

# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

---

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

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO EN CIENCIAS FORESTALES**

## **FISIOLOGÍA DE PLÁNTULAS DE *Pinus leiophylla* SOMETIDAS A ESTRÉS HÍDRICO**

**NATALIA CASTELÁN MUÑOZ**

**T E S I S**  
**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

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

2014

La presente tesis titulada “**FISIOLOGÍA DE PLÁNTULAS DE *Pinus leiophylla* SOMETIDAS A ESTRÉS HÍDRICO**”, realizada por la alumna **NATALIA CASTELÁN MUÑOZ**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**CIENCIAS FORESTALES**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

DR. MARCOS JIMÉNEZ CASAS

ASESOR

DR. HUMBERTO LÓPEZ DELGADO

ASESOR

DR. HUITZIMÉNGARI CAMPOS GARCÍA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Septiembre de 2014.

## RESUMEN

*Pinus leiophylla* Schiede ex Schlechtendal & Chamisso tiene amplia distribución en los bosques templados de México; sin embargo, sus poblaciones han sido reducidas o eliminadas por el cambio de uso de suelo o por la tala clandestina. Es considerada como una especie alternativa para los programas de reforestación y conservación de suelos dentro de su distribución natural, debido a su capacidad de establecerse y crecer en suelos pobres y pedregosos, y por presentar una relativa resistencia a sequía, heladas e incendios de baja intensidad.

En el presente trabajo se realizó una prueba de progenie con plantas de cuatro familias de *P. leiophylla*, del huerto semillero del Colegio de Posgraduados, Montecillo, Edo. Méx., en condiciones de déficit hídrico progresivo y recuperación en invernadero. Con la finalidad de obtener un perfil fisiológico y determinar si existe una variación interfamiliar en respuesta al estrés hídrico durante el estadio de plántula, para la selección temprana de familias que posiblemente sean capaces de lidiar mejor con este factor de estrés en campo, se evaluó el potencial hídrico ( $\Psi_a$ ) y osmótico ( $\Psi_o$ ), la biomasa seca y sus asignación en la relación raíz / parte aérea, la concentración de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), la actividad antioxidante de la enzima catalasa (CAT) y la fase rápida de la fluorescencia de la clorofila *a* mediante la prueba JIP, la banda-L a 100  $\mu s$ , la banda-K a 300  $\mu s$  y la curva de la fase OP.

A los 26 días, cuando las plántulas alcanzaron un  $\Psi_a$  de -3.35 MPa el estrés hídrico provocó la marchitez permanente del 50% de ellas, la disminución del  $\Psi_o$  en 1.12 veces y en 12% la acumulación de biomasa de la parte aérea, así como un efecto variable para cada familia sobre la biomasa de la raíz y la r/pa; un aumento en 29% en el contenido de la especie reactiva de oxígeno ( $H_2O_2$ ), y un decremento del 10% en la actividad CAT. Además, afectó los procesos asociados con las reacciones primarias de la fotosíntesis, provocando sobre todo el aumento de la disipación no fotoquímica de energía ( $DI_0/RC$  y  $\phi_{D0}$  en 3.87 y 1.5 veces, respectivamente) y disminuyendo el índice de vitalidad  $PI_{total}$  (85%).

La magnitud y velocidad del efecto del estrés hídrico progresivo y de los riegos de recuperación dependió de la familia de la que provienen. Las plántulas de la familia de San Juan Tetla, Pue. fueron las menos afectadas por el estrés hídrico aunque no tuvieron la mejor recuperación; mientras que las plántulas de la familia de Santa María Atepetzingo, Pue. tardaron más días en ser afectadas por la sequía que las demás, sin embargo, al final de la sequía ante el estrés extremo presentaron una afectación intermedia, además manifestaron la segunda mejor capacidad de recuperación; las plántulas de San Rafael, Edo. Méx. fueron las segundas menos afectadas por la sequía extrema y exhibieron la mejor capacidad de recuperación; y por último, las plántulas de la familia Tlalmanalco, Edo. Méx. fueron las más afectadas por el estrés hídrico y presentaron la menor capacidad de recuperación.

**Palabras clave:** estrés hídrico, *Pinus leiophylla*, variación interfamiliar, peróxido de hidrógeno, fluorescencia de la clorofila *a*.

## ABSTRACT

*Pinus leiophylla* Schiede ex Schlechtendal & Chamisso is a species from temperate forests of Mexico with wide natural distribution, whose populations have been affected by the land use change or by illegal logging without sustainable management plans. It is considered as an alternative for the programs of reforestation and conservation of soils in its natural and potential distribution by its ability to settle and grow in poor and rocky soils and for presenting a relative resistance to drought, frosts and low-intensity fires.

In this study a progeny test was performed in four families of *P. leiophylla* from a seed orchard at Colegio de Postgraduados, Montecillo, Tex. Mex., in terms of progressive water deficit and recovery in a greenhouse. In order to obtain a physiological profile we determine if there was an interfamilial variation response to water stress at seedling stage, in aim to identify families who are possibly able to better cope with stress in the field. We assessed the leaf water ( $\Psi_w$ ) and osmotic potential ( $\Psi_o$ ), the biomass components and allocation, the concentration of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), the antioxidant activity of the catalase enzyme (CAT), the rapid fluorescence transient of chlorophyll *a*, some parameters of the JIP-test, the L-band at 100  $\mu s$ , the K-band at 300  $\mu s$ , and the curve of the OP phase.

After 26 days without watering, when seedlings achieved a  $\Psi_w$  of - 3.35 MPa stress caused permanent wilting of the 50% of them, the decrease in 1.12 folds of the  $\Psi_o$ , 12% in biomass accumulation of shoot, and a variable effect for each family on the root and the relation root to shoot ratio; an increase of 29% in the content of the reactive species of oxygen  $H_2O_2$ , and a decrease of 10% in CAT activity. Drought also affected processes associated with the primary light reactions of photosynthesis, causing mainly an increased dissipation of energy by non photochemical parameters ( $DI_0/RC$  3.87 and  $\phi_{D0}$  1.50 folds) and a decreased rate of plant vitality  $PI_{total}$  (85%).

The magnitude and speed of the effect of progressive water stress and the recovery depended on the family. The seedlings of the family of San Juan Tetla, Pue. were the least affected by water stress even though they did not have the most successful recovery; the seedlings of the family of Santa María Atepetzingo, Pue. took more days to be affected by the drought than the others, however at the end of the drought treatment, extreme stress had an intermediate affectation and also expressed the second best recovery capacity; the seedlings of San Rafael, Edo. Mex. were the second least affected by extreme drought and exhibited better recovery capacity; and finally, seedlings of Tlalmanalco, Edo. family Mex. were the most affected by water stress and showed less recovery capacity.

**Key words:** water stress, *Pinus leiophylla*, interfamilial variation, hydrogen peroxide, chlorophyll fluorescence.

## AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados y a CONACYT por otorgarme los recursos para realizar este proyecto. Al pueblo de México que a través de estas instituciones financió mis estudios de maestría.

En la realización de este trabajo colaboraron muchísimas personas, por ello reconozco ante todo su sincera disposición de ayudarme. Mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. Marcos Jiménez Casa, por el gran apoyo y consejo científico y académico que me brindó en todo momento, por su paciencia y su buen sentido del humor, por alentarme durante los momentos complicados y por creer en mí.

Al Dr. Humberto López Delgado por su colaboración, por ayudarme a realizar los análisis bioquímicos, por compartir sus consejos académicos y profesionales, sus recursos materiales, y por estar pendiente de mi bienestar durante la estancia en Metepec, Edo. Méx.

Al Dr. Huitziméngari Campos García por su aportación a este trabajo, por instruirme en la medición y análisis de la respuesta rápida de la fluorescencia de la clorofila *a*. Por las pláticas sobre estrés hídrico y los consejos para realizar el experimento aún antes de participar oficialmente en el Consejo Particular.

Al Dr. J. Jesús Vargas Hernández por la asesoría durante el proceso experimental y el análisis de resultados, por la guía e interés en este trabajo.

A Don Luis Méndez Hidalgo, trabajador del huerto semillero, por su gran ayuda en el invernadero, por aligerarme la carga de trabajo, por sus atinados consejos y soluciones prácticas.

Al Dr. Carlos Trejo López por sus esclarecedoras asesorías sobre el tema de la sequía en las plantas, por su disposición y confianza para el préstamo de varios dispositivos de medición.

Al Dr. Victor Manuel Ordaz Chaparro por la asesoría y realización de la curva de retención de humedad del sustrato, por sus consejos académicos.

Al M. en C. Ricardo Marínez Gutiérrez por enseñarme y alentarme durante la realización de las evaluaciones bioquímicas y por compartir sus experiencias. De igual manera a la IBT. Natziely Yamile Torres Valdes y a los compañeros y trabajadoras del Laboratorio de Fisiología-Biotecnología, Programa Nacional de Papa, INIFAP.

Al Dr. Armando Gómez Guerrero, Dr. Carlos Ramírez Ayala, por el apoyo material y técnico brindado. A María Raquel Muñoz Pérez por la revisión del texto.

A los compañeros y amigos que me ayudaron a montar el experimento, a realizar los muestreos y a los que madrugaron conmigo para medir el potencial hídrico antes del amanecer: Ing. Carolina López Baca, Soc. Edmundo Castelán Muñoz, M.C. Celi Gloria Calixto Valencia, M.C. Erickson Basave Villalobos, M.C. Gabriel Jiménez Martínez, M.C. Oscar Javier Salgado Feregrino, Ing. Jeniffer Ivette Vargas Abonce, Ing. Gleibys Hernández Morales, Ing. Margarita Concepción Escobar Sandobal, M.C. José Luis Navarro Sandoval. A los trabajadores de los laboratorios de Botánica, Física de Suelos y del vivero del Postgrado en Ciencias Forestales del CP: M.C. Ana Bertha Galicia, Raúl Eduardo López Lozano, Maximino Juárez Zárate, Manuel Barrera Sánchez, Lauro Guadalupe Franco Mejía, Asunción Hernández Néquiz.

A todos los compañeros, profesores y trabajadores del Colegio de Postgraduados por el intercambio de ideas y experiencias que hicieron más enriquecedora y agradable mi estancia en esta institución.

A mi familia por el infinito amor y apoyo.

## CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES .....	3
2.1. <i>Pinus leiophylla</i> .....	3
2.1.1. Taxonomía .....	3
2.1.2. Descripción biológica.....	3
2.1.3. Distribución geográfica, condiciones ecológicas de crecimiento y asociación vegetal .....	3
2.1.4. Estado de conservación y su problemática .....	7
2.2. Efecto del déficit hídrico en las plantas.....	8
2.2.1. Estado hídrico y osmótico .....	9
2.2.2. Cambios en los patrones de asignación de biomasa .....	10
2.2.3. Emisión de fluorescencia de la clorofila <i>a</i> .....	12
2.2.4. Sistema oxidativo y antioxidante .....	18
2.3. Estudios de variación en <i>Pinus leiophylla</i> .....	21
III. HIPÓTESIS .....	23
IV. OBJETIVO.....	23
V. MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
5.1. Localización y duración del experimento.....	25
5.2. Material vegetal .....	25
5.3. Condiciones de crecimiento.....	25
5.4. Diseño experimental.....	26
5.5. Evaluación de las variables.....	28
5.5.1. Estado hídrico y osmótico .....	28
Potencial hídrico .....	28
Potencial osmótico.....	29
5.5.2. Biomasa seca y asignación de la biomasa .....	29
Biomasa seca .....	29
Asignación de la biomasa .....	29
5.5.3. Emisión de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> .....	30

5.5.4. Sistema oxidativo .....	32
Contenido de peróxido de hidrogeno.....	32
Actividad antioxidante de la enzima catalasa .....	32
VI. RESULTADOS .....	34
6.1. Estado hídrico y osmótico .....	34
6.2. Componentes y asignación de biomasa .....	37
6.3. Cinética de la fase OJIP de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> .....	40
6.4. Contenido de peróxido de hidrógeno y actividad de la catalasa.....	49
VII. DISCUSIÓN.....	53
7.1. Estado hídrico y osmótico .....	53
7.2. Componentes y asignación de biomasa .....	56
7.3. Cinética de la fase OJIP de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> .....	57
7.4. Contenido de peróxido de hidrógeno y actividad de la catalasa .....	64
VIII. CONCLUSIONES .....	67
IX. LITERATURA CITADA.....	70

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 5.1. Referencias geográficas, altitud, exposición, precipitación pluvial y temperatura promedio anual de las procedencias de las familias usadas en el estudio. ....	25
Cuadro 5. 2. Formulación del análisis JIP usando los datos de la fase rápida de emisión de fluorescencia. ....	31
Cuadro 6.1. Valor de <i>P</i> del ANOVA del potencial hídrico del tallo y del potencial osmótico de las acículas de plántulas de cuatro familias de <i>P. leiophylla</i> en dos niveles de humedad. En tres fechas de muestreo durante un período de 26 días de sequía progresiva (Día 0, 17 y 26) y otra después de 17 días con riegos de recuperación (17R).....	35
Cuadro 6.2.1. Valor de <i>P</i> del ANOVA del potencial hídrico del tallo y del potencial osmótico de las acículas de plántulas de cuatro familias (F) de <i>P. leiophylla</i> en dos niveles de humedad (NH). Al inicio (Día 0), al final (Día 26) de un período de 26 días de sequía progresiva y al final (Día 17R) de otro de 17 días con riegos de recuperación. ....	37
Cuadro 6.2.2. Comparación de medias de la biomasa seca de plántulas de cuatro familias de <i>P. leiophylla</i> al inicio del experimento.....	38
Cuadro 6.2.3. Comparación de medias de la biomasa seca de plántulas de cuatro familias de <i>P. leiophylla</i> , bajo dos condiciones de humedad en el sustrato: sequía (S) y testigo (T). Al final del período de sequía. ....	39
Cuadro 6.2.4. Comparación de medias de la biomasa seca de plántulas de cuatro familias de <i>P. leiophylla</i> , bajo dos condiciones de humedad: sequía (S) y testigo (T). Después del período de 17 días de riegos de recuperación, el día 44 del experimento. ....	39
Cuadro 6.4. Valor de <i>P</i> del ANOVA del contenido de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y la actividad CAT en acículas de plántulas de cuatro familias de <i>P. leiophylla</i> en dos niveles de humedad. En tres fechas de muestreo durante un período de 26 días de sequía progresiva y otra de 17 días con riegos de recuperación.....	51

## LISTA DE FIGURAS

Figura 5.1. Temperatura y humedad relativa máxima y mínima dentro del invernadero, durante el experimento.....	26
Figura 5.2. Curva de retención de humedad para el sustrato compuesto de turba, perlita y vermiculita (2:1:1). Se marcan los valores de la tensión o potencial matricial del sustrato ( $\Psi_m$ ) en el cual el contenido volumétrico de agua en el sustrato ( $\Theta_v$ ) es: agua no asimilable para la planta (ANA); agua fácilmente disponible (AFD); agua difícilmente disponible (ADD); y el agua residual (AR).....	27
Figura 6.1. Potencial hídrico del tallo (A) y potencial osmótico de las acículas (B) de plántulas de cuatro familias (JT, SM, SR y TL) de <i>P. leiophylla</i> , tratamientos de sequía (S) y testigo (T). Durante un período de 26 días de sequía progresiva y otro de 17 días con riegos de recuperación (sombreado). Los valores representan el promedio $\pm$ el error estándar, $n = 4$ .....	34
Figura 6.3.1. Trazas de fluorescencia de la clorofila <i>a</i> doblemente normalizada entre los pasos O ( $F_0$ ) y P ( $F_P$ ): $V_{OP} = (F_t - F_0)/(F_P/F_0)$ . De la cinética polifásica OJIP de la fase rápida de la FCa, de acículas preoscurecidas en plántulas de <i>Pinus leiophylla</i> de cuatro familias a) JT, b) SM, c) SR y d) TL, en condiciones óptimas de riego (T) y a distintos niveles de estrés hídrico (S), el $\Psi_a$ está indicado entre paréntesis. Cada curva representa el promedio de nueve trazas independientes ( $n = 9$ ). .....	41
Figura 6.3.2. Curvas de la diferencia en la fluorescencia variable relativa del intervalo O-P ( $\Delta V_{OP} = V_{OP \text{ sequía}} - V_{OP \text{ testigo}}$ ), en la fase rápida OJIP en acículas preoscurecidas de plántulas de <i>Pinus leiophylla</i> de cuatro familias a) JT, b) SM, c) SR y d) TL, en condiciones óptimas de riego (testigo) y en distintos niveles de estrés hídrico (S) y al final del período de recuperación (R), el $\Psi_a$ está indicado entre paréntesis. Cada curva representa el promedio de nueve curvas ( $n = 9$ ). .....	43
Figura 6.3.3. Curvas de la diferencia en la fluorescencia variable relativa en el intervalo O-K ( $\Delta V_{OK} = V_{OK \text{ sequía}} - V_{OK \text{ testigo}}$ ), banda L a 0.15 ms, de la fase rápida OJIP en acículas preoscurecidas de plántulas de <i>Pinus leiophylla</i> de cuatro familias a) JT, b) SM, c) SR y d) TL, en condiciones óptimas de riego (testigo), en distintos niveles de estrés hídrico (S) y al final del período de recuperación (R), el $\Psi_a$ está indicado entre paréntesis. Cada curva representa el promedio de nueve curvas ( $n = 9$ ). .....	44
Figura 6.3.4. Curvas de la diferencia en la fluorescencia variable relativa en el intervalo O-J ( $\Delta V_{OJ} = V_{OJ \text{ sequía}} - V_{OJ \text{ testigo}}$ ), banda K a 0.3 ms, de la fase rápida OJIP en acículas preoscurecidas de plántulas de <i>Pinus leiophylla</i> de cuatro familias a) JT, b) SM, c) SR y d) TL, en condiciones óptimas de riego (testigo), distintos niveles de estrés hídrico (S) y al final del período de recuperación (R), el $\Psi_a$ está indicado entre paréntesis. Cada curva representa el promedio de nueve curvas ( $n = 9$ ).....	46

Figura 6.3.5. Cambios en los parámetros de la prueba JIP de la fluorescencia de la clorofila en acículas preoscurecidas de plántulas de *Pinus leiophylla* de la familia JT (a) SM (b) SR (c) y TL (d) del tratamiento de sequía con respecto al testigo, en tres mediciones durante el período de sequía (S) y una medición al final de los riegos de recuperación (R), en paréntesis se indica el  $\Psi_a$ . Ver el significado de las abreviaciones de los parámetros en el Cuadro 5.2. Los valores promedio fueron normalizados con respecto al testigo ( $n = 9$ ).....47

Figura 6.4. Contenido de  $H_2O_2$  ( $\mu M/g$ ) y CAT ( $\mu M \text{ min}^{-1} g^{-1}$ ) en acículas frescas de plántulas de cuatro familias de *P. leiophylla* (JT, SM, SR y TL), tratamientos testigo (T) y sequía (S). En el día 0 (A), 17 (B) y 26 (C) del período de sequía progresiva y después del 17 días con riego de recuperación (D). Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar,  $n = 4$ .....50

## I. INTRODUCCIÓN

*Pinus leiophylla* Schiede ex Schlechtendal & Chamisso es una especie arbórea que forma parte importante del dosel y de la sucesión ecológica de los bosques de pino, pinoencino y bosque mesófilo de la zona montañosa de la Sierra Madre Occidental y del Eje Neovolcánico Transversal, a una altitud de de 1900 y 2900 msnm (Farjon y Styles 1997, Rzedowski 2006). Además de los productos maderables y combustibles que ofrece, es una de las principales especies productoras de resina. No obstante, debido a la alteración y erradicación de su hábitat, muchas de sus poblaciones han sido afectadas por la expansión de los asentamientos humanos y la infraestructura carretera, la intensificación de la conversión del bosque a monocultivos agrícolas, ganadería extensiva y por la tala clandestina (Ern 1976, Challenger 1998, Richardson et al. 2007, Morales et al. 2010).

