.*, 1997). Éste se encuentra usualmente escondido en la fase OJ debido a que en la mayoría de las condiciones no se presenta una limitación suficientemente fuerte en el transporte de electrones, a través del FSII, para ser visualizado (Oukarroum *et al.*, 2007). Como se muestra en la Fig. IV.10 y V.13 el estrés hídrico induce la aparición y un aumento en la amplitud de la banda K tanto en la planta C<sub>3</sub> como en la MAC. Un incremento en la banda K puede ser explicado por un desbalance dentro del FSII entre los electrones que dejan los centros de reacción en el lado aceptor y los electrones donados por el lado donador (Strasser, 1997). También ha sido asociado con una disociación del complejo productor de oxígeno (Guissé *et al.*, 1995; De Ronde *et al.*, 2004).

### *VII.2.3. Integración del efecto del estrés hídrico en la fotosíntesis*

Para un mejor entendimiento, la Figura VII.1 resume los sitios afectados por el estrés hídrico en la fotosíntesis de la planta  $C_3$  y MAC. Así, en concordancia con los resultados presentados en la presente tesis, la conductancia estomática disminuye con el desarrollo del estrés hídrico lo que limita la asimilación de  $CO_2$  (1) y restringe la disponibilidad de carbono que puede ser utilizado en el ciclo de Calvin-Benson (2). La disminución en la actividad en el ciclo de Calvin puede disminuir el consumo de ATP y NADPH, aminorando la producción de ADP y  $NADP^+$  e inhibiendo la síntesis de ATP y el transporte de electrones lineal (3). Esto resulta en un aumento en la presión de excitación en el FSII (4), debido a la acumulación del reservorio de plastoquinonas reducidas y cambios en la emisión de fluorescencia (5). La inhibición de la síntesis de ATP en la planta  $C_3$ , así como la síntesis y el probable aumento del flujo de electrones cíclico alrededor del FSI en la planta MAC (6) disminuyen el pH en el lumen tilacoidal (7). La disminución del pH dentro del lumen tilacoidal es una señal inmediata del exceso de luz y activa la extinción dependiente del  $\Delta pH$  (qE), que ocurre cuando se forma un alto gradiente protónico transtilacoidal ( $pH < 6$ ) por el exceso de luz, lo que activa la transformación de violaxantina a zeaxantina y la disipación de la energía como calor (8) (Krause y Jahns, 2004). El estrés hídrico tuvo un efecto directo en las producciones cuánticas de la transferencia de electrones fotoinducidas de la  $Q_A^-$  a la PQ (4) y de la PQ al aceptor de electrones del FSI (9). Diferencialmente hubo una supresión de la transferencia de electrones del reservorio de PQ reducidas hacia los centros de reacción del FSI en la planta  $C_3$  ( $P700^+$ ; 9), mientras que la planta MAC presentó una mayor capacidad en la transferencia de electrones hacia el lado aceptor del FSI (9), probablemente asociada a un

aumento en el transporte de electrones cíclico (6). Los resultados también demuestran una disminución en el suministro continuo de electrones a los centros de reacción del FSII provenientes del agua (10). Lo que está asociado con un desequilibrio entre el lado donador y el lado aceptor de electrones del FSII (Strasser, 1997), por lo que está ligado a la disociación del complejo productor de oxígeno (De Ronde *et al.*, 2004).



**Figura VII.1.** Modelo propuesto para explicar el efecto del estrés hídrico en la fotosíntesis tanto de la planta C<sub>3</sub> (*C. annuum*) como de la MAC (*A. salmiana*). Para la descripción de la gráfica ver el texto.

### *VII.3. Conclusiones finales y perspectivas futuras*

En condiciones naturales, la mayoría de las plantas están sujetas a cambios frecuentes en la humedad y disponibilidad de agua en el suelo y atmósfera. En consecuencia, las plantas han evolucionado y generado varios mecanismos para contrarrestar los problemas asociados con la variación temporal y espacial de la falta de agua. En conclusión, los cambios en las relaciones hídricas de las plantas generadas por el déficit de agua tanto en la planta  $C_3$  como en la MAC tienen un impacto en los procesos fotoquímicos y en los procesos difusivos y de fijación de  $CO_2$  como lo indican las mediciones de fluorescencia de clorofila y del intercambio de gases evaluadas. A su vez, el balance de carbono de la planta durante el periodo de estrés hídrico y recuperación depende de la velocidad y desarrollo de la recuperación de la fotosíntesis la que a su vez depende del grado y velocidad de la disminución de la fotosíntesis durante el agotamiento del agua.

Se comprobó que el estrés hídrico ocasiona un desbalance entre la generación del flujo de electrones fotosintético y su utilización en la fijación de carbono, por lo que el exceso de la energía de excitación es removida de manera segura mediante la activación de la disipación no fotoquímica como un mecanismo de aclimatación al estrés que protege al aparato fotosintético. Esto es importante porque una gran parte de la resistencia de las plantas a la sequía depende de su habilidad para disipar el exceso de radiación.

El presente estudio también demuestra que los parámetros de fluorescencia de clorofila *a* proveen un método rápido y no invasivo para la investigación de las alteraciones funcionales y estructurales del transporte de electrones fotosintético así como para la cuantificación, evaluación y monitoreo del estrés hídrico.

Ciertos parámetros que describen el transporte de electrones fotosintético derivados del aumento rápido de la fluorescencia de Chl *a* (medidos por la prueba JIP) se correlacionaron significativamente con *A* y *g<sub>s</sub>*, por lo que la medición de la fluorescencia de Chl *a* con un instrumento portátil (PEA) puede proveer un buen método para la detección temprana del estrés hídrico y ser una guía útil en la implementación del riego, además de que los fluorímetros son más económicos que los equipos de fotosíntesis o IRGAs.

Es evidente que la fluorescencia de clorofila puede ser una prueba muy sensible del estado fisiológico de las hojas, lo que puede ser una evaluación muy rápida del desempeño de la planta en un rango amplio de situaciones. El uso de técnicas no invasivas para medir los cambios en la fisiología de las plantas en distintas condiciones de estrés tiene beneficios prácticos considerables:

- 1) Una característica importante de los programas de mejoramiento genético es la evaluación efectiva del crecimiento del cultivo, rendimiento y su desempeño, idealmente mediante el uso de técnicas rápidas y no invasivas. El desarrollo de la instrumentación para medir la fluorescencia de clorofila de plantas intactas y los avances en el entendimiento del cómo los cambios en las características de la fluorescencia se relacionan al desempeño fisiológico han originado un uso amplio de las mediciones de fluorescencia en los estudios de fisiología vegetal (Baker y Rosenqvist, 2004). Potencialmente, la técnica tiene muchas aplicaciones en la

producción de cultivos y en programas de mejoramiento, sin embargo todavía no ha sido aplicada ampliamente.

- 2) La relación entre la eficiencia de operación del FSII y la asimilación de CO<sub>2</sub> en las hojas permite que la fluorescencia sea utilizada para detectar diferencias en la respuesta de las plantas a los cambios ambientales y en consecuencia para la selección de genotipos con tolerancia al estrés ambiental como sequía, salinidad, altas y bajas temperaturas, alta irradianza y deficiencia de nutrientes (Baker y Rosenqvist, 2004).
- 3) La fotosíntesis es un complejo de interacciones de procesos complementarios como las rutas alternativas del transporte de electrones cíclicas y la extinción no fotoquímica, por lo que un método común de aislar procesos específicos es utilizar inhibidores bioquímicos como los herbicidas. Sin embargo, el uso de herbicidas requiere el entendimiento de cómo éstos interactúan con el aparato fotosintético y su concomitante efecto en la emisión de fluorescencia, lo que es un campo de estudio prometedor y esencial en la elucidación de la función de varios componentes de la cadena del transporte de electrones fotosintético, rutas metabólicas y procesos fotosintéticos reguladores (Ralph *et al.*, 2010).
- 4) Recientemente se han desarrollado sistemas de imágenes de fluorescencia de clorofila *a* que han aumentado en gran medida la versatilidad de la fluorimetría de clorofila como una técnica no invasiva para la investigación en la fotosíntesis oxigénica. Por ejemplo, se han desarrollado sistemas de imágenes a nivel microscópico que han hecho posible medir la eficiencia fotoquímica del FSII de cloroplastos en hojas intactas y en

algas celulares individuales dentro de mezclas de poblaciones, así como sistemas de imágenes en áreas mucho mayores utilizadas para investigar los patrones heterogéneos del comportamiento fotosintético y en programas de escrutinio de imágenes que procesan decenas o cientos de plantas simultáneamente (Oxborough, 2004). Las imágenes de fluorescencia pueden detectar cambios espaciales y temporales en las hojas durante el desarrollo progresivo del estrés hídrico lo que hace a esta técnica no invasiva y un detector temprano del estrés en plantas de invernadero y puede ser aplicada para el manejo de los riegos.

- 5) Los sensores remotos ofrecen la posibilidad única de derivar información explícita del estado de la vegetación a nivel local, regional y de paisaje. Sin embargo, las señales de reflectancia por sí solas no cuantifican la actividad fotosintética y la dinámica de la vegetación de manera precisa. La emisión de fluorescencia por la cubierta vegetal y regional, es considerada frecuentemente para ser empleada como una medida complementaria y señal de la dinámica de la vegetación (Papageorgiou y Govindjee, 2004). La fluorescencia inducida por el sol puede obtenerse de plataformas de sensores remotos, por lo que se pueden esperar grandes beneficios de técnicas de sensores remotos basados en fluorescencia que cuantifiquen el estado actual de la fijación de carbono fotosintético y que reduzcan la incertidumbre en el modelado del flujo del carbono a nivel global (Rascher *et al.*, 2009).