Esta especie tiene la capacidad de establecerse en suelos pedregosos y con bajos contenidos de materia orgánica. Asimismo, presenta una relativa resistencia a la sequía, las heladas y a los incendios de baja intensidad. Por ende, ha sido considerada como una especie alternativa para los programas de reforestación y conservación de suelos que se realicen en su distribución natural o potencial (Perry 1991, CONAFOR 2007, Dvorak et al. 2007, Jiménez y Zwiazek 2014, Morales et al. 2010).

La variación genética en respuesta a los factores de estrés bióticos y abióticos ha sido reconocida en numerosas especies leñosas con amplia distribución geográfica, como *P. leiophylla*. A partir de ese patrimonio genético, la selección del germoplasma más adecuado a los objetivos de la plantación es una estrategia recomendada en programas de mejoramiento genético con objetivos comerciales o de restauración ecológica (Zobel y Talbert 1988, Young 1991, Jaquish 2011, Vargas y López 2011). Estas técnicas de mejoramiento genético por selección en huertos semilleros de especies forestales, incrementan considerablemente la ganancia genética en caracteres de interés (Zobel y Talbert 1988).

En 1991, el Postgrado en Ciencias Forestales del Colegio de Postgraduados estableció en Montecillo, Texcoco, Edo. Méx., un huerto semillero de *P. leiophylla* con 180 individuos de

12 procedencias de la región central del Eje Neovolcánico Transversal, específicamente de los estados de México, Tlaxcala, Puebla y Distrito Federal. Los individuos fueron seleccionados de un estudio de progenie con el fin de conservar *ex situ* y, mediante hibridación geográfica producir germoplasma resistente a factores adversos que pudiera tener mayor probabilidad de sobrevivencia en las reforestaciones (Jasso et al. 1994).

Las plántulas en la etapa de establecimiento pueden estar expuestas a estrés hídrico, pues las zonas a reforestar generalmente son espacios abiertos o claros en el bosque que presentan microclimas con bajos contenidos de humedad. En esa etapa las raíces tienen una longitud no mayor de 40 cm, de tal modo que se encuentran en la zona del suelo donde se pierde el agua más rápidamente por la infiltración de la precipitación, la evaporación y la competencia de otras especies vegetales (Kramer y Boyer 1995, Su et al. 2014). Bajo condiciones de estrés hídrico, en las plantas ocurren una serie de cambios fisiológicos y morfológicos que pueden ser indicadores de daño o identificados como mecanismos de resistencia o reparación (Hsiao y Acevedo 1974, Kozlowski y Pallardy 2002, Duan et al. 2005, Zhu et al. 2011). De manera que, la investigación de la variación intraespecífica en las respuestas al estrés hídrico puede proveer de información importante para la identificación de genotipos con mayor resistencia a la sequía para planeación de reforestaciones y restauración ecológica futuras, pues cualquier ajuste que aminore la reducción del contenido hídrico en la planta podría determinar su sobrevivencia (Young et al. 2000, Johnsen y Major 2011).

El presente trabajo se enfocó en determinar si individuos de *P. leiophylla*, progenie de cuatro familias del huerto semillero del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. Méx, presentan en la asignación de biomasa; en algunas características fisiológicas tales como los potenciales hídrico y osmótico, la fluorescencia de la clorofila *a*; y bioquímicas como el contenido de peróxido de hidrógeno celular y la actividad de la enzima catalasa en condiciones de un déficit hídrico progresivo hasta la marchitez permanente de la mitad de las plántulas y posteriormente con riegos de recuperación para conocer la variación en su respuesta a la sequía.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. *Pinus leiophylla*

#### 2.1.1. Taxonomía

*Pinus leiophylla* Schiede ex Schlechtendal & Chamisso, Linnaea 6: 354. 1831 (Farjon y Styles 1997).

Reino: Plantae

División: Pinophyta

Clase: Pinopsida

Orden: Pinales

Familia: Pinaceae

Género: *Pinus*

Subgénero: *Pinus*

Sección: *Leiophyllae*

Especie: *Pinus leiophylla*

Variedades: *Pinus leiophylla* var. *leiophylla*

*Pinus leiophylla* var. *Chihuahuana*

**Nombres comunes:** pino chino, ocote chino (Perry 1991, CONAFOR 2007).

#### 2.1.2. Descripción biológica

*Pinus leiophylla* es un árbol perennifolio, llega a medir de 15-30 m de altura y 35-80 cm de diámetro. Tiene tronco monopodial, erecto, terete, algunas veces bifurcado, que en rodales naturales presenta tendencias a crecer torcido sobre todo la variedad *leiophylla*; presenta yemas epicórmicas con catáfilas de 6 mm de longitud, lanceolado-subuladas, tempranamente deciduas. En árboles jóvenes la corteza es delgada, rojiza y escamosa, mientras que en árboles maduros es café grisácea, muy delgada, rugosa y con fisuras longitudinales y horizontales

profundas que la dividen en láminas de formas geométricas irregulares. La copa es bastante abierta e irregular, las ramas son largas, extendidas o ascendentes, excepto las más bajas, que están curvadas hacia abajo, se encuentran irregularmente en el tronco y comúnmente 3/5 de su altura total se encuentra libre de ramas. La madera tiene una gravedad específica de 0.44 a 0.51, es relativamente densa, dura, pesada y muy resinosa, el duramen es café pálido. (Perry 1991, Farjon y Styles 1997, CONAFOR 2007).

Las acículas son delgadas, erectas y flexibles, con márgenes finamente aserrados, son persistentes de 2-3 años, de color verde brillante o glauco; las vainas de los fascículos miden entre 12-20 mm de largo, son de color amarillo-castaño pálido y sus escamas son prematuramente deciduas, característica por la que a la especie se le clasifica en la Sección *Leiophyllae*. Las variedades de *P. leiophylla* se diferencian en su morfología principalmente por las características de las acículas, la variedad *leiophylla* presenta fascículos de (4-)5(-6) acículas, de 0.5-0.9 mm de ancho, con (3-)4-6(-7) líneas de estomas en la cara abaxial y (1-)2-3(-4) ductos de resiníferos; mientras que la variedad *chihuahuana* presenta fascículos de (2-)3(-4, raramente 5), de 0.9- 1.3(-1.5) mm de ancho, con (4-)5-8(-9) líneas de estomas en la cara abaxial y (3-)4-6(-7) canales resiníferos (Farjon y Styles 1997).

*P. leiophylla* es una planta monóica, los estróbilos masculinos se encuentran cerca del ápice de las ramas nuevas en un conglomerado denso y corto, delimitado por unas brácteas largas, subuladas, escariosas, cilíndricas de 10-15(-20) x 4-6 mm, rasa-amarillenta a café brillante. Los microsporófilos con sacos polínicos relativamente grandes y conspicuos. Los estróbilos femeninos son subterminales, se presentan solitarios o en conglomerados de 2-5, son de forma subglobosa a cónica, reflexos, miden de 5-8 cm de longitud, tienen pedúnculos robustos de 5-10 mm de largo; las escamas son pequeñas con una púa persistente erecta que se curva hacia el ápice. El primer año son pequeños, rosados con tono púrpura, el segundo año son largos y de color café verdoso. Se abren gradualmente en un período largo y son persistentes por 2 ó 3 años después de haber perdido las semillas. Las semillas son levemente triangulares, miden entre 3-5 mm de longitud, el ala mide entre 10 -12 mm de longitud, es articulada, generalmente presentan 6 cotiledones; sin embargo, pueden presentar de 5 a 7. Un kilogramo contiene aproximadamente 85 000-110 660 semillas (Perry 1991, Farjon y Stylers 1997, CONAFOR 2007).

Como todas las especies del Género *Pinus* y la mayoría de las pertenecientes a la Familia Pinaceae, *P. leiophylla* tiene 12 pares de cromosomas (Farjon y Styles 1997).

## **Fenología**

*P. leiophylla* presenta dos épocas de crecimiento al año, una durante la primavera y otra al final del verano, inicia la floración a los 5 ó 6 años de edad, es la única especie de México y de América Central en la que los estróbilos femeninos tardan 3 años en madurar, produce abundantes estróbilos de febrero a abril, la dispersión del polen se produce en marzo; las semillas pueden ser recolectadas de octubre a febrero. A pesar de que produce abundantes cantidades de semilla anualmente, la cantidad es mayor en lapsos de 3 ó 5 años (CONAFOR 2007, Jiménez y Zwiazek 2014).

### **2.1.3. Distribución geográfica, condiciones ecológicas de crecimiento y asociación vegetal**

*P. leiophylla* es una de las especies de pino más abundantes de las regiones montañosas de México, presenta una amplia distribución natural entre los 17° 30' - 31° 20' latitud norte y los 96° 30' - 111° 30' longitud oeste. Se encuentra desde el noroeste de Chihuahua hacia el sur a través de la Sierra Madre Occidental, en el centro por el Eje Neovolcánico Transversal y por la Sierra Madre del Sur hasta Oaxaca, donde no llega más allá del Istmo de Tehuantepec. Está presente en los estados de Sonora, Chihuahua, Durango, Nayarit, Zacatecas, Jalisco, Michoacán, México, D.F, Hidalgo, Morelos, Tlaxcala, Puebla, Veracruz y Guerrero. En Estados Unidos se encuentra en el sureste de Arizona y el suroeste de Nuevo México. *P. leiophylla* se desarrolla en suelos profundos y con buen drenaje, de origen volcánico o metamórfico, con textura arenosa a arcillosa, con pH 5.5-6.5, con bajo contenido de materia orgánica, nitrógeno, calcio, fósforo, pero ricos en potasio (Perry 1991, CONAFOR 2007, Dvorak et al. 2007).

Se localiza a una altitud entre los 1900 y los 2900 msnm, que corresponde a la mayor parte de la zona templada subhúmeda. En un clima marcadamente estacional con inviernos fríos y secos y con veranos cálidos y húmedos, con temperatura (-15°C) media de 16°C (38°C) y una precipitación pluvial anual, de mayo a octubre, que varía entre 700 y 1950 mm dependiendo de la localidad y la altitud (Rezedowski 2006, Challenger 1998, Farjon y Styles 1997).

Las variedades de *Pinus leiophylla*, además de presentar diferencias en las características de las acículas, también difieren en su distribución geográfica. *Pinus leiophylla* var. *leiophylla* crece en la parte sur de la cordillera, desde Oaxaca hasta Durango, en condiciones de lluvia relativamente altas; mientras que *P. leiophylla* var. *chihuahuana*, crece en la parte norte del área de distribución, desde Durango hasta Arizona en condiciones muy secas. Tolerancia heladas de -10°C hasta -15°C, en el norte de su distribución y a grandes altitudes son comunes las heladas y la nieve en invierno.

*P. leiophylla* forma parte del dosel de los bosques de pino, de pino-encino y de bosque mesófilo de montaña, en asociación con *P. arizonica*, *P. ayacahuite*, *P. cooperi*, *P. devoniana*, *P. durangensis*, *P. engelmannii*, *P. herrerae*, *P. lawsonii*, *P. lumholtzii*, *P. michoacana*, *P. montezumae*, *P. oocarpa*, *P. patula*, *P. pringlei*, *P. pseudostrobus*, *P. rudis*, *P. strobus*, *P. teocote*, *Cupressus lindleyi*, *Abies religiosa*, *A. guatemalensis*, *Juniperus* sp., *Arbutus* sp., y *Quercus* spp., entre otras (Ern 1976, Rzedowski 2006, Jiménez 2009).

*P. leiophylla* tiene un papel importante dentro de las sucesiones vegetales pues las comunidades donde forma rodales puros probablemente sea vegetación secundaria, mientras que la vegetación climax podría corresponder, en algunos casos, a un bosque mixto de *Quercus* y *Pinus* o a un bosque mesófilo perturbado. Se le reconoce como una importante especie pionera, pues es capaz de colonizar rápidamente claros en los bosques, después de talas e incendios u otro tipo de perturbaciones, además soporta los suelos más pobres y, por consiguiente, crece rápidamente en las superficies donde ha corrido lava en forma reciente (Ern 1976, Perry 1991, Musálem y Martínez 2003, Dvorak et al. 2007, Rzedowski 2006, Rodríguez et al. 2009).

## Usos

Es explotada para la producción de resina y sus derivados, su madera no es considerada de alta calidad por ser resinosa, de baja densidad y porque el tronco presenta forma y ramificaciones irregulares. Sin embargo, es utilizada para la construcción como durmientes de ferrocarril, vigas, postes para cerca, cajas de empaque, carbón vegetal, ocote y leña (Perry 1991, Farjon y Styles 1997, CONAFOR 2007, Dvorak et al. 2007).

Es una especie considerada con uso potencial como cortina rompevientos, para restauración y protección de suelos degradados debido a su alto potencial de colonización, su alta producción de semillas, su moderada tolerancia a la sequía y al frío, su alta capacidad de emitir brotes después de incendios (Perry 1994, Musálem y Martínez 2003, Rzedowski 2006, CONAFOR 2007, Dvorak et al. 2007, Rodríguez et al. 2009).

### **2.1.4. Estado de conservación y su problemática**

*P. leiophylla* no está considerada en la lista de especies en riesgo de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, y en la Lista Roja de Especies Amenazadas, de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza se encuentra en la categoría de menor riesgo debido a que es una especie de amplia distribución geográfica. No obstante, forma parte de uno de los tipos de vegetación más afectados por el impacto de los asentamientos humanos, la intensificación del uso de las tierras para cultivos agrícolas y la introducción de la ganadería extensiva, así como por la tala clandestina, que en algunos casos, ligada a la falta de interés de gobiernos locales e incluso a su asociación delictiva ha provocado la formación de policía y guardabosques comunitarios, como es el caso emblemático de Cherán en Michoacán. Además, algunas de sus poblaciones, al igual que las de *P. hartweggi*, *P. montezumae* y *A. religiosa* entre otras especies arbóreas, de los bosques del sur y suroeste del Valle de México han sufrido daños por contaminantes atmosféricos, particularmente por ozono, pues en esta zona se presentan algunos de los niveles más altos de contaminación, incluso de todo el mundo (Challenger 1998, Miller et al. 2002, Rzedowski 2006).

## **2.2. Efecto del déficit hídrico en las plantas**

Un estrés biológico es cualquier factor ambiental capaz de inducir una tensión o daño potencial que puede ser reversible o irreversible. A su vez, el estrés hídrico ocurre como resultado de un déficit hídrico, entendido como la cantidad de agua contenida en un tejido o célula en un nivel inferior al contenido hídrico en el estado más hidratado de la planta (Levitt 1980). Los árboles enfrentan múltiples eventos de estrés hídrico durante su ciclo de vida, especialmente durante el estadio de plántulas, debido a la disminución en el contenido del agua en los horizontes superficiales del suelo por infiltración de la precipitación pluvial y la subsecuente evapotranspiración. La sequía es uno de los factores de estrés ambiental más importantes para las plantas puesto que limita su sobrevivencia, crecimiento y reproducción. Es la causa más común de mortalidad en la regeneración natural y en las plantaciones (Cuevas et al. 1992, Duan et al. 2005, Shvaleva et al. 2006, Furlan 2012, Secchi y Zwieniecki 2014).

En la naturaleza, el estrés hídrico puede imponerse gradual o repentinamente, el déficit gradual del contenido de humedad del suelo es lo más común en condiciones de campo. Los efectos de la sequía pueden variar significativamente dependiendo de la duración, intensidad y estación en que ocurra, así como también del genotipo, el estadio de desarrollo y el órgano o célula afectado de la planta (Bray 1997, Duan et al. 2005).

Las plantas responden al estrés con un complejo de mecanismos a diferentes niveles que van de la expresión molecular genética, al metabolismo bioquímico a través de procesos fisiológicos individuales, cambios estructurales, hasta el nivel de comunidades y ecosistemas (Hsiao 1973, Xu et al. 2010, Kumar 2011). Algunas respuestas pueden ser indicadores de daño o identificados como mecanismos de resistencia o reparación de los daños con valores adaptativos o de aclimatación (Rachmilevitch et al. 2006). Para sobrevivir, las plantas deben escapar de la sequía o ser resistentes a ella (Levitt 1980). La resistencia puede darse tolerando una deshidratación del protoplasma a bajos contenidos relativos de agua o evadiendo un déficit hídrico interno a través de mecanismos que promueven la absorción y retarden la pérdida de agua (Bray 1997, Wu et al. 2006); lo cual es la estrategia más generalizada entre las plantas leñosas (Kozlowski y Pallardy 2002, Zhu et al. 2011, Su 2014).

### 2.2.1. Estado hídrico y osmótico

El estado hídrico de las plantas depende de lo eficiente que sea la absorción del agua del suelo por medio de la raíz y la distribución a través de la planta. El transporte del agua es requerido para transportar los nutrientes por el xilema y la savia elaborada en las células del floema, así como para mantener y regular la homeostasis del agua celular, elemento clave para controlar la turgencia involucrada en los procesos fisiológicos esenciales como la expansión celular, la apertura y cierre estomático, la epinastia de las hojas, entre otros (Chaumont 2014). Las tres diferentes rutas del transporte del agua a través de los tejidos de la planta son: a) apoplasto alrededor del protoplasto, b) simplasto a través de los plasmodesmos, y c) transcelular a través de las membranas celulares (Taiz y Zeiger 2006).

La fuerza conductora del agua dentro de la planta son los gradientes de potencial hídrico ( $\Psi_a$ ) de regiones donde es mayor hacia regiones donde es menor. El  $\Psi_a$  es una de las características más utilizadas para evaluar el estado hídrico de las plantas. Representa la energía libre del agua en un sistema, es decir, la capacidad que tiene un mol de agua para realizar un trabajo por unidad de volumen ( $\text{J mol}^{-3}$ ) (Boyer 1995). Los componentes del potencial hídrico en las plantas son:

$$\Psi_a = \Psi_o + \Psi_p$$

Donde los subíndices *o* y *p* se refieren al potencial osmótico y a la presión de turgencia respectivamente. La disminución del  $\Psi_a$  está en función del efecto de la concentración de solutos en el agua, representado por el  $\Psi_o$ . Los solutos disminuyen la energía libre del agua por disolución de la misma, por tal motivo el potencial osmótico es independiente de la naturaleza específica del soluto, se representa con valores negativos. Los gradientes osmóticos pueden generar el flujo únicamente a través de una membrana semipermeable.

El  $\Psi_p$  representa la presión hidrostática y puede asumir valores positivos o negativos según el agua esté sometida a presión o tensión. Así, por ejemplo,  $\Psi_p$  en las células es positivo y representa la presión ejercida por el protoplasto contra la pared celular, mientras que en el xilema es negativo debido a la tensión desarrollada por diferencias en el  $\Psi_p$  originadas en la transpiración. Los gradientes de presión, pueden generar flujos en conductos y a través de

membranas semipermeables (Kramer y Boyer 1995). El ejemplo más obvio del movimiento del agua en las plantas es el flujo de transpiración durante el cual la evaporación del agua a través de los estomas abiertos disminuye el  $\Psi_a$  de la hoja y causa el movimiento del agua desde el xilema hacia la superficie foliar. Este proceso crea una tensión en el xilema que conduce el agua desde el suelo hacia la raíz y hacia el tejido foliar transpirante (Chaumont 2014).

Los valores del  $\Psi_a$  cercanos a cero representan estados hídricos favorables. A medida que disminuye son afectados numerosos procesos metabólicos como la síntesis de proteínas, de pared celular, el nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS), de nitrato reductasa, y de las sustancias reguladores del crecimiento como el ácido abscísico y el etileno (Danneberger 2000). La reducción a un nivel crítico afecta directamente el funcionamiento de la fotosíntesis, la transpiración, la respiración y el metabolismo de los carbohidratos, causando una reducción del crecimiento vegetal. Finalmente, la deshidratación severa y prolongada causa trastornos en la integridad de la membrana, la desorganización del protoplasma y la muerte de la mayor parte de los organismos (Kozłowski 1999, Taiz y Zeiger 2006).

### **2.2.2. Cambios en los patrones de asignación de biomasa**

En especies forestales la sequía tarda días en ser estresante, sin embargo, cuando el déficit hídrico se genera a un ritmo suficientemente lento afecta negativamente la producción y asignación de biomasa, modificando la morfología de la planta (Furlan 2012).

El crecimiento de las plantas, resultado de la división celular y su subsecuente elongación, requiere del balance de carbono entre la fotosíntesis y la respiración. El crecimiento expansivo, definido como el incremento en el volumen de un órgano, depende de la extensibilidad de la pared celular, de los gradientes de potencial hídrico y de la conductancia hidráulica en la vía del agua hacia las células a través de la continua absorción de agua y de la presión de turgencia (Chaumont 2014).

El déficit hídrico afecta el crecimiento de manera directa. A medida que el contenido hídrico disminuye las células pierden volumen y las paredes celulares pierden la presión de turgencia.

La membrana plasmática se hace cada vez más gruesa y más comprimida porque cubre un área menor (Danneberger 2000). La pérdida de turgencia es extremadamente sensible al déficit hídrico y es el primer efecto biofísico significativo del estrés hídrico. Una pequeña disminución en el potencial hídrico (-0.1 MPa) afecta el crecimiento, y se refleja en la reducción de la elongación celular (Kramer y Boyer 1995).

También el crecimiento se ve afectado de manera indirecta, pues el cierre estomático es una de las estrategias más importantes de conservación del agua, evitando que se pierda por transpiración (Wu et al. 2006). Esto genera un conflicto fisiológico entre la necesidad de conservar el agua y la necesidad de abrir los estomas para incorporar el dióxido de carbono atmosférico para realizar la fotosíntesis, exponiéndose a sufrir deshidratación (Taiz y Zeiger 2006).

Como la raíz es la estructura de las plantas que está en contacto directo con el suelo, es el primer sitio potencial de daño o de respuestas de defensa de las plantas expuestas ante el déficit del contenido de humedad en éste. Las raíces exhiben también una reducción en la elongación, la ramificación, el crecimiento del cambium y un aumento en la suberización de los ápices (Wang y Yamauchi 2006).

Sin embargo, en condiciones de deshidratación, el estrés osmótico suele conducir a la acumulación de ácido abscísico (ABA). A niveles altos la hormona ejerce un fuerte efecto positivo sobre el crecimiento radical, suprimiendo la producción de etileno y generando un efecto negativo sobre el crecimiento del tallo. Entonces, la traslocación de carbohidratos hacia la raíz aumenta y el dramático efecto global a un largo período de deficiencia hídrica es un incremento de la relación raíz/parte aérea (estimada con base en el peso seco de ambas partes).

En especies leñosas el desarrollo de un sistema radical vigoroso y profundo es considerado como uno de los principales mecanismos de resistencia a la sequía, puesto que una mayor asignación de biomasa al sistema radical puede incrementar la cantidad de agua accesible para la planta. De esta manera pueden mantener altos potenciales hídricos y alto contenido

de agua en los tejidos, y satisfacer la demanda transpiratoria (Kozlowski y Pallardy 2002; Taiz y Zeiger 2006).

Otras respuestas de las plantas al déficit hídrico son: 1) cambios en la proporción de la biomasa de los órganos de las plantas como una vía de compensación o minimización de los daños, generalmente la parte aérea experimenta un impacto mayor que la raíz (Hernández et al. 2001); 2) aumento en la concentración de etileno que acelera la senescencia de las hojas como otra estrategia para disminuir la pérdida de agua por transpiración (Kozlowski y Pallardy 1997); 3) latencia anticipada de la yema apical en donde continúa la división celular pero se atenúa la elongación y consecuentemente el crecimiento del tallo (Chuine y Beaubien 2001).

Todas estas adaptaciones promueven la homeóstasis y además restringen la pérdida del agua del cuerpo de la planta para incrementar la absorción y reemplazar las pérdidas por transpiración (Chaves et al. 2002).

En las plantas la sensibilidad del crecimiento ante el estrés hídrico y los cambios en la distribución de carbono capturado a través del proceso fotosintético tiene una variación genética grande, la cual es mayor que la de la fotosíntesis. En muchas especies algunos genotipos detienen el crecimiento en suelos relativamente húmedos, mientras que otros continúan creciendo en suelo con una muy baja disponibilidad de agua (Tardieu et al. 2014).

### **2.2.3. Emisión de fluorescencia de la clorofila *a***

En el proceso fotosintético la luz es utilizada principalmente para dirigir el transporte de electrones del agua hacia la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP<sup>+</sup>). Acoplado con este proceso, la translocación de protones a través de la membrana de los tilacoides refuerza una diferencia en el potencial electroquímico que es empleado para la síntesis de adenosín trifosfato (ATP). El NADPH y el ATP son utilizados posteriormente en numerosas reacciones bioquímicas, de las cuales la asimilación de dióxido de carbono es cuantitativamente la más importante (Baker y Rosenqvist 2004). El transporte de electrones extraídos del agua y conducidos hacia la NADP es mediado por una cadena de

transportadores redox entre los fotosistemas II y I (PSII y PSI), operando en serie a través de la plastoquinona (PQ), el citocromo b6, el complejo f y la plastocianina (Henriques 2009).

El proceso fotosintético se inicia cuando la luz es absorbida por los pigmentos fotosintéticos, básicamente clorofila *a*, *b* y carotenoides, de los complejos antena localizados en la membrana tilacoidal. La energía transferida entre las clorofilas de las antenas y canalizada a las clorofilas del centro de reacción hace que, en éstas, un electrón pase del estado basal a un estado excitado. Cuando la molécula de clorofila excitada pierde un electrón, se produce la separación de carga eléctrica dentro del centro de reacción, quedando la clorofila *a* oxidada y una molécula de feofitina aceptora del electrón reducida. Esto se conoce como evento fotoquímico primario (González et al. 2008).

En los complejos antena, la energía de un fotón absorbido se suma a la de la molécula de pigmento que la absorbe, quedando ésta en un estado excitado inestable, con marcada tendencia a ceder este exceso de energía denominado energía de excitación o excitón y transferir la energía a otras moléculas cercanas (extinción fotoquímica) y volver al estado fundamental de energía mínima. Sin embargo, no toda la energía de la luz que es absorbida por las moléculas de la clorofila en los organismos fotosintéticos puede ser utilizada en los procesos fotoquímicos de la fotosíntesis, aunque es tan eficiente que absorbe del 95 al 97%. El exceso de energía puede ser disipado mediante la extinción no fotoquímica como radiación de calor (2.5%); o entre el 1 y el 4% como luz roja visible, es decir, como fluorescencia (Taiz y Zeiger 2006).

En las plantas, las moléculas de clorofila *a* asociadas a los fotosistemas PSI y PSII) son las responsables de la emisión de la fluorescencia, sin embargo, a temperatura ambiente (25°C), la contribución del PSI a la emisión total es mínima en comparación con el PSII (González et al. 2008). La energía emitida como fluorescencia desde una hoja es más baja que la energía de la luz absorbida y por consecuencia, el pico de emisión de fluorescencia tiene una longitud de onda más grande. Este fenómeno permite la cuantificación de la reemisión de la fluorescencia al exponer una hoja a la luz con una longitud de onda específica y la medición de la luz reemitida a longitudes de onda mayores. Generalmente, la reemisión de fluorescencia es alta cuando la fotoquímica y la disipación por calor son bajas; por lo tanto

el uso de la fluorescencia de la clorofila *a* (FCa) como un indicador brinda información de la eficiencia fotoquímica y de los procesos de fotoprotección de la hoja para disipar el exceso de energía (Rachmilevitch et al. 2006, Ceacero et al. 2012).

Los estudios de la inducción de la FCa se basan en la respuesta observada cuando la hoja se ilumina tras un periodo de adaptación a la oscuridad que se ha inducido para permitir la relajación de fluorescencia asociada con la energetización de la membrana del tilacoide (Rachmilevitch et al. 2006). Se obtiene la cinética de emisión de fluorescencia con una fase de incremento rápido de fluorescencia en el primer segundo de iluminación seguida de una fase lenta de declive de fluorescencia durante varios minutos. La fase rápida está relacionada principalmente con eventos primarios del flujo de energía a través del PSII, se analiza a través de la curva de inducción de la cinética rápida de la FCa (OJIP). Los datos graficados en una escala de tiempo logarítmica, muestran el comportamiento polifásico de la emisión de fluorescencia, cuyos pasos son: O (20-50  $\mu$ m), J (2 ms), I (30 ms) y P (pico máximo) (Strasser et al. 2000; Strasser et al. 2004).

Durante una exposición inmediata a la luz, entre los 20–50  $\mu$ s, en el paso O, se registra la fluorescencia mínima ( $F_0$ ) que asegura que los centros de reacción del PSII del principal aceptor quinona ( $Q_A^-$ ) están abiertos, es decir, oxidados al máximo y se encuentran aptos para la fotoquímica. El paso J, a los 2 ms, ( $F_J = F_{2\text{ms}}$ ) está relacionado con la reducción parcial de la  $Q_A$ , la eficiencia con la que un fotón atrapado puede mover un electrón hacia la cadena de transporte de electrones desde  $Q_A^-$  al intersistema aceptor de electrones. El siguiente punto de inflexión  $F_I$ , a los 30 ms, donde se refleja un incremento en la tasa de carga de estabilización en PSII, el aceptor primario  $Q_A^-$  y  $Q_B^-$  es reducido.

Se llega al paso P, provocando la máxima intensidad de emisión de la fluorescencia  $F_P$  ( $F_M$ ) induciendo la saturación y el cierre máximo de los centros de reacción del PSII, en ese momento la  $Q_A^-$  se encuentra totalmente reducida (Maxwell y Johnson 2000). El tiempo en el que se alcanza depende del protocolo experimental aunque en condiciones fisiológicas normales se alcanza en alrededor de 1 s. P es el punto de fluorescencia máxima debido a que el flujo de electrones desde PQ a través del complejo b/f es el paso más lento de la cadena, puesto que hay mucha más PQ que  $Q_A$  (González et al. 2008).

Los valores absolutos de  $F_0$ ,  $F_I$ ,  $F_M$  son dependientes de las actividades fotoquímicas y de las propiedades ópticas de la hoja y, por lo tanto, es importante remover la variable óptica cuando se intenta comparar los cambios en las características de la fluorescencia entre diferentes muestras de hoja. (Baker y Rosenqvist, 2004). Esto puede ser posible comparando índices o proporciones que se calculan a partir de los valores absolutos de fluorescencia registrados.

Estos valores obtenidos de la fase rápida OJIP y las ecuaciones planteadas expresan el funcionamiento de diversos componentes del PSII, como el flujo de fotones absorbido por pigmentos de la antena (ABS), flujo atrapado o flujo de energía transferida al centro de reacción que será convertida en energía redox reduciendo  $Q_A$  a  $Q_A^-$  (TR), flujo de transporte electrónico al oxidarse  $Q_A^-$  se inicia el transporte de electrones que conduce a la fijación de  $CO_2$  (ET) y el flujo de disipación de energía no atrapada como calor o transferida a otros sistemas no fluorescentes (DI) por centro de reacción (RC) o por área activa de la hoja. Algunos de ellos se señalan a continuación:

Los flujos de energía específica por centro de reacción (RC) para la absorción de electrones:  $ABS/RC = M_0 (1/V_J)(1/\phi_{P0})$ , es una estimación del número total de fotones absorbidos por molécula de clorofila de todos los RC divididos entre el número total de RC activos en el PSII. También es una medida del tamaño efectivo de antena en un centro de reacción del PSII.

La fluorescencia variable relativa a 2 ms, en el tránsito normalizado entre  $F_0$  y  $F_M$ :  $V_J = (F_J - F_0)/(F_M - F_0)$ .

La eficiencia máxima de la reacción fotoquímica primaria, del potencial cuántico del PSII en el estado adaptado a la oscuridad:  $\phi_{P0} = TR_0/ABS = F_V/F_M = (F_M - F_0)/F_M = 1 - (F_0/F_M)$ , que se refiere a la eficiencia cuántica si todos los centros del PSII están abiertos y a la probabilidad de que un fotón absorbido pudiera ser atrapado por el centro de reacción (RC) del PSII.

La eficiencia con la que un excitón atrapado pueda mover un electrón más allá de la  $Q_A^-$ :  $\Psi_{E0} = ET_0/TR_0 = 1 - V_J = 1 - [(F_{2\text{ ms}} - F_0)/(F_M - F_0)]$ .

La probabilidad de que un fotón absorbido mueva un electrón después de la  $Q_A^-$ :  $\varphi_{E0} = ET_0/ABS = \varphi_{P0} - \psi_{E0} = [1 - (F_0/F_M)][1 - V_J]$ .

La eficiencia cuántica de disipación de energía o excitación fotoquímica:  $\varphi_{D0} = DI_0/ABS = F_0/F_M = 1 - \varphi_{P0}$ .

La eficiencia cuántica para la reducción de los aceptores finales del PSI por fotón absorbido:  $\varphi_{R0} = RE_0/ABS = 1 - F_I/F_M = [1 - (F_0/F_M)][1 - V_I]$ .

La densidad de centros de reacción activos (RC) o reduciendo la  $Q_A^-$  por clorofila (Chl) antena en PSII:  $RC/ABS = \varphi_{P0}(V_J/M_0) = (ABS/RC) - 1 = \gamma_{RC}/(1 - \gamma_{RC})$  donde  $\gamma = Chl$  (de RC)/Chl total).

La probabilidad de que un electrón del intersistema de transporte de electrones del reservorio de PQ es transferido para reducir el aceptor de electrones del PSI:  $\delta_{R0} = RE_0/ET_0 = (1 - V_I) / (1 - V_J) = (F_M - F_I) / (F_M - F_J)$ .

La disipación o transporte efectivo al tiempo 0 por centro de reacción activo:  $DI_0 /RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$ .

La amplitud relativa de la fase IP:  $\Delta V_{IP} = 1 - V_I = (F_M - F_{30\text{ ms}})/(F_M - F_0)$ , que indica la eficiencia del transporte de electrones alrededor del PSI para reducir los aceptores finales de la cadena transportadora de electrones, como la ferredoxina y NADP. También indica medida de los aceptores finales reducidos en el lado aceptor del PSI.

El índice de desempeño potencial fotosintético  $PI_{ABS} = (RC/ABS) [\varphi_{P0}/(1 - \varphi_{P0})][\psi_0(1 - \varphi_{P0})] = [\gamma_{RC}/(1 - \gamma_{RC})][\varphi_{P0}/(1 - \varphi_{P0})][\psi_{E0}/(1 - \psi_{E0})]$  es una expresión de la vitalidad de la planta que refleja la funcionalidad del PSII. Integra tres parámetros de la actividad fotosintética. En primer lugar, al igual que la máxima eficiencia fotoquímica primaria, informa sobre las reacciones fotoquímicas primarias; en segundo lugar, sobre la eficiencia de conversión de energía en la fase oscura de la fotosíntesis; y, finalmente, sobre la densidad de centros de reacción activos en la clorofila (Strasser et al. 2004).

El índice de desempeño total:  $PI_{total} = PI_{ABS} [\delta_{R0}/(1-\delta_{R0})] = [\gamma_{RC}/(1-\gamma_{RC})][\phi_{P0}/(1-\phi_{P0})][\psi_{E0}/(1-\psi_{E0})][\delta_{R0}/(1-\delta_{R0})]$  es el índice de desempeño potencial de la conservación de la energía de los fotones absorbidos por PSII al flujo de reducción (RE) de los aceptores finales del PSI. Esta expresión combina cuatro parámetros favorables de la actividad fotosintética como son: la densidad de centros de reacción RC/ABS; la eficiencia cuántica de la fotoquímica primaria  $\phi_{P0} = TRo/RCo$ ; la habilidad de conducir electrones hacia la cadena transportadora de electrones entre el PSII y el PSI  $\psi_{E0}$ ; y la eficiencia con la que un electrón puede moverse de los aceptores de electrones reducidos del intersistema hacia los aceptores de electrones finales del PSI  $\delta_{R0}$  (Strasser et al. 2004, 2010).

La banda-L:  $V_{0K100} = (F_{100\ \mu s} - F_0)/(F_{300\ \mu s} - F_0)$  es la fluorescencia variable relativa, a 100  $\mu s$ , e.g. el tránsito normalizado entre  $F_0$  y  $F_K$ . Expresa la estabilidad del sistema tripartita del centro de reacción-complejo cosechador de luz- centro antena (Strasser y Stirbert 2001).

La banda-K,  $V_{0J300} = (F_{300\ \mu s} - F_0)/(F_J - F_0)$  es la fluorescencia variable relativa, a 300  $\mu s$ , e.g. el tránsito normalizado entre  $F_0$  y  $F_K$ . Expresa la eficiencia del complejo productor de oxígeno (Srivastava et al. 1997).

Las características cinéticas de la reacción de la FCa emitida son determinadas por la intensidad luminosa de excitación, la concentración de pigmentos que absorben la luz, la transferencia de la energía de excitación, la naturaleza y orientación de los pigmentos fluorescentes, el estado redox de aceptores y donadores del PSII, el apilamiento de los tilacoides y la translocación de protones, entre otros (González et al. 2008).

Estos parámetros pueden ser usados para detectar diferentes perturbaciones inducidas por factores bióticos y abióticos que dañen los sistemas fotosintéticos y provoquen la fotoinhibición y la disminución de la tasa fotosintética pues modificará significativamente las características cinéticas de la emisión de fluorescencia que en condiciones de estrés pueden definir de manera específica la fase que está afectando la condición a la cual ha sido expuesto el organismo (Baker y Rosenqvist 2004; Tardieu et al. 2014).

El estrés hídrico causa cambios substanciales en la emisión de  $F_{Ca}$  puesto que afecta la función del PSII. Daña principalmente la transferencia de electrones desde el acervo de la plastoquinona (PQ) a los aceptores finales del PSI, esto aunado a la limitación de los componentes estomatales y no estomatales, limita la asimilación de carbono. Se considera que la disminución de la difusión del  $CO_2$  atmosférico al sitio de carboxilación en las hojas es la principal causa de la disminución de la fotosíntesis bajo condiciones de estrés hídrico (Campos et al. 2014b).

La emisión de  $F_{Ca}$  ha sido utilizada rutinariamente por muchos años para monitorear el desempeño fotosintético de las plantas y para detectar diferencias en el proceso fotosintético entre ellas como mecanismos de respuesta al estrés. También la prueba JIP es útil en todas las diferentes fases del proceso de selección, cultivo en vivero y plantación en campo de árboles que muestren una mayor capacidad de lidiar con factores de estrés como la sequía, puesto que las plantas que sean capaces de mantener una alta eficiencia de PSII en condiciones de estrés, aunque la fotosíntesis neta sea reducida, son las más capaces de activar las estrategias de adaptación en las peores condiciones ecológicas (Bussotti et al. 2008).

#### **2.2.4. Sistema oxidativo y antioxidante**

A nivel celular, una de las primeras respuestas del déficit hídrico es el aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), que en exceso pueden provocar un estrés oxidativo. La disminución del potencial de turgencia debido a un déficit hídrico limita la elongación celular y la extensibilidad de la pared celular (Spollen et al. 1993), y causa la reducción de la fotosíntesis como resultado de la conductancia estomática (Gordon et al. 1999).

Al reducirse la fotosíntesis, los pigmentos antena pueden sobreexcitarse si la energía derivada de la reducción del transporte de electrones excede a la que se emplea para la fotosíntesis y provocar fotoinhibición y fotooxidación severos. Asimismo la energía excesiva puede provocar la reducción molecular de oxígeno, por medio de la cual los electrones de los

cloroplastos y las mitocondrias interactúan con el oxígeno y generan especies reactivas de oxígeno ERO (Rachmilenvitch et al. 2006, Triantaphylidès et al. 2008).