## Literatura Citada

- Abraham, E.M., Huang, B., Bonos, S.A., y Meyer, W.A.** (2004) Evaluation of drought resistance for Texas bluegrass, Kentucky bluegrass, and their hybrids. *Crop Science* 44, 1746–1753.
- Adams III, W.W. y Demmig-Adams, B.** (2004) Chlorophyll fluorescence as a tool to monitor plant response to the environment, pp. 583– 604 *en* Papageorgiou, G.C.; Govindjee (Eds) *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Dordrecht, Países Bajos, Springer.
- Albert, K.R., Mikkelsen, T.N. y Ro-Poulsen, H.** (2008) Ambient UV-B radiation decreases photosynthesis in high arctic *Vaccinium uliginosum*. *Physiologia Plantarum* 133, 199–210.
- Albert, K.R., Mikkelsen, T.N., Michelsen, A., Ro-Poulsen, H. y van der Linden, L.** (2011) Interactive effects of drought, elevated CO<sub>2</sub> and warming on photosynthetic capacity and photosystem performance in temperate heath plants. *Journal of Plant Physiology* 168, 1550-1561.
- Andrade, J.L., Cervera, J.C. y Graham, E.A.** (2009) Microenvironments, water relations, and productivity of CAM plants, pp. 95-120 *en*. de la Barrera, E.; Smith W.K. (Eds) *Perspectives in Biophysical Plant Ecophysiology: A Tribute to Park S. Nobel*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Andrews, J.** (1995) *Peppers: The Domesticated Capsicums*. Texas, E.U.A., University of Texas Press. 275 p.
- Andrews, P.K., D.J. Chalmers y Moremong, M.** (1992) Canopy-air temperature differences and soil water as predictors of water stress of apple trees grown in a humid, temperate climate. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 117, 453-458.
- Araus, J.L., Slafer, G.A., Reynolds, M.P. y Royo, C.** (2002) Plant breeding and drought in C<sub>3</sub> cereals: what should we breed for? *Annals of Botany* 89, 925–940.
- Aroca, R., Amodeo, G., Fernández-Illescas, S., Herman, E.M., Chaumont, F. y Chrispeels, M.J.** (2005) The role of aquaporins and membrane damage in chilling and hydrogen peroxide induced changes in the hydraulic conductance of maize roots. *Plant Physiology* 137, 341-353.
- Arrizaga, S. y Ezcurra, E.** (2002) Propagation mechanisms in *Agave macroacantha* (Agavaceae), a tropical arid-land succulent rosette. *American Journal of Botany* 89, 632-641.
- Asada, K.** (1999) The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 601–639.
- Assmann, S.M. y Shimazaki, K.** (1999) The multisensory guard cell: stomatal responses to blue light and abscisic acid. *Plant Physiology* 119, 809–815.

**Athar, H.-R. y Ashraf, M.** (2005) Photosynthesis under drought stress, pp. 793-810 en Pessaraki, M. (Ed.) *Handbook of Photosynthesis*. Segunda edición. E.U.A., Taylor & Francis Group.

**Bajji, M., Jean-Marie, K. y Lutts, S.** (2001) The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation* 00, 1-10.

**Baker, N.R.** (1991) A possible role for photosystem II in environmental perturbation of photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 81, 563–570.

**Baker, N.R. y Rosenqvist, E.** (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55, 1607-1621.

**Barker, D.H. y Adams III, W.W.** (1997) The xanthophylls cycle and energy dissipation in differently oriented faces of the cactus *Opuntia macrorhiza*. *Oecologia* 109, 353-361.

**Baroli, I., Do, A.D., Yamane, T. y Niyogi, K.K.** (2003) Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress. *Plant Cell* 15, 992–1008.

**Bartels, D. y Nelson, D.E.** (1994) Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics. *Plant Cell and Environment* 17, 659–667.

**Beadle, C.L., Ludlow, M.M. y Honeysett, J.L.** (1993) Water relations, pp. 113–127 en Hall, D.O.; Scurlock, J.M.O.; Bolhàr-Nordenkamp, H.R.; Leegood, R.C.; Long, S.P. (Eds) *Photosynthesis and Production in a Changing Environment*. Londres, Inglaterra, Chapman & Hall.

**Berta, G., Trotta, A., Fusconi, A., Hooker, J.E., Munro, M., Atkinson, D., Giovanneti, M., Morini, S., Fortuna, P., Tisserant, B., Gianinazzi-Pearson, V., Cianinazzi, S.** 1995. Arbuscular mycorrhizal induced changes to plant growth and root system morphology in *Prunus cerasifera*. *Tree Physiology* 15: 281-293.

**Bewley, J.D. y Black, M.** (1994) *Seeds: Physiology of development and germination*. Segunda edición. Plenum, E.U.A. 445 pp.

**Bilger, W. y Björkman, O.** (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* 25, 173-185.

**Bobich, E.G. y North, G.B.** (2009) Structural implications of succulence: Architecture, anatomy, and mechanics of photosynthetic stem succulents, pachycauls, and leaf succulents, pp. 3-38 en de la Barrera, E.; Smith, W.K. (Eds) *Perspectives in Biophysical Plant Ecophysiology: A Tribute to Park S. Nobel*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

- Borland, A.M. y Griffiths, H.** (1990) The regulation of CAM and respiratory recycling by water supply and light regime in the C<sub>3</sub>-CAM intermediate *Sedum telephium*. *Functional Ecology* 4, 33–39.
- Borland, A.M., Maxwell, K. y Griffiths, H.** (2000) Ecophysiology of plants with Crassulacean Acid Metabolism, pp. 583–605 *en* Leegood, R.C.; Sharkey, T.D.; S. von Caemmerer, S. (Eds) *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Países Bajos, Kluwer Academic Publishers.
- Borland, A.M., Griffiths, H., Hartwell, J. y Smith J.A.C.** (2009) Exploiting the potential of plants with crassulacean acid metabolism for bioenergy production on marginal lands. *Journal of Experimental Botany* 60, 2879–2896.
- Borland, A.M., Barrera-Zambrano, V.A., Ceusters, J. y Shorrocks, K.** (2011) The photosynthetic plasticity of crassulacean acid metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in a changing world. *New Phytologist* 191, 619–633.
- Bowyer, J.R. y Leegood, R.C.** (1997) Photosynthesis, pp. 49–110 *en* Dey, P.M.; Harborne, J.B. (Eds) *Plant Biochemistry*. Londres, Academic Press.
- Box, G.E.P. y Cox, D.R.** (1964) An analysis of transformation. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 26, 211–252.
- Boyer, J.S.** (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218, 443–448.
- Boyer, J.S.** (1996) Advances in drought tolerance in plants. *Advances in Agronomy* 56, 187–218.
- Bradford, K.J.** (1990) A water relations analysis of seed germination rates. *Plant Physiology* 94, 840–849.
- Broetto, F., Duarte, H.M. y Lüttge, U.** (2007) Responses of chlorophyll fluorescence parameters of the facultative halophyte and C<sub>3</sub>-CAM intermediate species *Mesembryanthemum crystallinum* to salinity and high irradiance stress. *Journal of Plant Physiology* 164, 904–912.
- Bryant, G., Koster, K.L. y Wolfe, J.** (2001) Membrane behavior in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes. *Seed Science Research* 11, 17–25.
- Buckley, T.N.** (2005) The control of stomata by water balance. *New Phytologist* 168, 275–292.
- Buckley, T.N., Mott, K.A. y Farquhar, G.D.** (2003) A hydromechanical and biochemical model of stomatal conductance. *Plant, Cell & Environment* 26, 1767–1785.
- Bukhow, N.G. y Carpentier, R.** (2004) Effects of water stress on the photosynthetic efficiency of plants, pp. 623–635 *en* Papageorgiou, G.C.; Govindjee (Eds) *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Alemania, Springer.

- Bussotti, F., Desotgiu, R., Cascio, C., Pollastrini, M., Gravano, E., Gerosa, G., Marzuoli, R., Nali, C., Lorenzini, G., Salvatori, E., Manes, F., Schaub, M. y Strasser, R.J.** (2011) Ozone stress in woody plants assessed with chlorophyll *a* fluorescence. A critical reassessment of existing data. *Environmental and Experimental Botany* 73, 19-30.
- Campbell, N.A., Reece, J.B., Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V. y Jackson, R.B.** (2002) *Biology*. Sexta edición. San Francisco, Pearson Education, Inc. 1267 p.
- Canaani, O. y Havaux, M.** (1990) Evidence for a biological role in photosynthesis for cytochrome b-559, a component of photosystem II reaction center. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87, 9295–9299.
- Cascio, C., Schaub, M., Novak, K., Desotgiu, R., Bussotti, F. y Strasser, R.J.** (2010) Foliar responses to ozone of *Fagus sylvatica* L. seedlings grown in shaded and in full sunlight conditions. *Environmental and Experimental Botany* 68, 188–197.
- Castellanos, J.Z. y Borbón, C.M.** (2009) Panorama de la Horticultura protegida en México, pp. 1-18 en Castellanos, J.Z. (Ed.) *Manual de Producción de Tomate en Invernadero*. Guanajuato, México, Intagri.
- Cela, J., Arrom, L. y Munné-Bosch, S.** (2009) Diurnal changes in photosystem II photochemistry, photoprotective compounds and stress related-phytohormones in the CAM plant, *Aptenia cordifolia*. *Plant Science* 177, 404-410.
- Ceppi, M.G.** (2010) Parametres photosynthetiques affectant le transport d'electrons a travers le pool de plastoquinone: la densite des photosystemes I, le contenu de chlorophylle et l'activite d'une plastoquinol-oxydase. Tesis de Doctorado. Universidad de Ginebra, Suiza. 203 p.
- Ceppi, M.G., Oukarroum, A., Çiçek, N., Strasser, R.J. y Schansker, G.** (2012) The IP amplitude of the fluorescence rise OJIP is sensitive to changes in the photosystem I content of leaves: a study on plants exposed to magnesium and sulfate deficiencies, drought stress and salt stress. *Physiologia Plantarum* 144, 277-288.
- Ceusters, J., Borland, A.M., Londers, E., Verdoodt, V., Godts, C. y De 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.
- Colunga-García, M.P. y Zizumbo-Villarreal, D.** (2007). Tequila and other *Agave* spirits from west-central Mexico: current germoplasm diversity, conservation and origin. *Biodiversity and Conservation* 16, 1653-1667.
- CNA.** (2009) Atlas del agua en México 2009. Comisión Nacional del Agua. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México. 123 p.
- Cornic, G., Ghashghaie, J., Genty, B. y Briantais, J.M.** (1992) Leaf photosynthesis is resistant to a mild drought stress. *Photosynthetica* 27, 295–309.

**Cornic, G. y Massacci, A.** (1996) Leaf photosynthesis under drought stress, pp. 347–366 en Baker, N.R. (Ed.) *Photosynthesis and the Environment*. Dordrecht, Países Bajos, Kluwer Academic Publishers.

**Cruz, J.A., Salbilla, B.A., Kanazawa, A. y Kramer, D.M.** (2001) Inhibition of plastocyanin to P700<sup>+</sup> electron transfer in *Chlamydomonas reinhardtii* by hyperosmotic stress. *Plant Physiology* 127, 1167–1179.

**Chapin III, F.S., Matson, P.A. y Mooney, H.A.** (2002) *Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology*. New York, Springer Science + Business Media. 436 p.

**Chaves, M.M.** (1991) Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany* 42, 1–16.

**Chaves, M.M. y Davies, B.** (2010) Drought effects and water use efficiency: improving crop production in dry environments. *Functional Plant Biology* 37, iii–iv.

**Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J., Rodrigues, M.L., Ricardo, C.P.P., Osório, M.L., Carvalho, I., Faria, T. y Pinheiro, C.** (2002) How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and Growth. *Annals of Botany* 89, 907-916.

**Chaves, M.M., Maroco, J.P. y Pereira, J.S.** (2003) Understanding plant response to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30, 239-264.

**Chaves, M.M. y Oliveira, M.M.** (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany* 55, 2365–2384.

**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.

**Chaves, M.M., Costa, J.M. y Saibo, N.J.M.** (2011) Recent advances in photosynthesis under drought and salinity. *Advances in Botanical Research* 57, 49-104.

**Chen, C.P., Zhu, X.-G. y Long, S.P.** (2008) The effect of leaf-level spatial variability in photosynthetic capacity on biochemical parameter estimates using the Farquhar model: a theoretical analysis. *Plant Physiology* 148, 1139-1147.

**DaCosta, M. y Huang, B.** (2009) Physiological adaptations of perennial grasses to drought stress, pp. 169-190 en De la Barrera, E.; Smith, W.K. (Eds) *Perspectives in Biophysical Plant Ecophysiology: A Tribute to Park S. Nobel*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

**Da Matta, F.M., Maestri, M. y Barros, R.S.** (1997) Photosynthetic performance of two coffee species under drought. *Photosynthetica* 4, 257–264.

**Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inzé, D. y Van Breusegem, F.** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57, 779–795.

- Davis, S.C., Dohleman, F.G. y Long, S.P.** (2010) The global potential for *Agave* as a biofuel feedstock. *GCB Bioenergy* 3, 68-78.
- Daws, M.I., Crabtree, L.M., Dalling, J.W., Mullins, C.E. y Burslem, D.F.R.P.** (2008) Germination responses to water potential in neotropical pioneers suggest large-seeded species take more risks. *Annals of Botany* 102, 945-951.
- De la Barrera, E. y Nobel, P.S.** (2003) Physiological ecology of seed germination for the columnar cactus *Stenocereus queretaroensis*. *Journal of Arid Environments* 53, 297-306.
- Demmig-Adams, B. y Adams III, W.W.** (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1, 21–26.
- De Ronde, J.A., Cress, W.A., Krüger, G.H.J., Strasser, R.J. y Van Staden, J.** (2004) Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis P5CR* gene, during heat and drought stress. *Journal of Plant Physiology* 161, 1211–1224.
- Dodd, G.L. y Donovan, L.A.** (1999) Water potential and ionic effects on germination and seedling growth of two cold desert shrubs. *American Journal of Botany* 86, 1146-1153.
- Duarte, H.M. y Lüttge, U.** (2007) Circadian rhythmicity, pp. 245-256 en Lüttge, U. (Ed.) *Clusia: a woody Neotropical genus of remarkable plasticity and diversity*. Segunda edición. Berlín, Alemania, Springer.
- Dubrovsy, J.G.** (1996) Seed hydration memory in Sonoran Desert cacti and its ecological implication. *American Journal of Botany* 83, 624-632.
- Duysens, L.N.M. y Sweers, H.E.** (1963) Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. *Microalgae and Photosynthetic Bacteria* 353-372.
- Ehleringer, J.** (1981) Leaf absorptances of Mohave and Sonoran desert plants. *Oecologia* 49, 366–370.
- Escalona, J.M., Flexas, J. y Medrano, H.** (1999) Stomatal and nonstomatal limitations of photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. *Australian Journal of Plant Physiology* 26, 421–433.
- Escobar-Guzmán, R.E., Hernández, F.Z., Vega, K.G. y Simpson, J.** (2008) Seed production and gametophyte formation in *Agave tequilana* y *Agave americana*. *Botany* 86, 1343-1353.
- Ethier, G.J. y Livingston, N.J.** (2004) On the need to incorporate sensitivity to CO<sub>2</sub> transfer conductance into the Farquhar–von Caemmerer–Berry leaf photosynthesis model. *Plant Cell Environment* 27, 137–153.
- Evans, C.-E. y Etherington, J. R.** (1990) The effect of soil water potential on seed germination of some British plants. *New Phytologist* 115, 539–548.

**FAO & IFAD.** (2006) Water for food, agriculture and rural livelihoods. Chapter 7 of the 2nd UN World Water Development Report: 'Water, a shared responsibility'. FAO and the International Fund for Agricultural Development.

**Farquhar, G.D., Caemmerer, S.V. y Berry, J.A.** (1980) A biochemical-model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub> species. *Planta* 149, 78-90.

**Farquhar, G.D., Wong, S.C.** (1984) An empirical model of stomatal conductance. *Australian Journal of Plant Physiology* 11, 191–210.

**Farquhar, G.D., von Caemmerer, S. y Berry, J.A.** (2001) Models of photosynthesis. *Plant Physiology* 125, 42-45.

**Fay, P.A. y Schultz, M.J.** (2009) Germination, survival, and growth of grass and forb seedlings: Effects of soil moisture variability. *Acta Oecologica* 35, 679-684.

**Fenner, M. y Kitajima, K.** (1999) Seed and seedling ecology, pp. 589–621 *en* Pugnaire, F.I.; Valladares, F. (Eds) *Handbook of functional plant ecology*. New York, Marcel-Dekker.

**Filella, I., Llusia, J., Pinol, J. y Penuelas, J.** (1998) Leaf gas exchange and fluorescence of *Phillyrea latifolia*, *Pistacia lentiscus* and *Quercus ilex* saplings in severe drought and high temperature conditions. *Environmental and Experimental Botany* 39, 213–20.

**Fischer, R.A. y Turner, N.C.** (1978) Plant productivity in the arid and semiarid zones. *Annual Review of Plant Physiology* 29, 277–317.

**Flexas, J. y Medrano, H.** (2002) Energy dissipation in C<sub>3</sub> plants under drought. *Functional Plant Biology* 29, 1209-1215.

**Flexas, J., Escalona, J.M. y Medrano H.** (1998) Down-regulation of photosynthesis by drought under field conditions in grapevine leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 25, 893–900.

**Flexas, J., Escalona, J.M., Evain, S., Gulías, J., Moya, I., Osmond, C.B. y Medrano, H.** (2002) Steady-state chlorophyll fluorescence ( $F_s$ ) measurements as a tool to follow variations of net CO<sub>2</sub> assimilation and stomatal conductance during water-stress in C<sub>3</sub> plants. *Physiologia Plantarum* 114, 231-240.

**Flexas, J., Bota, J., Escalona, J.M., Sampól, B. y Medrano, H.** (2002) Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Functional Plant Biology* 29, 461–471.

**Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G. y Sharkey, T.D.** (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C<sub>3</sub> plants. *Plant Biology* 6, 269–279.

**Flexas, J., Bota, J., Galmés, J., Medrano, H. y Ribas-Carbó, M.** (2006) Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum* 127, 343-352.