Bajo estas condiciones el oxígeno actúa como un aceptor de electrones, resultando en la formación del radical superóxido ( $O_2^-$ ); éste y su reducción producen peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y pueden combinarse subsecuentemente por la reacción de Haber–Weiss para formar el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ). El exceso de ERO en las plantas puede ser tóxico para la célula y dañar las enzimas, los ácidos nucleicos, las membranas lipídicas y en consecuencia afectar el aparato fotosintético, numerosas funciones biológicas a nivel molecular y llevar a la muerte celular (Smirnoff 1993, Mittler 2002, Rachmilevitch et al. 2006, Zhu et al. 2011).

Las ERO son producidas durante el metabolismo normal de las plantas (Asada 1999). En células vegetales, éstas se forman constantemente durante las reacciones redox de varias vías metabólicas; la incompleta reducción del oxígeno o de la oxidación del agua en el cloroplasto o la mitocondria, en la cadena de transferencia de electrones tanto de la fotosíntesis como de la respiración, en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, oxidación del glicolato, del NADPH, oxalato y de las xantinas. Las ERO participan en los procesos de la muerte celular programada y actúan como una molécula señal para controlar las reacciones de defensa en condiciones de estrés intermedio (Foyer y Noctor 1999, Mittler 2002, Munné et al. 2003, Herrera et al. 2007).

Durante el estrés hídrico el  $H_2O_2$  es una de las ERO más estables, en los tejidos fotosintéticos es producido en mayor proporción en los peroxisomas durante la foto-respiración como resultado de la actividad de la glicolato oxidasa que cataliza la oxidación del glicolato hacia glioxilato y  $H_2O_2$  (Foyer et al. 2009).

En el cloroplasto se produce estrés oxidativo cuando en el ciclo de Calvin, el nivel de  $NADP^+$  disminuye, y en ausencia de su aceptor final, la cadena de transporte de electrones se sobre reduce, ya que la cantidad de fotoelectrones producidos en los PSII y PSI no puede ser enteramente utilizada en las rutas fisiológicas de óxido-reducción (Asada 1999).

Por otra parte, en la reacción de Mehler, a nivel del PSI las restricciones sobre el consumo de ATP promueven el flujo de electrones hacia el  $O_2$  y la producción de superóxido que subsecuentemente sirve como sustrato para la formación de  $H_2O_2$  (Azofeifa 2009). Durante la sequía, la cadena de transporte de electrones mitocondrial es otra fuente de superóxido y  $H_2O_2$ . Además la membrana plasmática junto con la pared celular y el apoplasto son productoras de ERO durante la sequía en los procesos de ajuste en la pared celular en plantas leñosas que conllevan a la pérdida y adelgazamiento de la pared, asociadas con una formación posterior de lignina (Noctor et al. 2014).

Para mantener las ERO en niveles que no causen daño oxidativo los organismos han desarrollado un complejo y eficiente sistema antioxidante de defensa, compuesto por enzimas como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD), la glutatión reductasa, (enzimas del ciclo glutatión-ascórbico), la ascorbato peroxidasa (APX); además, los metabolitos como el ácido ascórbico (ASA), el glutatión (GSH) y la vitamina E, entre otros. Asimismo, el aparato fotosintético está protegido directamente por los pigmentos violaxantinas, anteraxantinas, zeaxantinas en citocromo f (Cyt f), y los carotenoides (Duan et al. 2005, Shvaleva et al. 2006, Zhu et al. 2011).

Las principales enzimas que remueven el  $H_2O_2$  son la CAT, que se localiza en los peroxisomas, la ascorbato peroxidasa que se encuentra principalmente en el citosol y en los cloroplastos y la glutatión peroxidasa (Asada 1999). La CAT puede actuar directamente sobre el  $H_2O_2$  mientras que las otras dos enzimas mencionadas requieren ascorbato y glutatión respectivamente como donadores de electrones (Kar 2011). La distribución subcelular de las enzimas sugiere que la ascorbato peroxidasa remueve  $H_2O_2$  producido durante la reacción de Mehler y otros procesos cloroplásticos, y la catalasa remueve el  $H_2O_2$  fotorespiratorio produciendo  $H_2O$  y  $O_2$  (Abdel 2001).

Un balance entre la generación de ERO y de enzimas que las degradan determina el sistema oxidativo. Estas respuestas inducidas por la sequía ocurren en un amplio rango de plantas, de anuales a árboles longevos y con importante variación inter e intraespecífica; los genotipos con alta resistencia a la sequía presentan mayor actividad antioxidante que pueden eliminar con mayor efectividad a las ERO (Shvaleva et al. 2006, Gao et al. 2009, Zhu et al. 2011).

### **2.3. Estudios de variación en *Pinus leiophylla***

Para una reforestación exitosa es importante utilizar semilla de alta calidad, bien adaptada y de la especie apropiada. Por lo que es recomendable saber si los individuos, familias, procedencias o especies pueden adaptarse al sitio para soportar las condiciones bióticas y abióticas del futuro, sobre todo en sitios donde el ambiente impone limitaciones al crecimiento y supervivencia (Jaquish 2011).

La comprensión de la diferenciación genética a través de la evaluación de la aptitud fisiológica brinda información esencial para entender las preferencias de nichos ecológicos particulares y para saber si las características fenotípicas de los individuos se deben a factores genéticos o ambientales. Esta evaluación se puede realizar directamente mediante esquejes o indirectamente mediante la progenie, observando el desarrollo de los individuos en condiciones ambientales similares (Vargas y López 2011).

Las coníferas presentan altos niveles de diversidad genética y patrones de alto flujo genético debido a la polinización cruzada y a su amplia distribución geográfica (Young 1991). Esas características a lo largo de la historia evolutiva han dado como resultado diferencias en las estrategias o mecanismos adaptativos (Young et al. 2000).

La capacidad de resistencia al déficit hídrico varía con el genotipo y en gran medida está asociada a los parámetros geográficos y ambientales del sitio de origen de la semilla (Shvaleva et al. 2005). Existen numerosos trabajos dedicados a estudiar la variación en respuesta a este factor ambiental entre especies, poblaciones, familias y genotipos de coníferas (Van Buijtenen et al. 1976, Larsen 1981, Scholz y Stephan 1982, Boltz 1986, Seiler y Johnson 1988, Vargas y Muñoz, 1988, Larsen y Mekic 1991, Tan et al. 1992, Zhang et al. 1997, Johnsen y Major 1999, Calamassii 2001, Cregg y Zhang 2001, Major y Johnson 2001, Atzmon et al. 2004, Duan et al. 2005, Gao et al 2009, López et al. 2009, Martiñón et al. 2010, Castelán 2011, Nanayakkara et al. 2014).

En *P. leiophylla*, varios estudios han reportado la existencia de variación inter e intraespecífica en respuesta a factores ambientales. Vargas y Muñoz (1988), identificaron

que *P. leiophylla* del centro de México tiene una supervivencia mayor que *P. patula*, igual que *P. montezumae* y menor que *P. greggii*. Mientras que Jiménez y Zwiazek (2014) reportan una relativa tolerancia a la salinidad en genotipos de *P. leiophylla*. A nivel de procedencias, Martínez et al. (2002a, b) encontraron diferencias entre 11 poblaciones del centro de México en la respuesta al estrés hídrico. Por otro lado, en ensayos de progenie de *P. leiophylla* establecidos en África del Sur y Brasil, se registró variación en productividad y sobrevivencia al frío entre procedencias y familias de Michoacán, Oaxaca y Durango (Dvorak et al. 2007).

En cuanto a la variación existente entre las familias de *P. leiophylla* del huerto semillero del Colegio de Postgraduados de donde se obtuvo la semilla para realizar el presente trabajo, en 2010, Gómez et al., observaron altos niveles de variación tanto en las características reproductivas como en la eficiencia reproductiva, donde las familias constituyeron la principal fuente de variación. También evaluaron la germinación y concluyeron que la semilla es de alta calidad. Sin embargo, encontraron un alto índice de endogamia (0.57) que atribuyeron a los altos niveles de autofecundación dentro del huerto.

### III. HIPÓTESIS

Las plantas de amplia distribución natural presentan variación genética en respuesta a factores de estrés ambiental. El estrés hídrico afecta el metabolismo y morfología de las plantas. Por lo que, de existir, la variación en la respuesta al estrés hídrico entre familias de *Pinus leiophylla*, procedentes de diferentes sitios, puede ser identificada de manera temprana mediante el análisis de características fisiológicas, bioquímicas y morfológicas ante un estrés severo.

### IV. OBJETIVO

#### **Objetivo general**

Caracterizar el desempeño de cuatro familias de *P. leiophylla* del huerto semillero del Colegio de Postgraduados en condiciones de estrés hídrico progresivo y su posterior recuperación para identificar una posible superioridad en la resistencia a la sequía de alguna de ellas.

#### **Objetivos particulares**

Estimar los cambios en el estado hídrico de las plántulas a través del potencial hídrico y el potencial osmótico ante un estrés hídrico extremo.

Evaluar los cambios provocados por el estrés hídrico en la asignación de biomasa en las diferentes partes de la plántula y la relación raíz / parte aérea.

Analizar los efectos del estrés hídrico y su recuperación sobre los procesos de la fotosíntesis dependientes de la luz, por medio de las trazas OJIP y la prueba JIP de la fase rápida de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a*.

Identificar la actividad antioxidante de la enzima catalasa en respuesta al contenido de peróxido de hidrógeno ante el estrés hídrico y su posterior recuperación.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Localización y duración del experimento

El experimento se desarrolló durante 44 días, del 4 de diciembre de 2012 al 17 de enero de 2013, en el invernadero del huerto semillero de polinización abierta de *Pinus leiophylla*; ubicado en el Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, Texcoco, Edo. Méx; entre los 19°29' N y 98°53' O, a 2250 msnm.

### 5.2. Material vegetal

Se utilizaron semillas recolectadas en 2009 de cuatro familias del huerto semillero de *P. leiophylla*, cuyas procedencias son: San Rafael y Tlalmanalco, Estado de México; y San Juan Tetla y Santa María Atepetzingo, Puebla (Cuadro 5.1). En total se utilizaron 360 plántulas de un año de edad, es decir, 90 plántulas por cada una de las cuatro familias estudiadas.

Cuadro 5.1. Referencias geográficas, altitud, exposición, precipitación pluvial y temperatura promedio anual de las procedencias de las familias usadas en el estudio.

Clave	Procedencias	Latitud (N)	Longitud (O)	Altitud (msnm)	Exposición	P.P. (mm)	Temperatura (°C)
JT	San Juan Tetla, Pue.	19° 15'	98° 32'	2550	E	1160	10
SM	Sta. Ma. Atepetzingo, Pue.	19° 20'	98° 31'	2500	E	950	10
SR	San Rafael, Edo. Méx.	19° 13'	98° 45'	2600	O	1072	10
TL	Tlalmanalco, Edo. Méx.	19° 11'	98° 47'	2550	O	1072	10

### 5.3. Condiciones de crecimiento

Las semillas fueron germinadas a fines de octubre de 2011 y trasplantadas a contenedores de plástico (310 c.c.) con un sustrato hecho de la mezcla de turba, perlita y vermiculita, en proporción volumétrica de 2:1:1, respectivamente. Fueron mantenidas en condiciones de invernadero, con malla sombra del 75%, y humedad del sustrato cercana a capacidad de

campo. Asimismo, fueron fertilizadas en el riego cada 15 días, con fertilizante de macro y micronutrientes a base de nitrógeno, fósforo y potasio en proporciones de 10-30-20, durante diciembre y enero; 20-20-20 de febrero a mayo; y 4-25-35 de junio a octubre.

En junio, aunado al cambio de fertilizante, las plántulas fueron movidas del invernadero y trasladadas al aire libre dentro de las instalaciones del huerto para inducir su lignificación. A finales de octubre fueron trasplantadas a los rizotrones, que consistieron de dos tubos de PVC, de 20 cm de altura por 10 cm de diámetro, unidos con un cople y con una malla en el fondo. Se utilizó el sustrato antes mencionado, pero en esta ocasión se le agregó fertilizante de liberación prolongada. Enseguida fueron trasladadas al invernadero para su aclimatización antes del experimento. Durante el experimento, la temperatura y la humedad fue registrada con un higrómetro (Figura 5.1).

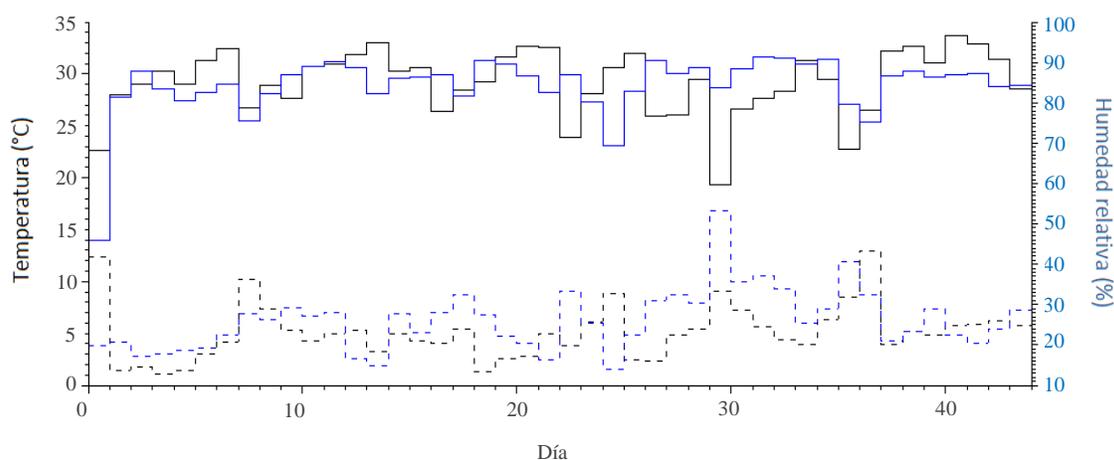


Figura 5.1. Temperatura y humedad relativa máxima y mínima dentro del invernadero, durante el experimento.

#### 5.4. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental con arreglo de parcelas divididas en boques al azar con tres repeticiones. La parcela grande correspondió al nivel de humedad en el sustrato y la parcela chica correspondió a la familia. Se evaluaron ocho tratamientos, obtenidos de la combinación de las dos condiciones de humedad por las cuatro familias.

Las 360 plántulas fueron divididas en dos grupos. La mitad de las plántulas de cada familia, las plántulas del tratamiento testigo (T), fueron mantenidas bajo un régimen de riego óptimo, para conservar el sustrato con contenido de humedad volumétrica ( $\Theta_v$ ) entre 65% y 85%. Mientras que a la otra mitad, las plántulas designadas como tratamiento de sequía (S), el día cero del experimento se les aplicó el último riego a 85% de  $\Theta_v$  y se les suspendió el riego hasta que la mitad presentó signos de marchitez permanente, 27 días después. Ese día se reanudaron los riegos de recuperación cercanos a 85% de  $\Theta_v$  y se mantuvieron durante 17 días.

Para conocer las propiedades de retención de humedad del sustrato, se determinó la densidad aparente y la curva de retención de humedad mediante el método del embudo (De Boodt et al. 1974, Scott 2000) (Figura 5.2).

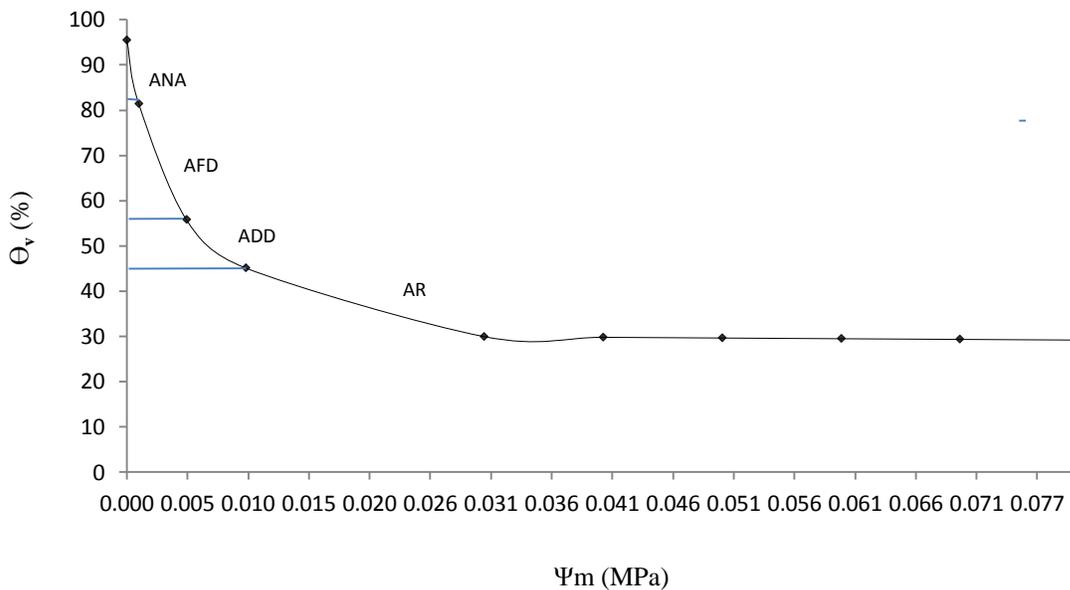


Figura 5.2. Curva de retención de humedad para el sustrato compuesto de turba, perlita y vermiculita (2:1:1). Se marcan los valores de la tensión o potencial matricial del sustrato ( $\Psi_m$ ) en el cual el contenido volumétrico de agua en el sustrato ( $\Theta_v$ ) es: agua no asimilable para la planta (ANA); agua fácilmente disponible (AFD); agua difícilmente disponible (ADD); y el agua residual (AR).

El  $\Theta_v$  se monitoreó cada tercer día con un sensor de reflectometría de dominio temporal (TDR, por sus siglas en inglés) (WET Sensor, AT Delta-T Devices Ltd, Reino Unido) en una

muestra de nueve rizotrones por cada uno de los ocho tratamientos, en los primeros 8 cm de la superficie del sustrato. El sensor fue calibrado específicamente para el sustrato empleado.

## **5.5. Evaluación de las variables**

Para hacer una caracterización fisiológica del efecto del estrés hídrico en las plántulas de cada familia y evaluar la variación fenotípica interfamiliar se consideraron como respuesta los promedios de las variables potencial hídrico, potencial osmótico, relación de la biomasa de raíz entre la biomasa de la parte aérea, emisión de la clorofila *a*, contenido de peróxido de hidrógeno y actividad de la catalasa. Durante el experimento se realizaron mediciones de las variables en cuatro fechas: al inicio, el día 0; el día 17; el día 27, correspondiente al último día de sequía; y el día 44 (después de 17 días de recuperación de humedad), el último día del período de recuperación. Únicamente la biomasa no se evaluó el día 17 del tratamiento de sequía.

### **5.5.1. Estado hídrico y osmótico**

#### **Potencial hídrico**

El potencial hídrico de la plántula ( $\Psi_a$ ) fue medido con el método de balance de presiones (Scholander et al. 1965) usando una cámara de presión tipo Scholander (Modelo 3005, Soilmoisture Equipment Corp.), antes del amanecer, entre las 4:30 y 6:00 hr del día. Se utilizó una muestra aleatoria de cuatro plantas por cada uno de los ocho tratamientos. A cada individuo se le cortó el tallo, contando 30 cm del ápice hacia abajo, y entonces fue introducido, con el corte expuesto al exterior; fue sometido gradualmente a la presión del gas nitrógeno. Se registró la presión (MPa) a la cual brotó la primera gota de savia por el sitio de escisión, que representa la tensión a la cual la savia era retenida en el xilema (Boyer 1995).