**Flexas, J., Diaz-Espejo, A., Galmés, J., Kaldenhoff, R., Medrano, H. y Ribas-Carbó, M.** (2007) Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO<sub>2</sub> concentration around leaves. *Plant, Cell and Environment* 30, 1284–1298.

**de Fraiture, C., Wichelns, D., Rockström, J. y Kemp-Benedict, E.** (2007) Looking ahead to 2050: scenarios of alternative investment approaches, pp. 91-145 en Molden, D. (Ed.) *Water for food, water for life: a comprehensive assessment of water management in agriculture*. Londres, Inglaterra, Earthscan.

**Franco, A.C. y Nobel, P.S.** (1988) Interactions between seedlings of *Agave deserti* and the nurse plant *Hilaria rigida*. *Ecology* 69, 1731-1740.

**Freeman, C.E.** (1973) Some germination responses of lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.). *The Southwestern Naturalist* 18, 125-134.

**Foyer, C.H., Descourvieres, P. y Kunert, K.J.** (1994) Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell and Environment* 17, 507–23.

**García, M.A.** (1995) Riqueza y endemismo de la familia Agavaceae en México, pp. 51-75 en Linares, E.; Davila, P.; Chiang, F.; Bye, R.; Elias, T. (Eds) *Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

**García-Mendoza, A. y Galván, V.** (1995) Riqueza de las familias agavaceae y nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 56, 7-24.

**García-Mendoza, A.** (2002) Distribution of *Agave* (Agavaceae) in México. *Cactus and Succulent Journal* 74, 177-187.

**García-Moya, E., Romero-Manzanares, A. y Nobel, P.S.** (2010) Highlights for *Agave* productivity. *GCB Bioenergy* 3, 1-11.

**Gentry, H.S.** (1982) *Agaves of Continental North América*. Tucson, E.U.A., University of Arizona Press. 670 p.

**Genty, B., Briantais, J.M. y Baker, N.R.** (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence, *Biochimica et Biophysica Acta* 990, 87–92.

**Golding, A.J. y Johnson, G.N.** (2003) Down-regulation of linear and activation of cyclic electron transport during drought. *Planta* 218, 107-114.

**Goldstein, G., Andrade, J.L. y Nobel, P.S.** (1991) Differences in water relations parameters for the chlorenchyma and parenchyma of *Opuntia ficus-indica* under wet versus dry conditions. *Australian Journal of Plant Physiology* 18, 95-107.

**Goltsev, V., Zaharieva, I., Chernev, P., Kouzmanova, M., Kalaji, H.M., Yordanov, I., Krasteva, V., Alexandrov, V. y Stefanov, D.** (2012) Drought-induced modifications of photosynthetic electron transport in intact leaves: Analysis and use of neural networks as a

tool for a rapid non-invasive estimation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1817, 1490-1498.

**Gómez-Pompa, A.** (1963) El género *Agave*. *Cactáceas y suculentas Mexicanas* 8, 3-28.

**González-Dugo, V., Orgaz, F. y Fereres, E.** (2007) Responses of pepper to deficit irrigation for paprika production. *Scientia Horticulturae* 114, 77–82.

**Govindjee.** (2004) Chlorophyll *a* fluorescence: A bit of basics and history, pp 1–42 *en* Papageorgiou, G.C.; Govindjee (Eds) *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Países Bajos, Kluwer Academic Publishers.

**Griffiths, H., Robe, W.E., Girnus, J. y Maxwell, K.** (2008) Leaf succulence determines the interplay between carboxylase systems and light use during crassulacean acid metabolism in *Kalanchoë* species. *Journal of Experimental Botany* 59, 1851–1861.

**Guissé, B., Srivastava, A. y Strasser, R.J.** (1995) The polyphasic rise of the chlorophyll *a* fluorescence (OKJIP) in heat-stressed leaves. *Archives des Sciences Genève* 48, 147–160.

**Haldimann, P. y Strasser, R.J.** (1999) Effects of anaerobiosis as probed by the polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise kinetic in pea (*Pisum sativum* L.). *Photosynthesis Research* 62, 67–83.

**Hanscom, A. y Ting, I.** (1978) Responses of succulents to plant water stress. *Plant Physiology* 61, 327-330.

**Harper, J.L.** (1977) *Population biology of plants*. Londres, Inglaterra, Academic Press. 892 pp.

**He, J.X., Wang, J. y Liang, H.G.** (1995) Effect of water stress on photochemical function and protein metabolism of photosystem II in wheat leaves. *Physiologia Plantarum* 93, 771–777.

**Herrera, A., Fernández, M.D. y Taisma M.A.** (2000) Effects of drought on CAM and water relations in plants of *Peperomia carnevalii*. *Annals of Botany* 86, 511-517.

**Hu, L., Wang, Z. y Huang, B.** (2010) Diffusion limitations and metabolic factors associated with inhibition and recovery of photosynthesis from drought stress in a *C<sub>3</sub>* perennial grass species. *Physiologia Plantarum* 139, 93-106.

**Huang, B., Fry, J.D. y Wang, B.** (1998) Water relations and canopy characteristics of tall fescue cultivars during and after drought stress. *HortScience* 33, 837–840.

**Huang, Z.-A., Jiang, D.-A., Yang, Y., Sun, J.-W. y Jin, S.-H.** (2004). Effects of nitrogen deficiency on gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzymes in leaves of rice plants. *Photosynthetica* 42, 357-364.

**IPCC.** (2007) *Climate Change 2007 – the Physical Science Basis*. Contribution of Working Group i to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Cambridge, Reino Unido y New York, Cambridge University Press. 52 p.

**Jordan, P.W. y Nobel, P.S.** (1979) Infrequent establishment of seedlings of *Agave deserti* (Agavaceae) in the Northwestern Sonoran Desert. *American Journal of Botany* 66, 1079-1084.

**Jordan, P.W. y Nobel, P.S.** (1981) Seedling establishment of *Ferocactus acanthodes* in relation to drought. *Ecology* 62, 901-906.

**Junge, W., Sielaff, H. y Engelbrecht, S.** (2009) Torque generation and elastic power transmission in the rotary  $F_0F_1$ -ATPase. *Nature* 45, 364–370.

**Jury, W.A. y Vaux, H.** (2005) The role of science in solving the world's emerging water problems. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 15715-15720.

**Katona, E., Neimanis, S., Schönknecht, G. y Heber, U.** (1992) Photosystem I. - dependent cyclic electron transport is important in controlling photosystem II activity in leaves under conditions of water stress. *Photosynthesis Research* 34, 449–464.

**Kinoshita, T. y Shimazaki, K.** (1999) Blue light activates the plasma membrane  $H^+$ -ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *The EMBO Journal* 18, 5548–5558.

**Köchy, M. y Tielbörger, K.** (2007) Hydrothermal time model of germination: Parameters for 36 Mediterranean annual species based on a simplified approach. *Basic and Applied Ecology* 8, 171-182.

**Kramer, P.J. y Boyer, J.S.** (1995) *Water Relations of Plants and Soils*. San Diego, E.U.A., Academic Press. 495 p.

**Krause, G.H. y Weis, E.** (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 313–349.

**Krause, G.H. y Jahns, P.** (2004) Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: Characterization and function, pp. 463–495 en Papageorgiou, G.C.; Govindjee (Eds) *Chlorophyll a Fluorescence: a Signature of Photosynthesis*. Dordrecht, Países Bajos, Springer.

**Lawlor, D.W.** (2002) Limitation to photosynthesis in water stressed leaves: stomata *versus* metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany* 89, 1–15.

**Lawlor, D.W.** (2009) Musings about the effects of environment on photosynthesis. *Annals of Botany* 103, 543–549.

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

**Lawlor, D.W. y Tezara, W.** (2009) Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Annals of Botany* 103, 561-579.

**Lawson, T.** (2009) Guard cell photosynthesis and stomatal function. *New Phytologist* 181, 13-34.

**Leishman, M.R. y Westoby, M.** (1994) The role of seed size in shaded conditions: experimental evidence. *Functional Ecology* 8, 205-214.

**Li, P. y Ma, F.** (2012) Different effects of light irradiation on the photosynthetic electron transport chain during apple tree leaf dehydration. *Plant Physiology and Biochemistry* 55, 16-22.

**Li, F., Zhao, B. y Su, G.** (2000) A derivation of the generalized Korf growth equation and its application. *Journal of Forestry Research* 11, 81-88.

**Lombardini, L.** (2006) Ecophysiology of plants in dry environments, pp. 47-66 en D'Odorico, P.; Porporato, A. (Eds) *Dryland Ecohydrology*. Dordrecht, Países Bajos, Springer.

**Long, S.P. y Bernacchi, C.J.** (2003) Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany* 54, 2393-2400.

**Lu, C. y Zhang, J.** (1998) Effects of water stress on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition in wheat plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 25, 883-892.

**Lu, C. y Zhang, J.** (1999) Effect of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *Journal of Experimental Botany* 336, 1199-1206.

**Lu, C., Qiu, N., Lu, Q., Wang, B. y Kuang, T.** (2003) PSII photochemistry, thermal energy dissipation, and the xanthophylls cycle in *Kalanchoë daigremontiana* exposed to a combination of water stress and high light. *Physiologia Plantarum* 118, 173-182.

**Lüttge, U.** (2004) Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). *Annals of Botany* 93, 629-652.

**Lüttge, U.** (2008) Clusia: Holy Grail and enigma. *Journal of Experimental Botany* 59, 1503-1514.

**Mahajan, S. y Tuteja, N.** (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444, 139-158.

**Maldonado-Rodríguez, R., Pavlov, S., Gonzalez, A., Oukarroum, A. y Strasser, R.J.** (2003) Can machines recognize stress in plants? *Environmental Chemistry Letters* 1, 201-205.

- Mansfield, T.A., Hetherington, A.M., Atkinson, C.J.** (1990) Some current aspects of stomatal physiology. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41, 55–75.
- Martin, C.E.** (1996) Putative causes and consequences of recycling CO<sub>2</sub> via crassulacean acid metabolism, pp 192–203 *en* Winter, K.; Smith, J.A.C. (Eds) *Crassulacean Acid Metabolism: Biochemistry, Ecophysiology and Evolution*. Berlín, Alemania, Springer-Verlag.
- Martínez-Palacios, A., Eguiarte, L.E. y Fournier, G.R.** (1999) Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. *American Journal of Botany* 86, 1093-1098.
- Mattos, E.A., Herzog, B. y Lüttge, U.** (1999) Chlorophyll fluorescence during CAM-phases in *Clusia minor* L. under drought stress. *Journal of Experimental Botany* 50, 253–61.
- Maxwell, K. y Johnson, G.N.** (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51, 659-668.
- Martin, W., Scheibe, R. y Schnarrenberger, C.** (2000) The Calvin cycle and its regulation, pp 9-51 *en* Leegood, R.C.; Sharkey, T.D.; von Caemmerer, S. (Eds) *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Países Bajos, Kluwer Academic Publishers.
- Messinger, S.M., Buckley, T.N. y Mott, K.A.** (2006) Evidence for involvement of photosynthetic processes in the stomatal response to CO<sub>2</sub>. *Plant Physiology* 140, 771–778.
- Meyer, S. y Genty, B.** (1998) Mapping intercellular CO<sub>2</sub> mole fraction (C<sub>i</sub>) in *Rosa rubiginosa* leaves fed with abscisic acid by using chlorophyll fluorescence imaging: significance of C<sub>i</sub> estimated from leaf gas exchange. *Plant Physiology* 116, 947–957.
- Mittler, R.** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7, 405–410.
- Molden, D., Frenken, K., Barker, R., de Fraiture, C., Mati, B., Svendsen, M., Sadoff, C. y Finlayson, C.M.** (2007) Trends in water and agricultural development, pp. 57-89 *en* Molden, D. (Ed.) *Water for food, water for life: a comprehensive assessment of water management in agriculture*. Londres, Inglaterra, Earthscan.
- Moles, A.T. y Westoby, M.** (2004) What do seedlings die from, and what are the implications for evolution of seed size? *Oikos* 106, 193-199.
- Montero, M. J. y Pérez J.L.** (2008) Regionalización de proyecciones climáticas en México de precipitación y temperatura en superficie usando el método REA para el siglo XXI, pp: 11-21 *en* Martínez, P.; Aguilar, A. (Eds) *Efectos del Cambio Climático en los Recursos Hídricos de México*. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Jiutepec, México.

- Morison, J.I.L., Baker, N.R., Mullineaux, P.M. y Davies, W.J.** (2008) Improving water use in crop production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363, 639-658.
- Mott, J.J.** (1974) Factors affecting seed germination in three annual species from an arid región of Western Australia. *Journal of Ecology* 62, 699-709.
- Mott, K.A.** (1988) Do stomata respond to CO<sub>2</sub> concentrations other than intercellular? *Plant Physiology* 86, 200-230.
- Motulsky, H.J. y Christopoulos, A.** (2003) *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting.* GraphPad Software Inc., San Diego, E.U.A. 351 p.
- Munns, R.** (2011) Plant adaptations to salt and water stress: differences and commonalities. *Advances in Botanical Research* 57, 49-104.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y. y Allakhverdiev, S.I.** (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta* 1767, 414-421.
- Nelson, E.A. y Sage, R.F.** (2008) Functional constraints of CAM leaf anatomy: tight cell packing is associated with increased CAM function across a gradient of CAM expression. *Journal of Experimental Botany* 59, 1841-1850.
- Neubauer, C. y Schreiber, U.** (1987) The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong illumination; I. Saturation characteristics and partial control by the photosystem II acceptor side. *Zeitschrift für Naturforsch* 42c, 1246-1254.
- Niewiadomska, E. y Borland, A.M.** (2008) Crassulacean Acid Metabolism: a cause or consequence of oxidative stress in planta?, pp: 247-267 en Lüttge, U.; Beyschlag, W.; Murata, J. (Eds) *Progress in Botany*. Berlin Heidelberg ,Alemania, Springer-Verlag.
- Niklas, K.J. y Buchman, S.L.** (1994) The allometry of saguaro height. *American Journal of Botany* 81, 1161-1168.
- Nobel, P.S.** (1984) Extreme temperatures and thermal tolerances for seedlings of desert succulents. *Oecologia* 62, 310-317.
- Nobel, P.S.** (1988) *Environmental Biology of Agaves and Cacti*. Nueva York, E.U.A. Cambridge University Press. 284 p.
- Nobel, P.S.** (1990). Environmental influences on CO<sub>2</sub> uptake by Agaves, CAM plants with high productivities. *Economic Botany* 44, 488-502.
- Nobel, P.S.** (1991) Achievable productivities of certain CAM plants: basis for high values compared with C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub>. *New Phytologist* 119, 183-205.
- Nobel, P.S.** (1994) *Remarkable Agaves and Cacti*. Oxford, E.U.A. Oxford University Press. 180 p.

- Nobel P.S.** (2010) *Desert Wisdom/Agaves and Cacti: CO<sub>2</sub>, Water, Climate Change*. New York, E.U.A. iUniverse. 196 p.
- Nobel, P.S., García-Moya, E. y Quero, E.** (1992) High annual productivity of certain agaves and cacti under cultivation. *Plant, Cell and Environment* 15, 329–335.
- Nobel, P.S., Pimienta-Barrios, E., Hernández, J.Z. y Ramírez-Hernández, B.C.** (2002) Historical aspects and net CO<sub>2</sub> uptake for cultivated Crassulacean acid metabolism plants in México. *Annals of Applied Biology* 140, 133-142.
- Ogburn, R.M. y Edwards, E.J.** (2010) The ecological water-use strategies of succulent plants. *Advances in Botanical Research* 55, 179-225.
- Okçu, G., Kaya, M.D. y Atak, M.** (2005) Effects of salt and drought stresses on germination and seedling growth of pea (*Pisum sativum* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 29, 237-242.
- Oliver, R.J., Finch, J.W. y Taylor, G.** (2009) Second generation bioenergy crops and climate change: a review of the effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and drought on water use and the implications for yield. *GCB Bioenergy* 1, 97-114.
- O'Neill, M.E., Thomson, P.C., Jacobs, B.C., Brain, P., Butler, R.C., Turner, H. y Mitakda, B.** (2004) Fitting and comparing seed germination models with a focus on the inverse normal distribution. *Australian and New Zealand Journal of Statistics* 46, 349-366.
- Ort, D.R.** (2001) When there is too much light. *Plant Physiology* 125, 29–32.
- Osmond, C.B., Kramer, D., y Lüttge, U.** (1999) Reversible, water stress induced non-uniform chlorophyll fluorescence quenching in wilting leaves of *Potentilla reptans* may not be due to patchy stomatal responses. *Plant Biology* 1, 618–624.
- Osório, J., Osório, M.L., Chaves, M.M. y Pereira, J.S.** (1998) Water deficits are more important in delaying growth than in changing patterns of carbon allocation in *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology* 18, 363-373.
- Oukarroum, A., El Madidi, S., Schansker, G. y Strasser, R.J.** (2007) Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll *a* fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. *Environmental and Experimental Botany* 60, 438-446.
- Oukarroum, A., Schansker, G. y Strasser, J.** (2009) Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl *a* fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. *Physiologia Plantarum* 137, 188-199.
- Oxborough, K.** (2004) Imaging of chlorophyll *a* fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. *Journal of Experimental Botany* 55, 1195-1205.

**Paillotin, G.** (1976) Movement of excitations in the photosynthetic domains of photosystem II. *Journal of Theoretical Biology* 58, 237–252.

**Palahí, M., Tomé, M., Pukkala, T., Trasobares, A. y Montero, G.** (2004) Site index model for *Pinus sylvestris* in north-east Spain. *Forest Ecology and Management* 187, 35–47.

**Palta, J.A.** (1984) Influence of water deficits on gas exchange and the leaf and development of cassava cultivars. *Journal of Experimental Botany* 35, 1441–1449.

**Papageorgiou, G.C. y Govindjee.** (2004) *Chlorophyll a Fluorescence: a Signature of Photosynthesis*. Advances in Photosynthesis and Respiration Series, vol. 19, Dordrecht, Países Bajos, Springer. 818 p.

**Parry, M.A.J., Andralojc, P.J., Khan, S., Lea, P.J., Keys, A.J.** (2002) Rubisco activity: effects of drought stress. *Annals of Botany* 89, 833–839.

**Passioura, J.** (2007) The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. *Journal of Experimental Botany* 58, 13–117.

**Passioura, J.B. y Angus, J.F.** (2010) Improving productivity of crops in waterlimited environments, pp. 37–75 en Sparks, D.L. (Ed.) *Advances in Agronomy*. Vol. 106. Burlington, E.U.A. Academic Press.