## Potencial osmótico

Inmediatamente después de medir el potencial hídrico, de los mismos individuos fue tomada una muestra de 2 g de acículas. Se sumergió en nitrógeno líquido con el fin de romper las membranas celulares, y a continuación, se extrajo la savia del tejido a presión con un émbolo de 5 ml. Se midió la osmolaridad de 20 µl de savia en un osmómetro de presión de vapor (Vapro, Modelo-5520, Wescor Inc.) a una temperatura ambiental de 20°C. El potencial osmótico se calculó a partir de la ecuación de van't Hoff (Taiz y Zeiger 2006):

$$\Psi_o = -cRT \quad [ \text{MPa} ]$$

En donde:

$\Psi_o$  = potencial osmótico de la solución

c = concentración de solutos (mol)

R = constante general de los gases (0.00831 kg MPa mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>)

T = temperatura absoluta (°K)

### 5.5.2. Biomasa seca y asignación de la biomasa

#### Biomasa seca

Los valores de la biomasa seca se obtuvieron mediante una técnica destructiva en la que cada individuo fue seccionado en raíz y parte aérea; secado en una estufa a una temperatura de 70°C hasta obtener una biomasa constante en una balanza analítica con precisión de 0.001 g (Scout Ohaus). Se utilizó una muestra aleatoria de seis plántulas por cada uno de los ocho tratamientos.

#### Asignación de la biomasa

La asignación de la biomasa se estimó a partir del cociente:

$$\text{Relación} = \frac{W_r}{W_{pa}}$$

Donde:  $W_r$  = biomasa de la raíz y  $W_{pa}$  = biomasa de la parte aérea

### 5.5.3. Emisión de la fluorescencia de la clorofila *a*

Para medir la respuesta rápida de emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* (FCa) fueron seleccionados nueve individuos al azar por tratamiento (familia x nivel de humedad). Se ocuparon acículas intactas, completamente expandidas, situadas a 15 cm abajo del ápice, las mismas acículas de los mismos individuos fueron medidas en cada ocasión. Previo a la medición, las acículas utilizadas fueron oscurecidas durante 20 min con clips foliares de exclusión de luz. La emisión de la FCa de las acículas fue inducida al ser expuestas a un pulso saturante de luz roja (pico de fluorescencia resultante a 650 nm) con una densidad de flujo fotónico fotosintético de  $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , en un área de  $12 \text{ mm}^2$ , con un fluorómetro portátil de seis diodos de luz, PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments Ltd.) de alta resolución ( $10 \mu\text{s}$ ).

La fluorescencia fue registrada durante 1 s, a una frecuencia de  $10 \mu\text{s}$  durante los primeros 2 ms y después cada 1 ms, de la cual se obtuvo:

La curva inducción de cinética de la fase rápida de la FCa OJIP para cada familia en las cuatro fechas de medición.

La curva de la fluorescencia variable relativa en el intervalo de  $F_0$  ( $0.05 \mu\text{s}$ ) a  $F_P$  (1 s), expresada como  $\Delta V_{0P} = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$  y la diferencia del tratamiento de sequía menos el testigo  $\Delta V_{0P} = V_{0M \text{ sequía}} - V_{0M \text{ testigo}}$ .

La banda L, a 0.15 ms, a partir de la fluorescencia variable relativa en el intervalo de  $F_0$  (0.05 ms) a  $F_K$  (0.3 ms) expresada como  $V_{0K} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$ , y la diferencia del tratamiento de sequía menos el testigo  $\Delta V_{0K} = V_{0K \text{ sequía}} - V_{0K}$  (Strasser y Stirbert 2001).

La banda K, a 0.3 ms, a partir de la fluorescencia variable relativa en el intervalo de  $F_0$  (0.05 ms) a  $F_K$  (1 ms), expresada como  $V_{0J} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$ , y la diferencia del tratamiento de sequía menos el testigo  $\Delta V_{0J} = V_{0J \text{ sequía}} - V_{0J \text{ testigo}}$  (Srivastava et al. 1997).

Adicionalmente la cinética rápida fue analizada mediante la prueba JIP (Strasser et al. 2004, 2010). En el Cuadro 5.2 se presenta el conjunto de fórmulas y significado de los parámetros absolutos registrados y de los parámetros calculados a partir de éstos.

Cuadro 5. 2. Formulación del análisis JIP usando los datos de la fase rápida de emisión de fluorescencia.

Valores absolutos de la inducción de la FCa	
$F_0 = F_{50 \mu s}$	Fluorescencia mínima, a 50 $\mu s$ (paso O de OJIP)
$F_J = F_{2 \text{ ms}}$	Fluorescencia a 2 ms (paso J de OJIP)
$F_I = F_{30 \text{ ms}}$	Fluorescencia a 30 ms (paso I de OJIP)
$F_M = F_P$	Fluorescencia máxima a 1 s (paso P de OJIP)
Parámetros derivados	
$V_J = (F_J - F_0)/(F_M - F_0)$	Fluorescencia variable relativa a 2 ms
$\Delta V_{IP} = 1 - V_I = (F_M - F_I)/(F_M - F_0)$	Amplitud relativa de la fase IP
Eficiencia y probabilidad cuántica (o relaciones de flujo)	
$\phi_{P0} = TR_0/ABS = F_V/F_M = (F_M - F_0)/F_M = 1 - (F_0/F_M)$	Eficiencia cuántica máxima de la fotoquímica primaria del PSII
$\psi_{E0} = ET_0/TR_0 = 1 - V_J = 1 - [(F_2 \text{ ms} - F_0)/(F_M - F_0)]$	Probabilidad de que un fotón de RC PSII pase después de QA
$\phi_{D0} = DI_0/ABS = F_0/F_M = 1 - \phi_{P0}$	Eficiencia cuántica de disipación de energía
$\phi_{E0} = ET_0/ABS = \phi_{P0} - \psi_{E0} = [1 - (F_0/F_M)][1 - V_J]$	Eficiencia cuántica del transporte de electrones
$\phi_{R0} = RE_0/ABS = 1 - (F_I/F_M) = [1 - (F_0/F_M)][1 - V_I]$	Eficiencia cuántica para la reducción de los aceptores finales del PSI por fotón ABS
$\delta_{R0} = RE_0/ET_0 = (1 - V_I) / (1 - V_J) = (F_M - F_I) / (F_M - F_0)$	Probabilidad de que un electrón de PQ <sup>+</sup> pase hacia el aceptor de electrones de PSI
Flujos específicos expresados por centro de reacción (RC)	
$RC/ABS = \gamma_{RC}/(1 - \gamma_{RC}) = \phi_{P0}(V_J/M_0) = (ABS/RC)^{-1}$	QA reduciendo RC por antena en PSII (recíproco de ABS/RC)
$ABS/RC = M_0(1/V_J)(1/\phi_{P0})$	Absorción de fotones por molécula de clorofila entre los RC activos en PSII
$DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$	Disipación de energía por RC activo de PSII
Índices de desempeño o vitalidad	
$PI_{ABS} = (RC/ABS) (\phi_{P0}/\phi_{D0})(\psi_{E0} \cdot \phi_{D0})$ $= [\gamma_{RC}/(1 - \gamma_{RC})][\phi_{P0}/(1 - \phi_{P0})][\psi_{E0}/(1 - \psi_{E0})]$	Índice de desempeño
$PI_{total} = PI_{ABS} [\delta_{R0}/(1 - \delta_{R0})]$	Índice de desempeño total

La medición del FCa tiene la cualidad de no ser invasiva ni destructiva, además de ser de respuesta rápida y proveer una gran cantidad de información, por lo que se pueden tomar un gran número de muestras en poco tiempo (Strasser et al. 2000; Baker y Rosenqvist 2004; Campos et al. 2014a).

#### **5.5.4. Sistema oxidativo**

##### **Contenido de peróxido de hidrogeno**

El contenido de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) fue determinado con el método de quimioluminiscencia por luminol (3-aminofthalhidácida) propuesto por Warm y Laties (1982), mediante un luminómetro (MGM instruments Optocomp). Una muestra de 0.2 g de acícula de pino congelada con nitrógeno líquido, fue macerada en mortero con 1.6 ml de 5% de ácido tricloroacético (TCA) y centrifugada a 10 000 rpm durante 10 min a 4 °C. La interferencia de los compuestos de color del extracto crudo fue eliminada mediante la purificación con una cromatografía de 0.5 g de Dowex. Para ello se pasaron por la columna cromatográfica 0.5 ml de TCA, 0.5 ml de alícuota de la muestra centrifugada y finalmente 3 ml de TCA.

La solución final de cada muestra consistió de 4.5 ml de hidróxido de amonio ( $NH_4OH$ ) 0.2 M, 0.5 ml del extracto pasado por la cromatografía y 0.5 ml de luminol. El extracto fue calibrado con un estándar interno de  $H_2O_2$ . La reacción fue iniciada por la adición de 50  $\mu$ l de la mezcla de reacción (4.2 mg de ferrocianuro de potasio / 250 ml de solución de  $NH_4OH$  al 0.2 M), agregada a 450  $\mu$ l de la solución de cada muestra, inmediatamente antes de la medición en el luminómetro. El contenido de  $H_2O_2$  fue calculado basado en una curva estándar. Se utilizó una muestra de cuatro individuos por tratamiento (dos niveles de humedad x cuatro familias) y se realizaron 6 lecturas en el luminómetro por cada individuo.

##### **Actividad antioxidante de la enzima catalasa**

La actividad de la catalasa (CAT) se determinó por el método de espectrofotometría propuesto por Aebi (1984). La tasa de decremento en la absorbancia 240 nm fue registrada por 3 min a 25 °C y la actividad CAT calculada como el consumo de  $H_2O_2$  (coeficiente de extinción  $39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) donde una unidad de enzima descompone un  $\mu$ mol.

Para extraer la enzima, 0.06 g de acícula de pino congelada con nitrógeno líquido fue molida en un mortero con 240  $\mu$ l de buffer de 50 mM fosfato de potasio  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 7.0), 5 mM DTT, 1 mM EDTA y 2% polivinilpolipirrolidona; centrifugado a 10 000 rpm por 15 min a 4°C. El extracto fue mantenido a una temperatura cercana a 0°C.

La mezcla de reacción se preparó con 1.98 ml de 50 mM buffer de fosfato de potasio y sodio pH 7.0, 1 ml de 30 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\text{H}_2\text{O}_2$ / buffer de potasio y sodio) y 20  $\mu$ l del extracto de acícula. Se usaron como muestra los mismos cuatro individuos por tratamiento a los que se les cuantificó el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se realizaron tres repeticiones de la lectura de cada muestra. El blanco de cada muestra consistió de 2.98 ml de buffer de potasio y sodio, y 20  $\mu$ l de alícuota del extracto de la muestra.

El contenido de proteína soluble (mg/ml) fue cuantificado a 280 nm mediante un espectrofotómetro (NANODROP 1000), con 0.2  $\mu$ l del extracto inicial por muestra; así mismo el blanco consistió de 0.2  $\mu$ l de buffer de extracción.

## **5.5. Análisis estadístico**

Todas las variables medidas, excepto las de inducción de la fluorescencia de la clorofila *a*, se analizaron estadísticamente mediante una prueba de análisis de la varianza ANOVA. Para la medición inicial (día 0) con un arreglo completamente al azar. Para las fechas de muestreo restantes se empleó un diseño de parcelas divididas, donde los niveles de humedad (testigo y sequía) representaron a las parcelas grandes, y las cuatro familias representaron a las parcelas chicas. Para detectar diferencias o interacción entre las familias y el nivel de humedad en el sustrato en cada variable.

A condición de encontrar diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en el ANOVA, se aplicó la prueba de comparación de medias por diferencia mínima significativa (DMS) con un nivel de confianza del 0.05.

## VI. RESULTADOS

### 6.1. Estado hídrico y osmótico

Al inicio del experimento las plántulas presentaron un potencial hídrico ( $\Psi_a$ ) de -0.38 a -0.43 MPa y un potencial osmótico ( $\Psi_o$ ) de -1.68 a -1.91 MPa (Figura 6.1); no hubo diferencias estadísticas entre las cuatro familias (Cuadro 6.1). De hecho, en ninguna de las cuatro fechas de medición las plántulas presentaron diferencias significativas entre las familias en su  $\Psi_a$ .

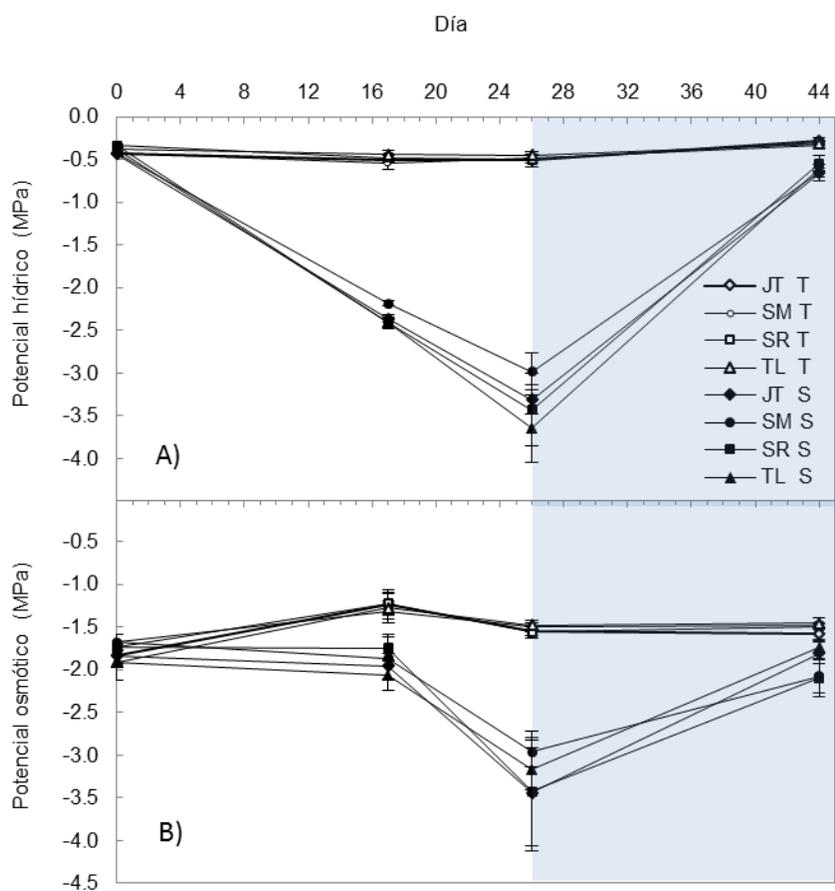


Figura 6.1. Potencial hídrico del tallo (A) y potencial osmótico de las acículas (B) de plántulas de cuatro familias (JT, SM, SR y TL) de *P. leiophylla*, tratamientos de sequía (S) y testigo (T). Durante un período de 26 días de sequía progresiva y otro de 17 días con riegos de recuperación (sombreado). Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar,  $n = 4$ .

Cuadro 6.1. Valor de *P* del ANOVA del potencial hídrico del tallo y del potencial osmótico de las acículas de plántulas de cuatro familias de *P. leiophylla* en dos niveles de humedad. En tres fechas de muestreo durante un período de 26 días de sequía progresiva (Día 0, 17 y 26) y otra después de 17 días con riegos de recuperación (17R).

Fuente de variación	Potencial hídrico				Potencial osmótico			
	Día 0	Día 17	Día 26	Día 17R	Día 0	Día 17	Día 26	Día 17R
Nivel de H		0.000 *	0.000 *	0.000 *		0.000 *	0.000 *	0.000 *
Familia	0.205	0.454	0.729	0.675	0.579	0.755	0.001 *	0.352
NH x F		0.023 *	0.666	0.703		0.835	0.001 *	0.290

\* indica diferencias significativas al 0.05.

El  $\Psi_a$  de las plantas sin riego disminuyó progresivamente conforme disminuyó el contenido de humedad en el sustrato. En la segunda medición, tomada el día 17, de acuerdo con los resultados del ANOVA, el  $\Psi_a$  en las plántulas reflejó la interacción de las fuentes de variación. Debido a que, según la prueba DMS, los promedios de  $\Psi_a$  de las plántulas testigo, registrados entre -0.44 y -0.53 MPa fueron estadísticamente iguales entre las familias y mayores que el  $\Psi_a$  de las plántulas en sequía de todas las familias.

En condiciones de sequía las plántulas de la familia SM presentaron un  $\Psi_a$  promedio (-2.19  $\pm$  0.03 MPa) estadísticamente mayor que el de las demás familias (-2.36  $\pm$  0.05, -2.40  $\pm$  0.05, -2.41  $\pm$  0.07 MPa para JT, SR y TL, respectivamente). Lo que significó una disminución del  $\Psi_a$  de las plántulas en sequía, de 3.73 veces en la familia JT, 3.07 en SM, 4.05 en SR y 4.50 en TL, con relación al testigo.

En la misma fecha todas las familias tuvieron el  $\Psi_o$  estadísticamente igual, pero en todas las familias el  $\Psi_o$  de las plántulas en sequía fue distinto al  $\Psi_o$  del testigo. Los promedios de  $\Psi_o$  de las plántulas en sequía estuvieron entre -1.75 y -2.07 MPa, fueron estadísticamente menores que los del testigo, los cuales estuvieron entre -1.23 y -1.32 MPa. De modo que por efecto del déficit hídrico el  $\Psi_o$  de las plántulas disminuyó 59, 41, 42 y 62% para JT, SM, SR y TL, respectivamente.

El período de sequía terminó el día 26 cuando la mitad de las plántulas presentó marchitez permanente. Las diferencias del  $\Psi_a$  entre las plántulas de los dos niveles de humedad se incrementaron en gran medida, el  $\Psi_a$  disminuyó 5.53 veces en la familia JT, 5.22 en SM,

5.89 en SR y 7.20 en TL, con respecto al testigo. El menor  $\Psi_a$  registrado fue de -5 MPa, en una plántula de la familia TL. Los promedios de los  $\Psi_a$  de las plántulas en sequía disminuyeron hasta llegar a  $-3.31 \pm 0.17$ ,  $-3 \pm 0.22$ ,  $-3.4 \pm 0.43$  y  $-3.65 \pm 0.39$  MPa para las familias JT, SM, SR y TL, respectivamente; mientras que en sus testigos se mantuvieron en  $-0.51 \pm 0.03$ ,  $-0.48 \pm 0.04$ ,  $-0.50 \pm 0.08$  y  $-0.45 \pm 0.03$  MPa, en la familia correspondiente.

Al mismo tiempo aumentaron las diferencias del  $\Psi_o$  entre los dos niveles de humedad. También se manifestó una interacción entre los factores de variación (nivel de humedad x familia). De manera que, en condiciones de sequía las plántulas de las familia JT y SR presentaron un  $\Psi_o$  significativamente menor que el de las demás familias,  $-3.4 \pm 0.62$  y  $-3.42 \pm 0.70$  MPa respectivamente; mientras que el  $\Psi_o$  de las plántulas de la familia TL fue de  $-3.16 \pm 0.24$  MPa y de la familia SM fue de  $-2.96 \pm 0.17$  MPa y  $-2.73 \pm 0.13$  MPa respectivamente. Mientras que el  $\Psi_o$  de las plántulas testigo fue estadísticamente igual entre las familias, se mantuvo entre -1.47 y -1.56 con un error estándar promedio de  $\pm 0.06$  MPa. Lo que implicó una disminución por efecto del déficit hídrico de 1.22 veces para la familia JT, 1.19 para SM, 0.97 para SR y 1.14 para TL.

El día 27 se comenzaron a aplicar los riegos de recuperación y 17 días después, en el día 44, se hizo el último muestreo. Para entonces, aunque las diferencias de  $\Psi_a$  siguieron siendo significativas entre los niveles de humedad en todas las familias, los  $\Psi_a$  disminuyeron bastante en unidades de tensión. Los promedios del  $\Psi_a$  de las plántulas del tratamiento testigo estuvieron entre -0.28 y -0.33 MPa, en tanto que los promedios del  $\Psi_a$  de las plántulas previamente sometidas a sequía estuvieron entre -0.55 y -6.6 MPa. Las plántulas de las familias JT, SR, SM y TL que sufrieron estrés hídrico presentaron un  $\Psi_a$  132, 97, 82 y 90% menor, respectivamente, que las plántulas mantenidas en condiciones óptimas de humedad.