**Peña-Rojas, K., Aranda, X. y Fleck, I.** (2004) Stomatal limitation to CO<sub>2</sub> assimilation and down-regulation of photosynthesis in *Quercus ilex* redsprouts in response to slowly imposed drought. *Tree Physiology* 24, 813–822.

**Peña-Valdivia, C.B., García, N.R., Aguirre, J.R. y Trejo C.** (2002) The effects of high temperature on dormancy and hypocotyl-root growth of wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Seed Science and Technology* 30, 231–248.

**Peña-Valdivia, C.B. y Sánchez-Urdaneta, A.B.** (2009) Effects of substrate water potential in root growth of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck seedlings. *Biological Research* 42, 239–248.

**Pereira, J.S. y Chaves, M.M.** (1993) Plant water deficits in Mediterranean ecosystems, pp. 237–251 en Smith, J.A.C.; Griffiths, H. (Eds) *Water deficits: plant responses from cell to community*. Oxford, Reino Unido. BIOS Scientific Publishers Ltd.

**Pieters, A.J., Tezara, W. y Herrera, A.** (2003) Operation of xanthophyll cycle and degradation of D1 protein in the inducible CAM plant, *Talinum triangulare*, under water deficit. *Annals of Botany* 92, 1–7.

**Ralph, P.J. y Gademann, R.** (2005) Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquatic Botany* 82, 222–237.

**Ralph, P.J., Polk, S., Moore, K.A., Orth, R.J. y Smith, W.A.** (2002) Operation of the xanthophyll cycle in the seagrass *Zostera marina* in response to variable light. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 271, 189–207.

**Ralph, P.J., Wilhelm, C., Lavaud, J., Jakob, T., Petrou, K. y Kranz, S.A.** (2010) Fluorescence as a tool to understand changes in photosynthetic electron flow regulation, pp. 75-89 en Sugget, D.J.; Borowitzka, M.A.; Prášil, O. (Eds) *Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: Methods and applications, developments in applied phycology*. Londres, Inglaterra, Springer Science.

**Rascher, U., Liebig, M. y Lüttge, U.** (2000) Evaluation of instant lightresponse curves of chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field. *Plant Cell and Environment* 23, 1397-1405.

**Rascher, U., Agati, G., Alonso, L., Cecchi, G., Champagne, S., Colombo, R., Damm, A., Daumard, F., de Miguel, E., Fernandez, G., Franch, B., Franke, J., Gerbig, C., Gioli, B., Gómez, J.A., Goulas, Y., Guanter, L., Gutiérrez-de-la-Cámara, Ó., Hamdi, K., Hostert, P., Jiménez, M., Kosvancova, M., Lognoli, D., Meroni, M., Miglietta, F., Moersch, A., Moreno, J., Moya, I., Neininger, B., Okujeni, A., Ounis, A., Palombi, L., Raimondi, V., Schickling, A., Sobrino, J.A., Stellmes, M., Toci, G., Toscano, P., Udelhoven, T., van der Linden, S. y Zaldei, A.** (2009) CEFLES2: the remote sensing component to quantify photosynthetic efficiency from the leaf to the region by measuring sun-induced fluorescence in the oxygen absorption bands. *Biogeosciences Discussions* 6, 2217-2266.

**Rawson, H.M. y Turner, N.C.** (1982) Recovery from water stress in five sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars. II. The development of leaf area. *Australian Journal of Plant Physiology* 9, 449-460.

**Redillas, M.C.F.R., Jeong, J.S., Strasser, R.J., Kim, Y.S. y Kim J.-K.** (2011) JIP analysis on rice (*Oryza sativa* cv Nipponbare) grown under limited nitrogen conditions. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 54, 827-832.

**Reséndiz-Melgar, R.C., Moreno-Pérez, E.C., Sánchez-Del Castillo, F., Rodríguez-Pérez, J.E. y Peña-Lomelí, A.** (2010) Variedades de pimiento morrón manejadas con despunte temprano en dos densidades de población. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 16, 223-229.

**Reyes-Agüero, Aguirre-Rivera, J.G. y Peña-Valdivia, C.B.** (2000) Biología y aprovechamiento de *Agave lechuguilla* Torrey. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 67, 75-88.

**Ritchie, R.J. y Bunthawin, S.** (2010a) The use of pulse amplitude modulation (PAM) fluorometry to measure photosynthesis in a CAM orchid, *Dendrobium* spp. (D. CV. Viravuth Pink). *International Journal of Plant Sciences* 171, 575-585.

**Ritchie, R.J. y Bunthawin, S.** (2010b) Photosynthesis in pineapple (*Ananas comosus comosus* [L.] Merr) measured using PAM (Pulse Amplitude Modulation) fluorometry. *Tropical Plant Biology* 3, 193-203.

**Roelfsema, M.R.G., Hanstein, S., Fell, H.H. y Hedrich, R.** (2002) CO<sub>2</sub> provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *Plant Journal* 32, 65-75.

- Romero, J., Parra, F.J., Cano, I. y Fuentes, R.** (2006) Biosorción de Cu (II) por biomasa de *Agave tequilana* weber (agave azul). 7 p. en Memorias del V Congreso Internacional y XI Nacional de Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma del Estado de Morelos y Academia Nacional de Ciencias Ambientales, Oaxtepec, Morelos. Disponible en: [http://www.uaemex.mx/Red\\_Ambientales/docs/memorias/Extenso/TA/EC/TAC-61.pdf](http://www.uaemex.mx/Red_Ambientales/docs/memorias/Extenso/TA/EC/TAC-61.pdf) (Revisado en Junio 2010).
- Romero, G.J., Parra, V.F., Cano, R.I. y Fuentes, R.** (2007) Biosorption of Pb (II) by *Agave tequilana* Weber (agave azul) biomass. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 6, 295–300.
- Ruane, J., Sonnino, A., Steduto, P. y Deane, C.** (2008) *Coping with water scarcity: What role for biotechnologies?* Food and Agriculture Organization of the United Nations, Italia. 33 p.
- Ryan, T.P.** (1997) *Modern regression methods*. New York, E.U.A. John Wiley & Sons. 515 p.
- Rylski, I. y Spigelman, M.** (1982) Effects of different diurnal temperature combinations on fruit set of sweet pepper. *Scientia Horticulturae* 17, 101–106.
- Saluson, L.A.** (2000) Pollination biology of two Chiropterophilous agaves in Arizona. *American Journal of Botany* 87: 825-836.
- Salvador, M.M., Arias, H.R. y Rubio, A.O.** (2005) Population structure of Maguey (*Agave salmiana* ssp *crassispina*) in southeast Zacatecas, Mexico. *Arid Land Research and Management* 19, 101-109.
- SAS.** (2004) *SAS/STAT® 9.1 User's Guide*. Carolina del Norte, E.U.A. SAS Institute Inc. 5121 p.
- Sánchez-Urdaneta, A.B., Peña-Valdivia, C.B., Aguirre, J.R., Trejo, C. y Cárdenas, E.** Efectos del potencial de agua en el crecimiento radical de plántulas de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck. *Interciencia* 29, 626-631.
- Schansker, G., Srivastava, A., Govindjee y Strasser, R.J.** (2003) Characterization of the 820-nm transmission signal paralleling the chlorophyll *a* fluorescence rise (OJIP) in pea leaves. *Functional Plant Biology* 30, 785–796.
- Schansker, G., Tóth, S.Z. y Strasser, R.J.** (2005) Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl *a* fluorescence rise OJIP. *Biochimica et Biophysica Acta* 1706, 250–261.
- Schreiber, U., Schliwa, U. y Bilger, W.** (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorimeter. *Photosynthesis Research* 10, 51–62.
- Schreiber, U., Neubauer, C. y Klughammer, C.** (1989) Devices and methods for room-temperature fluorescence analysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 323, 241–251.

**Schreiber, U.** (2004) Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview, pp 279-319 *en* Papageorgiou, G.C.; Govindjee (Eds) *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol 19, Dordrecht, Países Bajos, Springer.

**Schulte, P.J. y Nobel, P.S.** (1989) Responses of a CAM plant to drought and rainfall: Capacitance and osmotic pressure influences on water movement. *Journal of Experimental Botany* 40, 61-70.

**Schulte, P.J.** (2009) Water transport processes in desert succulent plants, pp. 39-55 *en* De la Barrera, E.; Smith, W.K. (Eds) *Perspectives in Biophysical Plant Ecophysiology: A Tribute to Park S. Nobel*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

**Sellers, P.J., Berry, J.A., Collatz, G.J., Field, C.B. y Hall, F.G.** (1992) Canopy reflectance, photosynthesis, and transpiration. III. A reanalysis using improved leaf models and a new canopy integration scheme. *Remote Sensing of Environment* 42, 187–216.

**Shangguan, Z.P., Shao, M.A. y Dyckmans, J.** (2000) Effects of nitrogen nutrition and water deficit on net photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in winter wheat. *Journal of Plant Physiology* 156, 46–51.

**Shao, R., Wang, K. y Shangguan, Z.** (2010) Cytokinin-induced photosynthetic adaptability of *Zea mays* L. to drought stress associated with nitric oxide signal: Probed by ESR spectroscopy and fast OJIP fluorescence rise. *Journal of Plant Physiology* 167, 472-479.