Después de 17 días con riego de recuperación, sólo el  $\Psi_o$  de las plántulas de las familias SM y SR continuó siendo menor (40%) que el de su testigo correspondiente. De manera que las plántulas previamente mantenidas en sequía de la familia SM presentaron un  $\Psi_o$  promedio de  $-2.08 \pm 0.19$  MPa cuando en su testigo fue de  $-1.48 \pm 0.03$  MPa; y el de las plántulas previamente estresadas de la familia SR fue de  $-2.1 \pm 0.22$  MPa cuando en su testigo fue de  $-1.50 \pm 0.03$  MPa. Mientras que las plántulas de familias JT y TL que previamente fueron

sometidas a sequía presentaron un  $\Psi_o$  ( $-1.80 \pm 0.13$  y  $-1.73 \pm 0.07$  MPa, respectivamente) que se equiparó estadísticamente al  $\Psi_o$  del testigo correspondiente ( $-1.57 \pm 0.07$  y  $-1.46 \pm 0.07$  MPa).

## 6.2. Componentes y asignación de biomasa

### Biomasa seca inicial

El análisis de varianza indica que al inicio del experimento las plántulas de las cuatro familias tuvieron una biomasa estadísticamente igual ( $P \leq 0.05$ ), tanto en la raíz como en la parte aérea, en promedio pesaron  $1.23 \pm 0.11$  y  $4.24 \pm 0.26$  g, respectivamente (Cuadro 6.2.1 y 6.2.2). De manera que tampoco presentaron diferencias entre familias en la asignación de la biomasa observada en la relación raíz entre parte aérea (r/pa), que en promedio fue de 0.27. Sin embargo, dicho valor indica que hubo una menor asignación de biomasa seca hacia la raíz en comparación con la parte aérea, aunque dicho comportamiento puede ser producto del crecimiento en contenedores con un volumen limitado.

Cuadro 6.2.1. Valor de P del ANOVA del potencial hídrico del tallo y del potencial osmótico de las acículas de plántulas de cuatro familias (F) de *P. leiophylla* en dos niveles de humedad (NH). Al inicio (Día 0), al final (Día 26) de un período de 26 días de sequía progresiva y al final (Día 17R) de otro de 17 días con riegos de recuperación.

Fuente de variación	Día 0			Día 26			Día 17R		
	raíz	p. aérea	r / pa	raíz	p. aérea	r / pa	raíz	p. aérea	r / pa
NH				0.480	0.009 *	0.095	0.000 *	0.000 *	0.000 *
F	0.660	0.999	0.664	0.646	0.892	0.633	0.271	0.284	0.943
NH x F				0.007 *	0.203	0.071	0.093	0.502	0.651

\* indica diferencias significativas al 0.05.

Cuadro 6.2.2. Comparación de medias de la biomasa seca de plántulas de cuatro familias de *P. leiophylla* al inicio del experimento.

Familia	Biomasa inicial (g)		
	raíz	parte aérea	r / pa
JT	1.13 ± 0.08	4.26 ± 0.27	0.27 ± 0.01
SM	1.20 ± 0.10	4.23 ± 0.21	0.28 ± 0.01
SR	1.16 ± 0.13	4.26 ± 0.18	0.28 ± 0.04
TL	1.02 ± 0.11	4.22 ± 0.39	0.25 ± 0.02

Los valores representan el promedio ± el error estándar,  $n = 6$ .

### **Biomasa seca al final del período de sequía**

Después del período de sequía, el día 26, la biomasa de la raíz estuvo influenciada por la interacción de los niveles de humedad con las familias (Cuadro 6.2.1). Las familias SR y TL fueron las únicas que no presentaron diferencias con respecto al testigo (Cuadro 6.2.3). La raíz de las plántulas de la familia JT que sufrieron estrés hídrico presentó una reducción de 23% con respecto al tratamiento testigo. En contraste, la raíz de las plántulas de la familia SM sometidas a sequía tuvo un incremento de 36%.

Entre las plántulas del tratamiento de sequía se observaron diferencias en la raíz sólo de la familia JT que presentó menor biomasa que la familia SM. En el tratamiento testigo las plántulas de la familia SM tuvieron la menor biomasa de raíz de todas las familias (Cuadro 6.2.3).

Al mismo tiempo, las plántulas entre familias presentaron una biomasa de la parte aérea estadísticamente similar. Entre niveles de humedad únicamente la familia TL tuvo diferencias de biomasa, las plántulas que estuvieron en condiciones de sequía tuvieron una biomasa 27% menor que las plántulas testigo mantenidas en condiciones óptimas de humedad.

De modo que el período de 26 días de sequía progresiva no ocasionó diferencias significativas en la asignación de la biomasa de las plantas entre los dos niveles de humedad, aun cuando en la familia SM se observó un aumento del 38%.

Cuadro 6.2.3. Comparación de medias de la biomasa seca de plántulas de cuatro familias de *P. leiophylla*, bajo dos condiciones de humedad en el sustrato: sequía (S) y testigo (T). Al final del período de sequía.

Familia	Nivel de humedad	Biomasa (g) final del período de sequía (día 26)		
		Raíz	parte aérea	r / pa
JT	T	1.60 ± 0.11 a	4.74 ± 0.32 a	0.34 ± 0.03
JT	S	1.23 ± 0.05 bc	4.20 ± 0.38 ab	0.30 ± 0.03
SM	T	1.14 ± 0.10 c	4.56 ± 0.32 ab	0.25 ± 0.02
SM	S	1.54 ± 0.11 a	4.47 ± 0.28 ab	0.35 ± 0.03
SR	T	1.51 ± 0.11 ab	4.81 ± 0.34 a	0.32 ± 0.03
SR	S	1.43 ± 0.10 abc	4.43 ± 0.21 ab	0.32 ± 0.01
TL	T	1.52 ± 0.14 ab	5.07 ± 0.33 a	0.30 ± 0.02
TL	S	1.35 ± 0.11 abc	3.70 ± 0.22 b	0.37 ± 0.04

Los valores representan el promedio ± error estándar,  $n = 6$ . Distinta letra en la misma columna indica diferencia mínima significativa entre las medias ( $\alpha = 0.05$ ).

### Biomasa seca después del período de riegos de recuperación

Al final del período de recuperación, según los resultados del análisis de las varianzas, la biomasa y la asignación de la misma en las plántulas fueron estadísticamente distintas entre los niveles de humedad pero no entre las familias (Cuadro 6.2.1).

Cuadro 6.2.4. Comparación de medias de la biomasa seca de plántulas de cuatro familias de *P. leiophylla*, bajo dos condiciones de humedad: sequía (S) y testigo (T). Después del período de 17 días de riegos de recuperación, el día 44 del experimento.

Familia	Nivel de humedad	Biomasa (g) final del período de recuperación (día 44)		
		raíz	parte aérea	r / pa
JT	T	2.19 ± 0.19 a	5.36 ± 0.33 a	0.41 ± 0.04 a
JT	S	1.14 ± 0.06 c	4.09 ± 0.27 c	0.28 ± 0.02 c
SM	T	1.80 ± 0.11 b	4.55 ± 0.23 bc	0.40 ± 0.03 a
SM	S	1.15 ± 0.05 c	3.98 ± 0.29 c	0.30 ± 0.02 bc
SR	T	1.92 ± 0.07 ab	4.99 ± 0.24 ab	0.39 ± 0.03 a
SR	S	1.14 ± 0.10 c	4.05 ± 0.15 c	0.28 ± 0.02 c
TL	T	1.76 ± 0.10 b	4.78 ± 0.18 ab	0.37 ± 0.02 ab
TL	S	1.22 ± 0.12 c	4.02 ± 0.20 c	0.31 ± 0.03 bc

Los valores representan el promedio ± error estándar,  $n = 6$ . Distinta letra en la misma columna indica diferencia mínima significativa entre las medias ( $\alpha = 0.05$ ).

Las comparaciones de medias mostraron que las plántulas sometidas a estrés hídrico de las familias JT, SM, SR y TL tuvieron una raíz con 48, 36, 41 y 30% menos biomasa que el testigo. La parte aérea fue estadísticamente distinta para las familias JT, SR y TL, disminuyendo en 24, 19 y 16% por efecto del período de sequía anterior, la disminución del 12% en la familia SM no fue estadísticamente significativa. También se registró una disminución en la asignación de biomasa para casi todas las familias con excepción de TL. La diferencia en la relación r/pa de las familias JT, SM y SR fue de 32, 27 y 28% respectivamente r/pa (Cuadro 6.2.4).

### 6.3. Cinética de la fase OJIP de la fluorescencia de la clorofila *a*

Los valores de la inducción de la fase rápida de fluorescencia de la clorofila *a* (FCa) registrada de los 50  $\mu$ s a 1 s fueron graficados en una escala de tiempo logarítmica para mostrar las curvas del aumento polifásico de la FCa (Figura 6.3.1). Las trazas OJIP fueron doblemente normalizadas entre las dos fases de fluorescencia extremas  $F_0$  y  $F_M$  ( $V_{OP}$ ) para eliminar efectos de la intensidad de fluorescencia y poder compararlas entre tratamientos e identificar los cambios en la cinética de la fluorescencia. Se presenta una gráfica para cada familia de *P. leiophylla* estudiada JT (a), SM (b), SR (c) y TL (d) que incluye las tres mediciones durante el período de sequía, los días 0, 17 y 26, y la medición al día 44 del experimento que corresponde al día 17 posterior a los riegos de recuperación.

El paso O, en el punto inicial  $F_0$ , muestra la señal de fluorescencia a los 50  $\mu$ s, se asume que los aceptores primarios quinona  $Q_A$  están completamente oxidados y todos los centros de reacción están abiertos. El aumento de cada traza indica la acumulación de la forma reducida del aceptor quinona ( $Q_A$ ), e.g. el cierre progresivo de los centros de reacción (RC), que es el resultado de la reducción de  $Q_A$  debido a la actividad del fotosistema II (PSII). Alcanzando el pico del paso P con la mayor intensidad de emisión de FCa en el momento en que todas las moléculas de  $Q_A$  se han reducido (Bussotti et al. 2010).

La sequía severa afectó los procesos fotoquímicos primarios en las acículas de *P. leiophylla*. La variación en la forma de las curvas  $V_{OP}$  en respuesta al estrés hídrico refleja la sensibilidad

de las plantas de cada familia a los cambios de humedad en el sustrato (Figura 6.3.1). El día 17 del período de sequía todas las familias, a excepción de la SM presentaron diferencias con respecto al testigo, que para el día 26 se hizo más notable.  $V_{0P}$  fue alterada visiblemente, la fluorescencia aumentó al inicio de la zona de recambio múltiple (MTP) en la parte del paso J al paso P con respecto al testigo. La familia TL fue la más susceptible al estrés hídrico, presentó la mayor diferencia en emisión de  $FCa$  con respecto al testigo y alcanzó el menor  $\Psi_a$  (-3.65 MPa). A su vez la familia SR mantuvo la menor diferencia de emisión de  $FCa$  con respecto al testigo, a -3.43 MPa de  $\Psi_a$ .

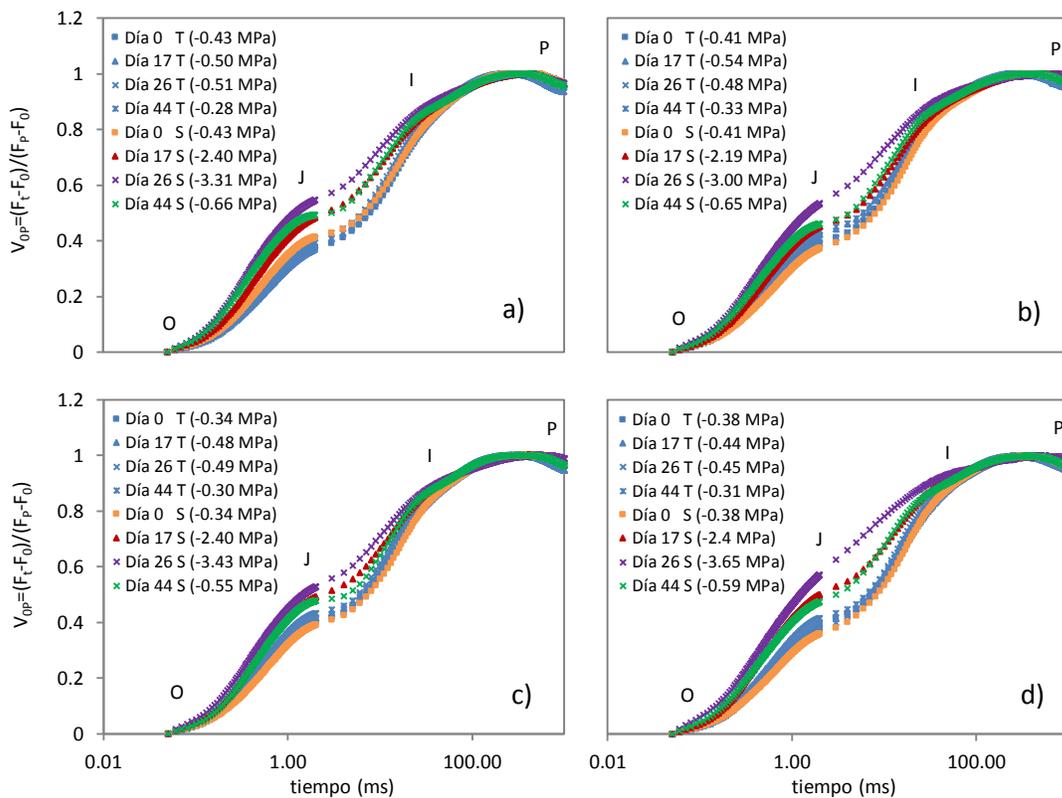


Figura 6.3.1. Trazas de fluorescencia de la clorofila  $a$  doblemente normalizada entre los pasos O ( $F_0$ ) y P ( $F_P$ ):  $V_{0P} = (F_t - F_0) / (F_P - F_0)$ . De la cinética polifásica OJIP de la fase rápida de la  $FCa$ , de acículas presecuenciadas en plántulas de *Pinus leiophylla* de cuatro familias a) JT, b) SM, c) SR y d) TL, en condiciones óptimas de riego (T) y a distintos niveles de estrés hídrico (S), el  $\Psi_a$  está indicado entre paréntesis. Cada curva representa el promedio de nueve trazas independientes ( $n = 9$ ).

Después de 17 días de riegos de recuperación tanto la familia SM, como la familia SR mostraron una recuperación en la traza  $V_{0P}$  que se observó muy cercana a la del testigo; mientras que las familias JT y TL, aunque mostraron una tendencia a la recuperación del fotosistema, mostraron una emisión de fluorescencia muy cercana a la que presentaron el día 17 del período de sequía bajo estrés severo (Figura 6.3.1).

Para visualizar de mejor manera los efectos del estrés hídrico en la cinética OJIP fueron graficadas las curvas de la diferencia en la fluorescencia relativa variable en el tránsito desde la fluorescencia inicial ( $F_0$ ) hasta la fluorescencia máxima alcanzada ( $F_M$ )  $V_{0P}$  del tratamiento de sequía con respecto al testigo ( $\Delta V_{0P} = V_{0P \text{ sequía}} - V_{0P \text{ testigo}}$ ) (Figura 6.3.2).

Las cuatro familias tuvieron un incremento progresivo en  $\Delta V_{0P}$  a medida que fue disminuyendo el  $\Psi_a$ , las curvas presentaron el desarrollo de un pico en la intensidad de la fluorescencia bien definido a 2 ms, llamado pico  $\Delta J$ , que se volvió más pronunciado con el estrés más severo (Figura 6.3.2). El incremento del estrés hídrico aumentó la intensidad de fluorescencia en  $F_0$  pero disminuyó la  $F_M$  con respecto al testigo, de manera que resultó en una disminución tanto en la fluorescencia variable total ( $F_M - F_0$ ) como en la fluorescencia variable al tiempo t ( $F_t - F_0$ ). Esto ocasionó un aumento en el cociente  $V_{0P} = (F_t - F_0) / (F_P - F_0)$  y en la diferencia entre los tratamientos de humedad  $\Delta V_{0P} = V_{0P \text{ sequía}} - V_{0P \text{ testigo}}$ . No obstante la respuesta en la  $\Delta V_{0P}$  fue diferente entre las cuatro familias.

En la Figura 6.3.2 se observa que la familia JT (a) tuvo una respuesta intermedia al estrés hídrico en cuanto a la  $\Delta V_{0P}$  con respecto a las otras familias (b - d). Aunque manifestó una tendencia de recobro después de 17 días de riegos de recuperación, la recuperación fue poca y además exhibió otro pico a 0.3 ms llamado  $\Delta K$ .

Después de 17 días de déficit hídrico la familia SM fue la menos afectada en la  $V_{0P}$ , tuvo la menor  $\Delta V_{0P}$  en esa fecha. Sin embargo para el día 26, a pesar de presentar el menor  $\Psi_a$  de las cuatro familias, sufrió una  $\Delta V_{0P}$  mayor que SR y similar que JT. No obstante presentó una muy buena recuperación después de 17 días de riego. A su vez la familia SR mantuvo la menor  $\Delta V_{0P}$  al día 26, aun cuando presentó uno de los  $\Psi_a$  más bajos (-3.43 MPa). Al día 17 del período de recuperación presentó una de las menores  $\Delta V_{0P}$ , similar a la de la familia SM.

Por el contrario, la familia TL fue la más afectada, claramente manifestó el pico  $\Delta J$  más pronunciado y el menor  $\Psi_a$  de las cuatro familias (-3.65 MPa) el día 26 del período de sequía. Su recuperación después de 17 días de riego fue intermedia.

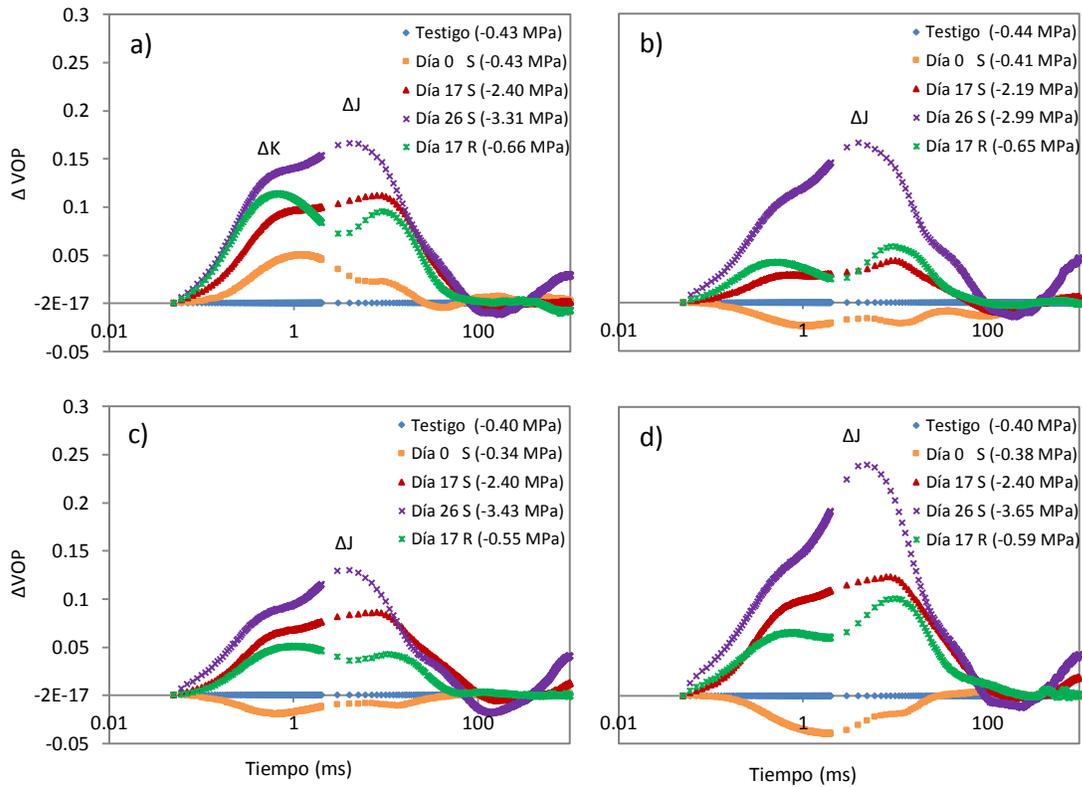


Figura 6.3.2. Curvas de la diferencia en la fluorescencia variable relativa del intervalo O-P ( $\Delta V_{OP} = V_{OP \text{ sequía}} - V_{OP \text{ testigo}}$ ), en la fase rápida OJIP en acículas presecuenciadas de plántulas de *Pinus leiophylla* de cuatro familias a) JT, b) SM, c) SR y d) TL, en condiciones óptimas de riego (testigo) y en distintos niveles de estrés hídrico (S) y al final del período de recuperación (R), el  $\Psi_a$  está indicado entre paréntesis. Cada curva representa el promedio de nueve curvas ( $n = 9$ ).

Para observar los cambios detallados en el intervalo  $F_0$  (0.05 ms) a  $F_K$  (0.3 ms) de la cinética de la FCa provocados por el estrés hídrico, y revelar la banda L cercana a los 0.15 ms, se calculó la diferencia de fluorescencia variable relativa [ $V_{OK} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$ ] del tratamiento sequía menos el tratamiento testigo ( $\Delta V_{OK} = V_{OK \text{ sequía}} - V_{OK \text{ testigo}}$ ). En la Figura 6.3.3 se presentan los valores de  $\Delta V_{OK}$  en el día 0, 17, 26 del período de sequía y el día 17 del período de recuperación, para compararse con respecto al testigo de cada familia a) JT, b) SM, c) SR y d) TL.

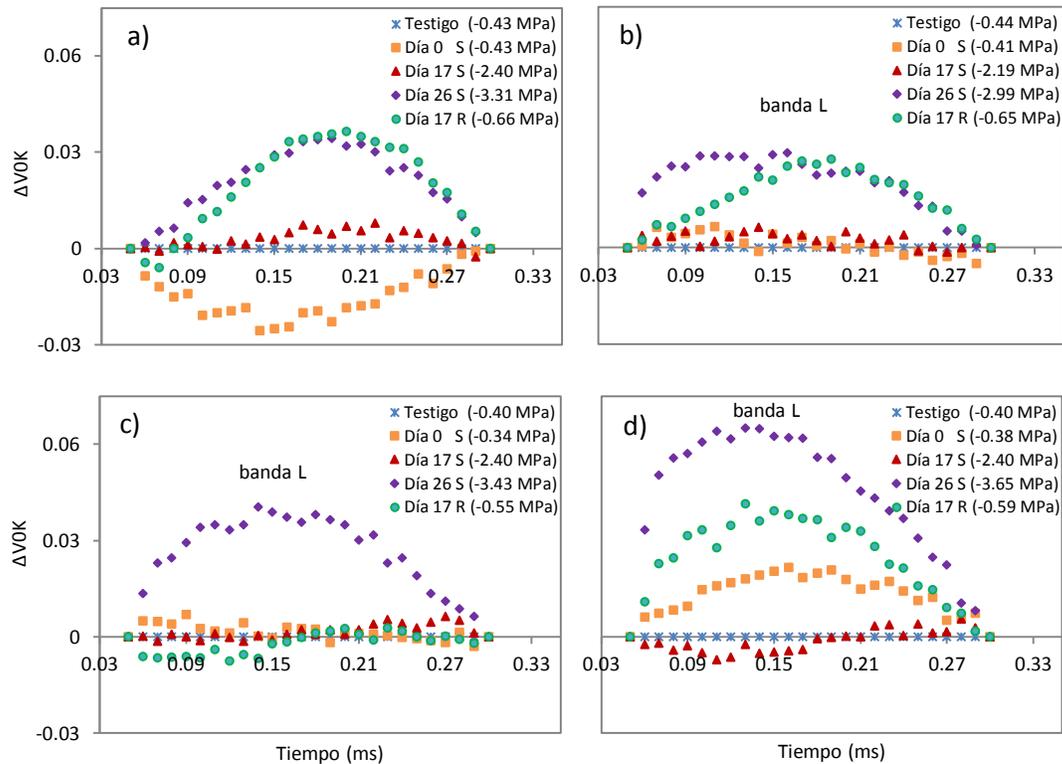


Figura 6.3.3. Curvas de la diferencia en la fluorescencia variable relativa en el intervalo O-K ( $\Delta V_{0K} = V_{0K \text{ sequía}} - V_{0K \text{ testigo}}$ ), banda L a 0.15 ms, de la fase rápida OJIP en acículas preescurecidas de plántulas de *Pinus leiophylla* de cuatro familias a) JT, b) SM, c) SR y d) TL, en condiciones óptimas de riego (testigo), en distintos niveles de estrés hídrico (S) y al final del período de recuperación (R), el  $\Psi_a$  está indicado entre paréntesis. Cada curva representa el promedio de nueve curvas ( $n = 9$ ).

Después del día 17 de estrés hídrico la  $V_{0K}$  de las plántulas permaneció sin ser afectada en ninguna familia aun cuando el  $\Psi_a$  que presentaron en promedio se encontró entre -2.19 y -2.40 MPa representando ya un estrés severo. El día 26 cuando la mitad de las plantas presentaron marchitez permanente del ápice se observó una gran amplitud en la curva de  $\Delta V_{0K}$  en las acículas de todas las familias, aunque en diferente magnitud y forma (Figura 6.3.3). La familia SM presentó la menor amplitud, aun cuando registró una banda L ( $\Delta V_{0K}$  a 0.15 ms) igual a la de la familia JT (0.029). La familia SR desplegó una banda L con una amplitud intermedia, de 0.039; mientras que la familia TL presentó la mayor amplitud con una banda L de 0.062.

Pasados 17 días de riego de recuperación sólo las familias JT y SM no presentaron disminución en las diferencias de  $V_{0K}$  con respecto al testigo. La familia SR presentó una recuperación total y la familia TL sí presentó una disminución en las diferencias del tratamiento en sequía con respecto al testigo pero su  $\Delta V_{0K}$  a 0.15 ms fue de 0.39.

De igual manera, a partir de los datos de la curva OJIP se calculó la diferencia de la fluorescencia variable relativa en el intervalo de  $F_0$  (0.05 ms) a  $F_J$  (2 ms) [ $V_{0J} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$ ] del tratamiento sequía menos el tratamiento testigo ( $\Delta V_{0J} = V_{0J \text{ sequía}} - V_{0J \text{ testigo}}$ ), para hacer visible la banda K con un pico aproximadamente a los 0.3 ms (Figura 6.3.4) (Srivastava et al. 1997).

La emisión de fluorescencia inicial es mayor bajo estrés hídrico y alcanza la máxima fluorescencia en menos tiempo, de manera que la fluorescencia variable es menor. En esta fase la  $\Delta V_{0J}$  entre las plantas testigo y las plantas sometidas a estrés hídrico aumentó también debido a la intensidad del estrés en el período de sequía.

La familia JT fue la más afectada en  $\Delta V_{0J}$  después de 26 días de sequía, exhibió la banda K más amplia e incluso después de 17 días de riego no presentó recuperación sino que incrementó la amplitud de la curva de  $\Delta V_{0J}$ . La familia SM tuvo una respuesta similar en  $\Delta V_{0J}$  que en  $\Delta V_{0P}$  y  $\Delta V_{0K}$ , tuvo el menor efecto en el día 17 de estrés hídrico y una respuesta intermedia al día 26, no presentó ninguna disminución en la amplitud de la banda K al día 17 del período de recuperación. La familia SR respondió de manera similar que la familia SM durante el estrés hídrico, sin embargo sí presentó una disminución en  $\Delta V_{0J}$  después de 17 días de riegos de recuperación. La banda K de la familia TL fue mayor que las de las familias SM y SR pero menor que la de la familia TL al final del estrés hídrico y del período de recuperación.

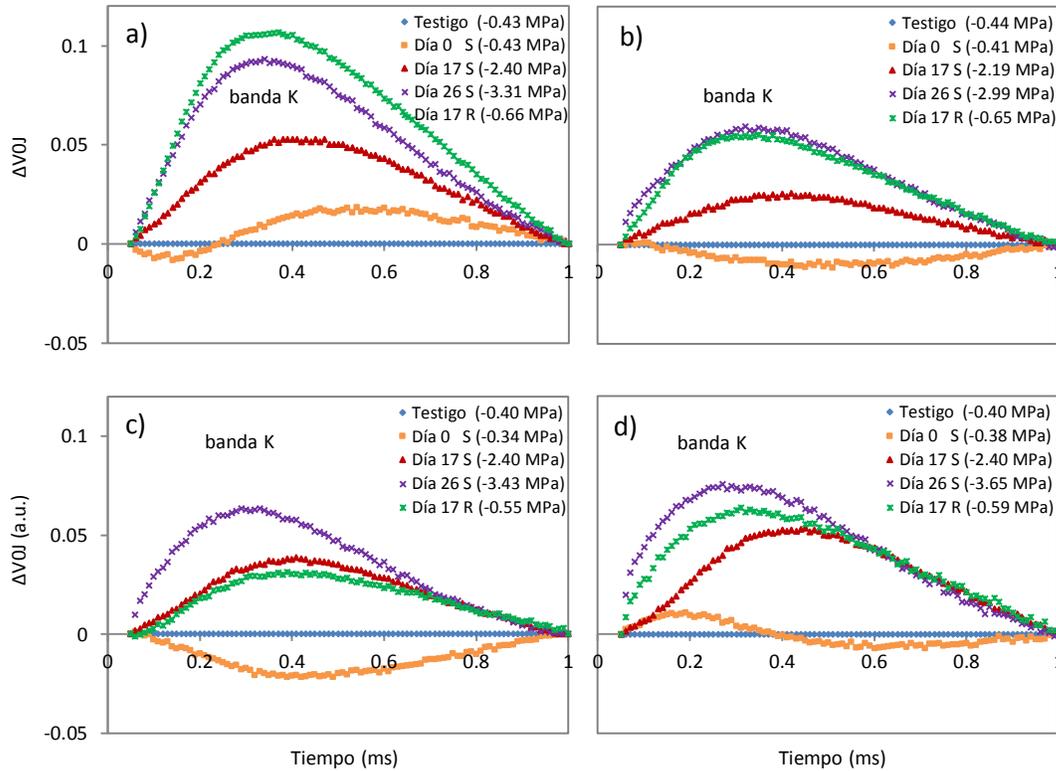


Figura 6.3.4. Curvas de la diferencia en la fluorescencia variable relativa en el intervalo O-J ( $\Delta V_{OJ} = V_{OJ \text{ sequía}} - V_{OJ \text{ testigo}}$ ), banda K a 0.3 ms, de la fase rápida OJIP en acículas preoscuercidas de plántulas de *Pinus leiophylla* de cuatro familias a) JT, b) SM, c) SR y d) TL, en condiciones óptimas de riego (testigo), distintos niveles de estrés hídrico (S) y al final del período de recuperación (R), el  $\Psi_a$  está indicado entre paréntesis. Cada curva representa el promedio de nueve curvas ( $n = 9$ ).

Los datos de la curva de inducción de la fase rápida de la fluorescencia transitoria fueron analizados mediante la prueba OJIP (Strasser et al. 2004, 2010). Los valores netos, inicialmente registrados, se utilizaron para calcular los parámetros compuestos usando las ecuaciones indicadas en el Cuadro 5.2. Posteriormente fueron normalizados con respecto al testigo de cada familia para analizar su valor relativo. Los resultados de la prueba OJIP se presentan en una gráfica radial para cada familia (Figura 6.3.5). De tal forma que el estado de la función y estructura de la maquinaria fotosintética puede ser visualizada con una forma geométrica específica para cada nivel de estrés (Campos et al. 2014a).

Durante el aumento progresivo del estrés hídrico todos los parámetros de fluorescencia analizados fueron afectados, aunque en diferente forma y magnitud con respecto al testigo.

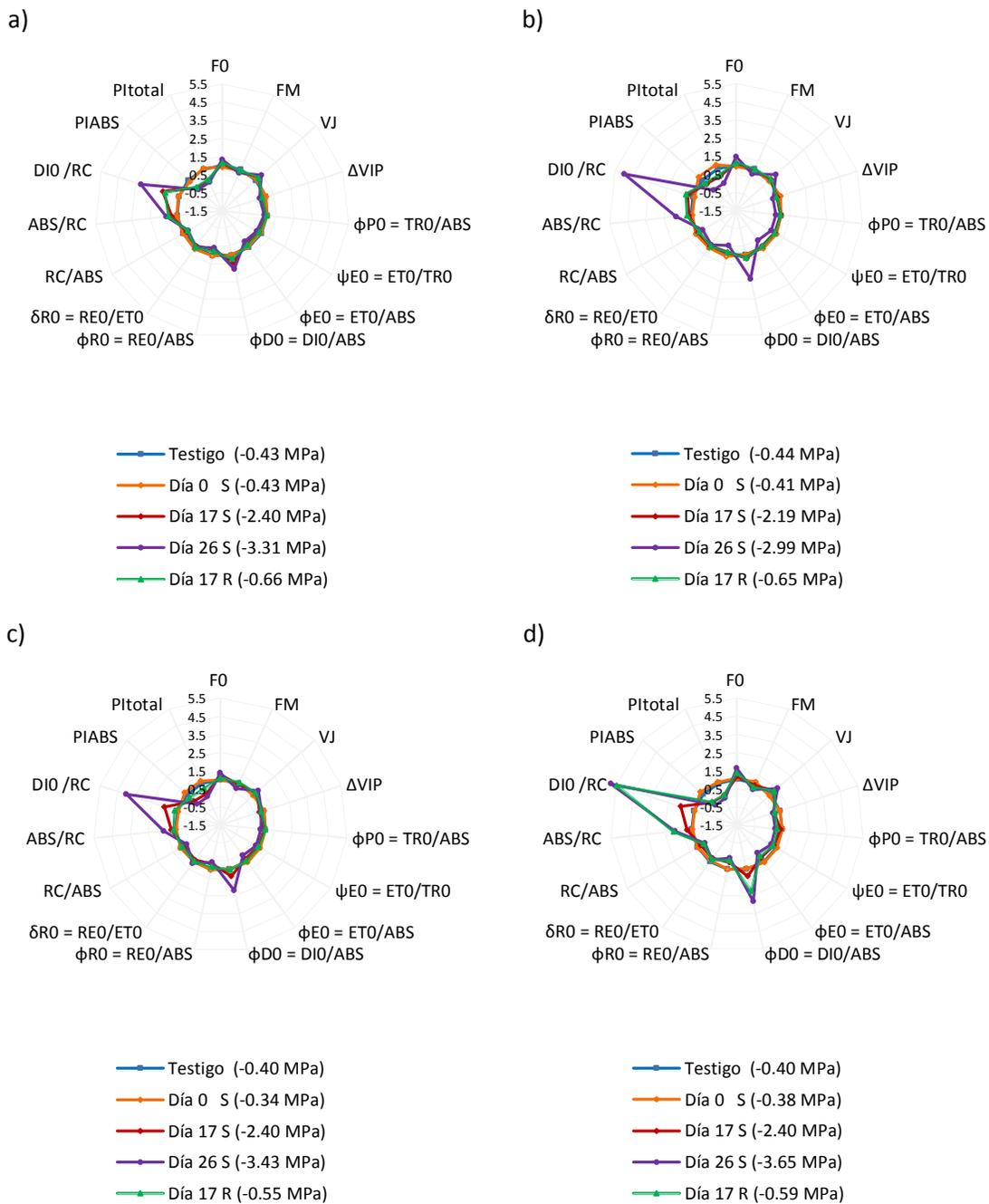


Figura 6.3.5. Cambios en los parámetros de la prueba JIP de la fluorescencia de la clorofila en acículas preoscurecidas de plántulas de *Pinus leiophylla* de la familia JT (a) SM (b) SR (c) y TL (d) del tratamiento de sequía con respecto al testigo, en tres mediciones durante el período de sequía (S) y una medición al final de los riegos de recuperación (R), en paréntesis se indica el  $\Psi_a$ . Ver el significado de las abreviaciones de los parámetros en el Cuadro 5.2. Los valores promedio fueron normalizados con respecto al testigo ( $n = 9$ ).

La fluorescencia mínima ( $F_0$ ), el flujo de energía específica por centro de reacción para la absorción de electrones ABS/RC, la fluorescencia variable relativa a 2 ms ( $V_J$ ), la eficiencia de disipación de energía ( $\phi_{D0} = DI_0/ABS$ ) y la disipación de energía por cada RC activo de PSII ( $DI_0/RC$ ) fueron aumentando con respecto al testigo a medida que el  $\Psi_a$  disminuyó.

Al mismo tiempo se redujo la fluorescencia máxima  $F_M$ , la eficiencia máxima de la reacción fotoquímica primaria ( $\phi_{P0} = TR_0/ABS$ ), la probabilidad de que un excitón atrapado pueda mover un electrón más allá de la  $Q_A^-$  ( $\Psi_{E0} = ET_0/TR_0$ ), la eficiencia cuántica del transporte de electrones ( $\phi_{E0} = ET_0/ABS$ ), la eficiencia cuántica para la reducción de los aceptores finales ( $\phi_{R0} = RE_0/ABS$ ), la probabilidad de que un electrón del intersistema de transporte de electrones de PQ sea transferido para reducir el aceptor de electrones del PSI ( $\delta_{R0} = RE_0/ET_0$ ), la densidad de centros de reacción activos por clorofila antena en PSII ( $RC/ABS$ ), la amplitud relativa de la fase IP ( $\Delta V_{IP}$ ) y los índices de vitalidad o desempeño fotosintético  $PI_{ABS}$  y  $PI_{total}$ .

Los parámetros con un aumento marcado, fueron los parámetros que reflejan la disipación no fotoquímica de energía ( $\phi_{D0} = DI_0/ABS$ ,  $DI_0/RC$ ),  $ABS/RC$ ,  $PI_{ABS}$  y  $PI_{total}$  (Figura 6.3.5).

No se registraron modificaciones con respecto al testigo en el día 17 de sequía, cuando las plántulas de las cuatro familias presentaron  $\Psi_a$  promedio entre -2.19 y -2.4 MPa, en los parámetros de: la fluorescencia inicial ( $F_0$ ), la fluorescencia máxima ( $F_M$ ), la eficiencia máxima de la fotoquímica de PSII ( $\phi_{P0} = TR_0/ABS$ ). Sólo se vieron afectados levemente hasta que el  $\Psi_a$  disminuyó entre -2.99 y -3.65 MPa en la última medición del período de sequía, el día 26.

Los demás parámetros:  $V_J$ ,  $\Psi_{E0} = ET_0/TR_0$ , la eficiencia cuántica del transporte de electrones ( $\phi_{E0} = ET_0/ABS$ ), la eficiencia cuántica para la reducción de los aceptores finales ( $\phi_{R0} = RE_0/ABS$ ), la probabilidad de que un electrón del intersistema de transporte de electrones de PQ sea transferido para reducir el aceptor de electrones del PSI ( $\delta_{R0} = RE_0/ET_0$ ) y la densidad de centros de reacción activos por clorofila antena en PSII ( $RC/ABS$ ) y la amplitud relativa de la fase IP ( $\Delta V_{IP}$ ), fueron medianamente afectados al final de la sequía (Figura 6.3.5):

Las modificaciones en la fotoquímica primaria debido al estrés hídrico se manifestaron en distinta magnitud en las cuatro familias (Figura 6.3.5. a) JT, b) SM, c) SR y d) TL). Las plántulas con estrés hídrico de la familia JT presentaron la menor diferencia con respecto al testigo, el día 26, en los parámetros de la prueba OJIP, aún a pesar de presentar un  $\Psi_a$  de -3.31 MPa. Sin embargo a los 17 días de reanudados los riegos, aunque tendió a la recuperación, no fue la más exitosa.