**Sharkey, T.D.** (1985) O<sub>2</sub> insensitive photosynthesis in C<sub>3</sub> plants – its occurrence and a possible explanation. *Plant Physiology* 78, 71-75.

**Sharkey, T.D., Bernacchi, C.J., Farquhar, H.D. y Singsaas, E.L.** (2007) Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C<sub>3</sub> leaves. *Plant, Cell and Environment* 30, 1035-1040.

**Sharp, R.E., Poroyko, V., Hejlek, L.G., Spollen, W.G., Springer, G.K., Bohnert, H.J. y Nguyen, H.T.** (2004) Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany* 55, 2343–2351.

**Shimazaki, K.-I., Doi, M., Assmann, S.M. y Kinoshita, T.** (2007) Light regulation of stomatal movements. *Annual Review of Plant Biology* 58, 219–247.

**Smith, S.D., Monson, R.K. y Anderson, J.E.** (1997) *Physiological ecology of North American desert plants*. Berlin, Alemania, Springer-Verlag. 286 p.

**Smith, A.M.** (2008) Prospects for increasing starch and sucrose yields for bioethanol production. *The Plant Journal* 54, 546–558.

**Souza, R.P., Machado, E.C., Silva, J.A.B., Lagoa, A.M.M.A. y Silveira, J.A.G.** (2004) Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. *Environmental and Experimental Botany* 51, 45–56.

**Srivastava, A., Guissé, B., Greppin, H. y Strasser, R.J.** (1997) Regulation of antenna structure and electron transport in photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient: OKJIP. *Biochimica et Biophysica Acta* 1320, 95–106.

**Srivastava, A., Juttner, F. y Strasser, R.J.** (1998) Action of the allelochemical, fischerellin A, on photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1364, 326–336.

**Stirbet, A. y Govindjee.** (2011) On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 104, 236–257.

**Strasser, R.J.** (1978) The grouping model of plant photosynthesis, pp. 513–524 en Akoyunoglou, G. (Ed.) *Chloroplast Development*, Holanda del Norte, Elsevier.

**Strasser, R.J.** (1981) The grouping model of plant photosynthesis: heterogeneity of photosynthetic units in thylakoids, pp. 727–737 en Akoyunoglou, G. (Ed.) *Photosynthesis: Structure and Molecular Organization of the Photosynthetic Apparatus*, vol. III, Philadelphia, E.U.A. Balaban International Science Services.

**Strasser, B.J.** (1997) Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients. *Photosynthesis Research* 52, 147–155.

**Strasser, R.J. y Greppin, H.** (1981) Primary reactions of photochemistry in higher plants, pp. 717–726 en Akoyunoglou, G. (Ed.) *Photosynthesis: Structure and Molecular Organization of the Photosynthetic Apparatus*, vol. III, Philadelphia, E.U.A. Balaban International Science Services.

**Strasser, R.J. y Govindjee.** (1991) The  $F_0$  and the O-J-I-P fluorescence rise in higher plants and algae, pp. 423–426 en Argyroudi-Akoyunoglou, J.H. (Ed.) *Regulation of Chloroplast Biogenesis*. New York, E.U.A. Plenum Press.

**Strasser, R.J. y Stirbet, A.D.** (1998) Heterogeneity of photosystem II probed by the numerically simulated chlorophyll *a* fluorescence rise (O–J–I–P). *Mathematics and Computers in Simulation* 48, 3–9.

**Strasser, R.J., Srivastava, A. y Govindjee.** (1995) Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transients in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology* 61, 32–42.

**Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M. y Srivastava, A.** (2004) Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient, pp. 321–362 en Papageorgiou, G.C.; Govindjee (Eds) *Chlorophyll *a* Fluorescence: a Signature of Photosynthesis*, vol. 19, Dordrecht, Países Bajos, Springer.

**Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Qiang, S. y Goltsev, V.** (2010) Simultaneous *in vivo* recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797, 1313–1326.

**Tester, M. y Bacic, A.** (2005) Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. *Plant Physiology* 137, 791–793.

**Teulat, B., Monneveux, P., Wery, J., Borries, C., Souyris, I., Charrier, A. y This, D.** (1997) Relationships between relative water content and growth parameters under water stress in barley: a QTL study. *New Phytologist* 137, 99-107.

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

**Tobe, K.** (2009) Comparison of initial growth responses to water availability of two Chinese desert dune species and nine cultivated species. *Arid Land Research and Management* 23, 14-27.

**Tóth, S.Z., Puthur, J.T. y Garab, G.** (2008) Naturally occurring alternative electron donors of photosystem II, pp. 691–695 en Allen, J.F.; Gantt, E.; Golbeck, J.H.; Osmond, B. (Eds) *Photosynthesis. Energy from the sun: 14th International Congress on Photosynthesis*. Dordrecht, Países Bajos, Springer.

**Tsimilli-Michael, M. y Strasser, R.J.** (2008) In vivo assessment of stress impact on plant's vitality: applications in detecting and evaluating the beneficial role of mycorrhization on host plant, pp. 679–703 en Varma, A. (Ed.) *Mycorrhiza: Genetics and Molecular Biology, Eco-function, Biotechnology, Eco-physiology, and Structure and Systematics*. Berlín, Alemania, Springer.

**Tsimilli-Michael, M. y Strasser, R.J.** (2008) Experimental resolution and theoretical complexity determine the amount of information extractable from the chlorophyll fluorescence transient OJIP, pp. 697–701 en Allen, J.F.; Gantt, E.; Golbeck, J.H.; Osmond, B. (Eds) *Photosynthesis. Energy from the sun: 14th International Congress on Photosynthesis*. Dordrecht, Países Bajos, Springer.

**Valverde, T., Quijas, S., López-Villavicencio, M. y Castillo, S.** (2004) Population dynamics of *Mammillaria magnimamma* Haworth (Cactaceae) in a lava-field in Central Mexico. *Plant Ecology* 170, 167-184.

**Van Heerden, F.D.R., Tsimilli-Michael, M., Krüger, G.H.J. y Strasser, R.J.** (2003) Dark chilling effects on soybean genotypes during vegetative development: parallel studies of CO<sub>2</sub> assimilation, chlorophyll *a* fluorescence kinetics O-J-I-P and nitrogen fixation. *Physiologia Plantarum* 117, 476–491.

**Van Heerden, P.D.R., Swanepoel, J.W. y Krüger, G.H.J.** (2007) Modulation of photosynthesis by drought in two desert scrub species exhibiting C<sub>3</sub>-mode CO<sub>2</sub> assimilation. *Environmental and Experimental Botany* 61, 124–136.

**Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J. y Zhu, J.-K.** (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal* 45, 523-539.

- Vertucci, C.W.** (1989) The kinetics of seeds imbibition: controlling factors and relevance to seedling vigor, pp. 93-115 *en* Stanwood, P.C.; McDonald, M.B. (Eds) *Seed moisture*. Special Publication No. 14. Wisconsin, E.U.A. Crop Science Society of America.
- Villalón, B.** (1981) Breeding peppers to resist virus diseases. *American Phytopathological Society* 65, 557–562.
- White, T.A., Campbell, B.D. y Kemp, P.D.** (2001) Laboratory screening of the juvenile responses of grassland species to warm temperature pulses and water deficits to predict invasiveness. *Functional Ecology* 15, 103-112.
- Whitmarsh, J. y Govindjee.** (1999) The photosynthetic process, pp. 11-51 *en* Singhal, G.S.; Renger, G.; Sopory, S.K.; Irrgang, K.-D.; Govindjee (Eds) *Concepts in Photobiology. Photosynthesis and Photomorphogenesis*. New Delhi, India/Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos, Narosa Publishing House.
- Winter, K. y Gademann, R.** (1981) Daily changes in CO<sub>2</sub> and water vapour exchange, chlorophyll fluorescence and leaf water relations in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* during the induction of crassulacean acid metabolism in response to high NaCl-salinity. *Plant Physiology* 95, 768–76.
- Wong, S.C., Cowan, I.R. y Farquhar, G.D.** (1979) Stomatal conductance correlates with photosynthetic activity. *Nature* 282, 424–426.
- Wu, J., Neimanis, S. y Heber, U.** (1991) Photorespiration is more effective than the Mehler reaction in protecting the photosynthetic apparatus against photoinhibition. *Botanica Acta* 104, 283–281.
- Xiong, L.M., Schumaker, K.S. y Zhu, J.K.** (2002) Cell signal during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell* supplement s165– s183.
- Yağmur, M. y Kaydan, D.** (2008) Alleviation of osmotic stress of water and salt in germination and seedling growth of triticale with seed priming treatments. *African Journal of Biotechnology* 7, 2156-2162.
- Yusuf, M.A., Kumar, D., Rajwanshi, R., Strasser, R.J., Tsimilli-Michaell, M., Govindjee y Sarin, N.B.** (2010) Overexpression of  $\gamma$ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797, 1428-1438.
- Zamudio, D.M., Pinos-Rodríguez, J.M., González, S.S., Robinson, P.H., García, J.C. y Montañés O.** (2009) Effects of *Agave salmiana* Otto Ex Salm-Dyck silage as forage on ruminal fermentation and growth in goats. *Animal Feed Science and Technology* 148, 1-11.
- Zeiger, E. y Zhu, J.X.** (1998) Role of zeaxanthin in blue light photoreception and the modulation of light–CO<sub>2</sub> interactions in guard cells. *Journal of Experimental Botany* 49, 433–442.
- Zeiger, E., Talbott, L.D., Frechilla, S., Srivastava, A. y Zhu, J.** (2002) The guard cell chloroplast: a perspective for the twenty-first century. *New Phytologist* 153, 415–424.

## Anexos

### Anexo A1

Fórmulas y definiciones de los términos utilizados por la prueba JIP para el análisis de las trazas de fluorescencia OJIP emitida por muestras fotosintéticas adaptadas a la oscuridad (Strasser *et al.*, 2004; 2010).

Datos extraídos del registro de las trazas de fluorescencia OJIP	
$F_t$	Fluorescencia al tiempo $t$ después de la iluminación actínica
$F_{50\mu s}$	Fluorescencia mínima registrada y confiable a los 50 $\mu s$ por el PEA
$F_{100\mu s}$	Fluorescencia a 100 $\mu s$
$F_{300\mu s}$	Fluorescencia a 300 $\mu s$
$F_J = F_{2ms}$	Fluorescencia al paso J (2 ms) de la OJIP
$F_I = F_{30ms}$	Fluorescencia al paso I (30 ms) de la OJIP
$F_P (=F_M)$	Registro de fluorescencia máxima (=máximo posible), pico P de la OJIP
$t_{F_M}$	Tiempo (en ms) para alcanzar la fluorescencia máxima $F_M$
Área	Área complementaria total entre la curva de inducción de la fluorescencia y $F-F_M$
Parámetros de fluorescencia derivados de los datos extraídos	
$F_0 = F_{50\mu s}$	Fluorescencia mínima, cuando todos los RCs están abiertos
$F_M (=F_P)$	Fluorescencia máxima, cuando todos los RCs están cerrados (= $F_P$ cuando la intensidad de luz actínica está por arriba de los 500 $\mu mol$ fotones $m^{-2} s^{-1}$ y siempre que todos los RCs estén activos reduciendo $Q_A$ )
$F_v = F_t - F_0$	Fluorescencia variable al tiempo $t$
$F_v = F_M - F_0$	Fluorescencia variable máxima
$S_m = \text{Área}/(F_M - F_0) = \text{Área}/F_v$	Área normalizada
$V_t = F_v/F_v = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$	Fluorescencia variable relativa al tiempo $t$
$M_0 = [(\Delta F/\Delta t)_0]/(F_M - F_{50\mu s}) = 4(F_{300\mu s} - F_{50\mu s})/(F_M - F_{50\mu s})$	Pendiente inicial aproximada (en $ms^{-1}$ ) de la traza de fluorescencia normalizada sobre la fluorescencia variable máxima $F_v$
Parámetros biofísicos derivados de los parámetros de fluorescencia	
$EC/RC = S_m = \text{Área}/(F_M - F_0)$	Una medida de los acarreadores de electrones totales por RC
$ABS/RC = M_0(1/V_J)(1/\phi_{P_0})$	Flujo de absorción (de las Chls antena) por RC (también una medida del tamaño de la antena aparente del FSII)

**Anexo A1** (continuación)

---

$TR_0/RC = M_0(1/V_J)$	Flujo de energía capturada (que lleva a la reducción de $Q_A$ ) por RC
$ET_0/RC = M_0(1/V_J)(1-V_I)$	Flujo del transporte de electrones (más allá de la $Q_A^-$ ) por RC
$RE_0/RC = M_0(1/V_J)(1-V_I)$	Flujo de electrones que reducen a los aceptores de electrones en el lado aceptor del FSI, por RC

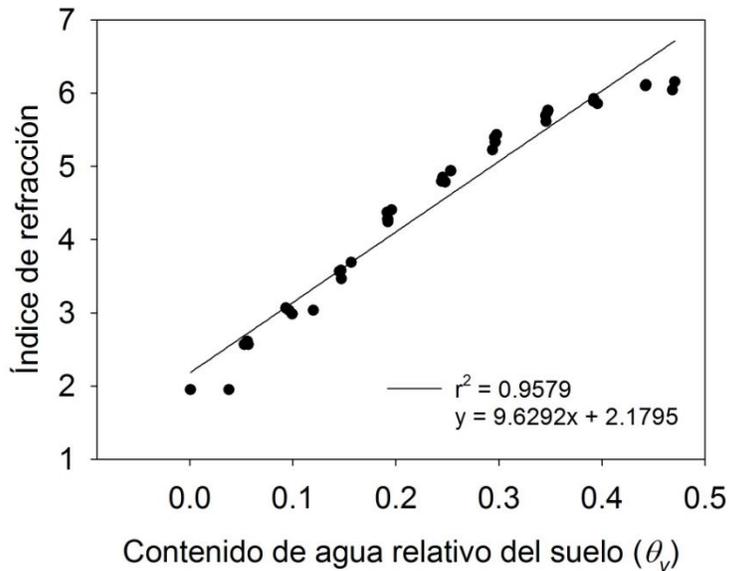
*Producciones cuánticas y eficiencias/probabilidades*

$\varphi_{Pt} = TR_t/ABS = [1-(F_t/F_M)] = \Delta F_t/F_M$	Producción cuántica de la fotoquímica primaria a cualquier tiempo $t$ , acorde a la ecuación general de Paillotin (1976)
$\varphi_{Po} = TR_0/ABS = [1-(F_0/F_M)]$	Producción cuántica máxima de la fotoquímica primaria
$\psi_{Eo} = ET_0/TR_0 = (1-V_I)$	Eficiencia/probabilidad de que un electrón se mueva más allá que la $Q_A^-$
$\varphi_{Eo} = ET_0/ABS = [1-(F_0/F_M)](1-V_I)$	Producción cuántica para el transporte de electrones (ET)
$\delta_{Ro} = RE_0/ET_0 = (1-V_I)/(1-V_J)$	Eficiencia/probabilidad con la cual un electrón de los acarreadores de electrones intersistemas es transferido para reducir los aceptores de electrones finales en el lado aceptor del FSI (RE)
$\varphi_{Ro} = RE_0/ABS = [1-(F_0/F_M)](1-V_I)$	Producción cuántica para la reducción de los aceptores de electrones finales en el lado aceptor del FSI (RE)
$\gamma_{RC} = Chl_{RC}/Chl_{total} = RC/(ABS+RC)$	Probabilidad de que una molécula de Chl del FSII funciona como RC
$RC/ABS = \gamma_{RC}/(1-\gamma_{RC}) = \varphi_{Po}(V_J/M_0) = (ABS/RC)^{-1}$	$Q_A$ que reduce los RCs por Chl antena del FSII (recíproco de $ABS/RC$ )

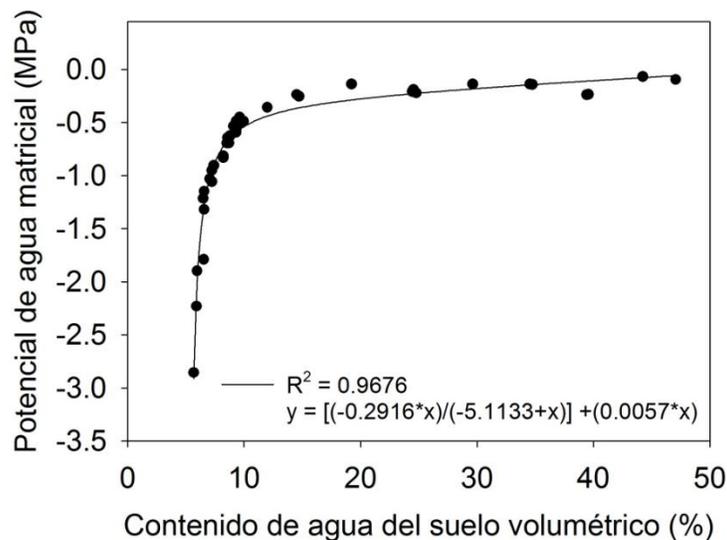
*Índices de desempeño (producto de términos que expresan los potenciales parciales en los pasos de las bifurcaciones de energía)*

$PI_{ABS} = \frac{\gamma_{RC}}{1-\gamma_{RC}} \cdot \frac{\varphi_{Po}}{1-\varphi_{Po}} \cdot \frac{\psi_{Eo}}{1-\psi_{Eo}}$	Índice de desempeño (potencial) para la conservación de la energía de los fotones absorbidos por el FSII para la reducción de los aceptores de electrones intersistemas
$PI_{total} = PI_{ABS} \cdot \frac{\delta_{Ro}}{1-\delta_{Ro}}$	Índice de desempeño (potencial) para la conservación de la energía de los fotones absorbidos por el FSII para la reducción de los aceptores finales del FSI

---



**Anexo A2.** Curva de calibración específica para la obtención de la constante dieléctrica aparente (pendiente de la ecuación) en el suelo utilizado que es suministrada al reflectómetro de tiempo HH2 moisture Meter conectado a un sensor WET (Delta-T Devices).



**Anexo A3.** Relación entre el contenido de agua (SWC) y el potencial de agua ( $\Psi_s$ ) del suelo utilizado. El SWC fue estimado mediante un reflectómetro de tiempo HH2 moisture Meter conectado a un sensor WET (Delta-T Devices) y el  $\Psi_s$  se determinó con cámaras psicrométricas C-52 adjuntas al HR 33 Dewpoint Microvoltmeter (Wescor Inc., Utah, USA). Se ajustó una función de hipérbola rectangular a los datos y fue utilizada para estimar el  $\Psi_s$  en cualquier momento con solo la estimación del SWC con el sensor WET.