La familia SM fue la menos afectada por el estrés hídrico el día 17 del período de sequía. El día 26, con -2.99 MPa de  $\Psi_a$  presentó grandes diferencia con respecto al testigo, no obstante al final del período de riego mostró una gran recuperación.

La familia SR tuvo una respuesta muy similar a la de la familia SM, y presentó la mejor recuperación a los 17 días de la reanudación del riego, muy cercana al testigo.

En contraste la familia TL mostró una gran susceptibilidad ante el estrés hídrico, con el menor  $\Psi_a$  (-3.65 MPa) sobre todo al final del período de sequía, presentando las mayores diferencias en todos los parámetros de la prueba OJIP con respecto al testigo. Además de no presentar mínima recuperación del daño en las acículas a los 17 días de la reanudación de los riegos, aun cuando el  $\Psi_a$  del tallo aumentó a -0.59 MP.

#### **6.4. Contenido de peróxido de hidrógeno y actividad de la catalasa**

Al inicio del tratamiento las plántulas de las cuatro familias de *P. leiophylla* presentaron contenidos de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) estadísticamente iguales (Cuadro 6.4), fluctuaron entre 0.69 y 0.84  $\mu M/g$  de tejido fresco de acícula (Figura 6.4 A). Sin embargo, la actividad antioxidante de la enzima catalasa (CAT) varió de manera significativa entre familias. Las familias JT y SR tuvieron la mayor actividad CAT, de  $12 \pm 0.70$  y  $13.5 \pm 0.32$   $\mu M \text{ min}^{-1} g^{-1}$  respectivamente, mientras que las familias SM y TL, de  $9.1 \pm 1.1$  y  $7.6 \pm 0.56$   $\mu M \text{ min}^{-1} g^{-1}$ , respectivamente.

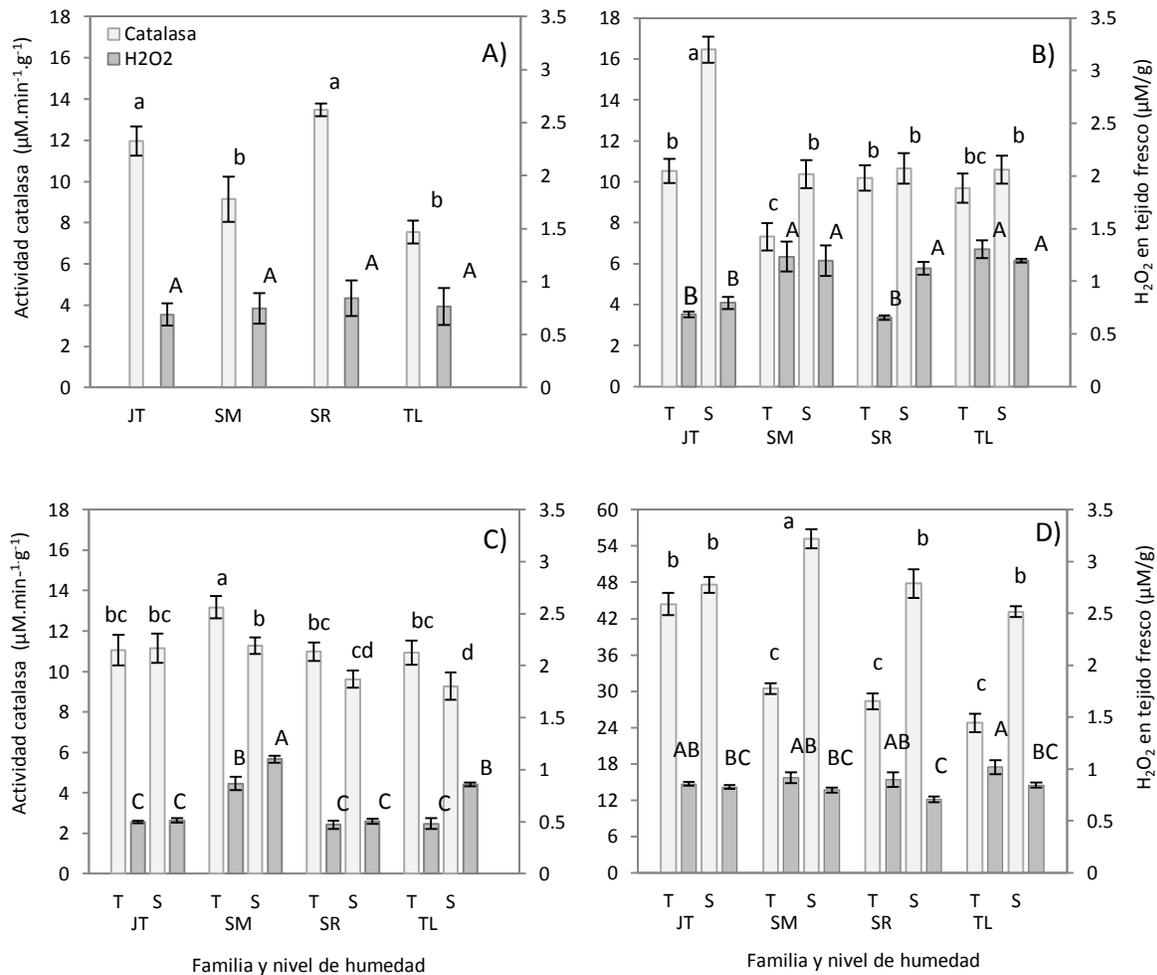


Figura 6.2. Contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (μM/g) y CAT (μM min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>) en acúculas frescas de plántulas de cuatro familias de *P. leiophylla* (JT, SM, SR y TL), tratamientos testigo (T) y sequía (S). En el día 0 (A), 17 (B) y 26 (C) del período de sequía progresiva y después del 17 días con riego de recuperación (D). Los valores representan el promedio ± el error estándar,  $n = 4$ .

El día 17 de sequía, el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la actividad CAT presentaron efectos de la interacción de los dos factores estudiados: nivel de humedad x familia (Cuadro 6.4). Las diferencias entre las familias fueron de la siguiente manera: las plantas del tratamiento testigo de la familia JT y SR tuvieron menor contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que las familias SM y TL, mientras que en condiciones de sequía el de la familia JT fue menor que el del resto (Figura 6.5 B). Al mismo tiempo en el tratamiento testigo las plántulas de la familia SM tuvieron una actividad CAT menor que el observado en las otras familias; y en sequía la familia JT fue

significativamente mayor que todas. Lo anterior resultó en un incremento con relación al testigo del 57 y 42% en la actividad CAT de las acículas de las familias JT y SM, respectivamente; y del 71% en el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la familia SR. Las demás familias no presentaron diferencias en estas dos variables entre los niveles de humedad.

Cuadro 6.2. Valor de P del ANOVA del contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la actividad CAT en acículas de plántulas de cuatro familias de *P. leiophylla* en dos niveles de humedad. En tres fechas de muestreo durante un período de 26 días de sequía progresiva y otra de 17 días con riegos de recuperación.

Fuente de variación	Contenido de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				Actividad de la catalasa			
	Día 0	Día 17	Día 26	Día 17R	Día 0	Día 17	Día 26	Día 17R
Nivel de H		0.120	0.000 *	0.001 *		0.000 *	0.005 *	0.000 *
Familia	0.923	0.000 *	0.000 *	0.055	0.005 *	0.000 *	0.003 *	0.001 *
NH x F		0.046 *	0.000 *	0.321		0.012 *	0.301	0.002 *

\* indica diferencias significativas al 0.05.

A los 26 días de sequía progresiva se siguieron observando interacciones del nivel de humedad x la familia en el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero ya no en la actividad de la catalasa (Cuadro 6.4). Las plántulas de la familia SM tuvieron mayor contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que las demás familias, tanto en el tratamiento testigo como en sequía. Sólo las plántulas de la familia SM y TL tuvieron diferencias entre niveles de humedad en el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con un aumento del 27 y 78% respectivamente debido al estrés hídrico (Figura 6.4. C).

En esa misma fecha, el ANOVA sugirió diferencias de la actividad CAT entre las familias y entre niveles de humedad. Las acículas de las plántulas testigo de la familia SM tuvieron una actividad CAT mayor que las otras familias. Bajo condiciones de estrés hídrico las plántulas de las familias JT y SM presentaron mayor actividad CAT que las de las familias SR y TL. En las comparaciones entre los niveles de humedad, únicamente las plantas de la familia JT no mostraron diferencias debido al estrés hídrico. La actividad de CAT en las acículas de las familias fue 12% en SR, 14 % menor en SM y 15% en TL por efecto del estrés hídrico.

Después de 17 días de riego de recuperación se detectaron diferencias significativas en el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las plántulas sólo entre los niveles de humedad de las familias SR y TL, con una disminución del 21 y 17%, respectivamente, debido a la sequía (Figura 6.4. D).

La actividad CAT fue afectada por la interacción de los niveles de humedad x las familias. En el tratamiento testigo, la familia JT presentó una actividad CAT significativamente mayor que las demás, mientras que en el tratamiento de sequía fue la familia SM la que presentó la mayor actividad CAT. Además se presentaron diferencias de medias entre los niveles de humedad en la actividad CAT de las familias SM, SR y TL, con un aumento del 81, 69 y 74% respectivamente, de las plantas antes sometidas a sequía con relación al testigo.

## VII. DISCUSIÓN

### 7.1. Estado hídrico y osmótico

La respuesta de las plantas ante el estrés hídrico es compleja porque refleja la integración del efecto a todos los niveles de organización (Yordanov et al. 2003). Las estrategias de adaptación y aclimatación son manifestadas mediante una constelación de parámetros fenotípicos, que parten de la expresión genética a través del metabolismo bioquímico y de procesos fisiológicos individuales hasta el nivel del organismo completo.

En este estudio se observó, en las plántulas de *Pinus leiophylla*, que el estrés hídrico progresivo provocó el aumento paulatino en la tensión con la que el agua es retenida en el xilema. Esta tensión resulta de la demanda foliar para remplazar el agua perdida hacia la atmósfera por transpiración durante el día y de la incapacidad de las raíces para absorber suficiente agua del suelo (Waring y Cleary 1967).

Después de 17 días sin riego las plántulas presentaron un estado hídrico que denotó un estrés considerablemente severo (Prieto et al. 2004). Aunque se encontraron diferencias estadísticas entre los niveles de humedad en el  $\Psi_o$ , éste no había disminuido aún tan abruptamente como el  $\Psi_a$ . Eso y el hecho de que el  $\Psi_a$  se encontrara cercano al  $\Psi_o$  es un indicador indirecto de que la disminución del contenido del agua provocó una disminución principalmente en el potencial de turgencia (Steudle 1993). A medida que el contenido hídrico de la planta disminuye, la membrana plasmática se contrae sobre el protoplasma y las paredes celulares pierden presión. La pérdida de turgencia es extremadamente sensible al déficit hídrico y es el primer efecto biofísico significativo del estrés hídrico (Taiz y Zeiger 2006), además de que en las células guarda es uno de los factores que regulan el cierre estomático (Su 2014).

El período de sequía duró 26 días debido a que en esa fecha aproximadamente la mitad de las plántulas en condiciones de estrés hídrico presentaron marchitez permanente del ápice del tallo. El  $\Psi_a$  de las plántulas en sequía (con medidas individuales entre -2.6 y -5 MPa) reflejó un estrés hídrico extremo, considerado así en plantas leñosas a partir de los -2.5 MPa (Landis

1989). No todas las plántulas sufrieron daños estructurales permanentes. Sin embargo, algunas plántulas perdieron la funcionalidad de la parte apical del tallo, aun cuando sus yemas apicales entraron en latencia. Otras plántulas murieron y en algunos casos no fue evidente porque conservaron la rigidez de la zona apical del tallo, no presentaron marchitez. Sólo se pudo comprobar que no estaban vivas cuando al tratar de medirles el  $\Psi_a$  el gas producía un siseo al ser conducido a través del xilema vacío, o después cuando al aplicar los riegos de recuperación no presentaron ningún recobro fisiológico.

El límite de descenso de  $\Psi_a$  que las especies leñosas resisten sin presentar daños físicos irreversibles varía con la especie. Se ha visto decaimiento de la yema apical en individuos de *Abies religiosa* de dos años de edad, entre -1.96 y -2.3 MPa; en plántulas de 5 meses de edad de *Pinus engelmannii*, entre -2.43 y -1.71 MPa, recuperando la turgencia una vez que se regaron en forma abundante, pero presentando disminución en el crecimiento después de varios ciclos de sequía (Castelán 2011, Prieto et al. 2004). Mientras que en variedades de olivo (*Olea europaea*) se han registrado  $\Psi_a$  de -6.5 MPa después de 21 días sin riego, manifestando una disminución en la tasa de fotosíntesis neta y de conductancia estomática, pero con una óptima recuperación de las características fotosintéticas después de 26 días de riegos de recuperación (Sofa 2011).

A partir de trabajos anteriores sobre 37 especies de árboles forestales de Estados Unidos y Canadá en condiciones de sequía, Abrams (1988) estimó que en promedio su potencial osmótico a turgencia cero fue de  $-2.54 \pm 0.06$ . En un trabajo similar al presente, con clones de *Eucalyptus globulus* de 11 meses de edad, se reporta una disminución por efecto del déficit hídrico entre el 43% y el 75% del  $\Psi_o$  registrado entre -1.14 y -1.19 MPa (Shvaleva et al. 2005).

En este estudio el  $\Psi_o$  de las plántulas de *P. leipohylla* en sequía se encontró entre -2.47 y -4.32 MPa y, al igual que el  $\Psi_a$ , también disminuyó significativamente con respecto al testigo (entre 95 y 122%) y a la medición anterior. Esto es reflejo de una mayor concentración de los solutos en las células posiblemente a causa de la reducción en el volumen celular por la pérdida de agua de la presión de turgencia o de un incremento neto de sustancias osmóticamente activas en la célula como iones inorgánicos, ácidos orgánicos, carbohidratos

y aminoácidos que pudieran estar asociadas con funciones protectoras contra la deshidratación de las membranas celulares ((Taiz y Zeiger 2006, Sanders y Arndt 2012). El incremento activo de solutos o ajuste osmótico, es considerado como una estrategia fisiológica exitosa de tolerancia al estrés para evitar la deshidratación, ha sido observado en coníferas como *Pinus pinaster* (Nguyen y Boucher 2003), *P. radiata* (Zou et al. 2000, Yunusa et al. 2005), *P. canariensis* (López et al. 2009).

El  $\Psi_o$  de todas las plántulas disminuyó por efecto del déficit hídrico; sin embargo, al final del período de sequía el descenso del  $\Psi_o$  en las plántulas de JT y SR fue estadísticamente mayor que en las demás familias. Major y Johnson (2001) encontraron diferencias entre familias en el  $\Psi_o$  de árboles de *Picea mariana*, las familias más tolerantes al déficit hídrico con un mayor ajuste osmótico presentaron potenciales osmóticos más bajos  $\Psi_o$ , aun cuando no se encontraron diferencias interfamiliares en el  $\Psi_a$ .

Aunque las plántulas que previamente estuvieron sometidas a estrés hídrico no recuperaron por completo el estado hídrico después de 17 días de riego en relación al testigo, el  $\Psi_a$  aumentó bastante, indicando una enorme tendencia de recuperación. Mientras que el  $\Psi_o$  de las plántulas de las familias JT y TL que previamente fueron sometidas a sequía exhibieron una recuperación total, el de las familias SM y SR no mostraron esa recuperación total aun cuando presentaron igualdades estadísticas entre familias.

El error estándar de las plántulas del tratamiento de sequía se hizo mayor conforme disminuyó la disponibilidad de agua en el sustrato. Lo cual indica, hasta cierto límite, que entre más intensa sea la sequía se expresa una mayor variación fenotípica en la respuesta al estrés entre los individuos de la misma familia (en el  $\Psi_a$  y el  $\Psi_o$ ) y entre familias de *P. leiophylla* (para el caso del  $\Psi_o$ ), como se puede observar en los errores estándar de los promedios en el  $\Psi_a$  y  $\Psi_o$  de *Eucalyptus globulus* (Shvaleva et al. 2005).

## 7.2. Componentes y asignación de biomasa

El déficit hídrico gradual durante 26 días afectó la acumulación de biomasa en tres de las cuatro familias de *P. leiophylla* evaluadas; restringió el crecimiento de la raíz de las plántulas de la familia JT y la parte aérea de las plántulas de la familia TL; y propició el incremento de la biomasa de la raíz con respecto al testigo en las plántulas de la familia SM. En la familia SR no se presentó ninguna afectación en la biomasa. A pesar de eso, en esa fecha, la proporción en la asignación de la biomasa entre la raíz y la parte aérea no se afectó significativamente, aunque las familias SM y TL presentaron una tendencia a aumentar esta relación y la familia JT a disminuirla.

En un estudio similar, con plántulas de cuatro especies de pino sin riego durante 35 días, *P. leiophylla*, *P. montezumae* y *P. patula* no presentaron diferencias en la acumulación de biomasa en la raíz, en el tallo o en la relación r/pa con respecto al testigo mantenido en condiciones óptimas de humedad, únicamente *P.greggii* presentó una menor acumulación en la biomasa del tallo (Vargas y Muñoz 1988). En plántulas de *P. engelmannii* tampoco se observó un cambio significativo en la relación r/pa después de un período similar de sequía (Prieto et al. 2004).

En cambio, Martínez et al. (2002a) reportan un mayor efecto en la acumulación de biomasa en la parte aérea que en la raíz en plántulas de 11 procedencias de *P. leiophylla* expuestas a condiciones de estrés hídrico moderado y severo durante dos meses, teniendo como consecuencia el aumento significativo en la relación r/pa. También en otras especies de plantas leñosas como *Eucalyptus microtheca* (Susiluoto y Berninger 2007), *P. pincheana* (Martíñón et al. 2010), *Abies religiosa* (Castelán 2011), *Quercus brantii* (Zolfaghari et al. 2013) han tenido un aumento en la relación r/pa en favor de su sistema radical por efecto de un estrés hídrico más prolongado, lo que ha sido considerado como un mecanismo de resistencia a la sequía al mantener un equilibrio más favorable entre la capacidad de absorción y uso del agua (Duan et al. 2005).

Los resultados del presente estudio muy probablemente estén influenciados por la época en la que se desarrolló el estudio, pues en invierno la elongación celular de los meristemos

apicales disminuye, para entrar en latencia. Una situación similar, donde el estrés hídrico aplicado en época invernal no tuvo efecto sobre la relación  $r/pa$  en varias especies del género *Pinus* (Cornejo y Emmingham 2003). Otro factor pudiera ser el corto período de evaluación y la intensidad extrema de la sequía. De acuerdo con Xu et al. (2010) cuando las plantas están sujetas a sequía extrema la capacidad de regulación a través del crecimiento asimétrico podría incluso perderse abruptamente, implicando que podría haber un umbral de la humedad del suelo en la respuesta de la asignación de biomasa al estrés hídrico.

Después de 17 días de riegos de recuperación, no se manifestaron diferencias en acumulación de biomasa entre las familias. Sin embargo, en general mostraron una limitación en la acumulación de biomasa de raíz y de la parte aérea como resultado del periodo previo de sequía extrema, posiblemente determinada por una disminución en las tasa de asimilación de  $CO_2$  debido a una conductancia estomática reducida (Ramachandra et al. 2004).

En la familia SM sólo se registró una menor biomasa de raíz, pero acumuló una biomasa de la parte aérea y conservó una relación  $r/pa$  similar al testigo. En las familias JT, SR y TL la acumulación de biomasa fue menor tanto en la raíz como en la parte aérea y también fue menor la relación  $r/pa$  con respecto al testigo. Las diferencias entre niveles de humedad se debió a que en este período las plántulas testigo presentaron relación  $r/pa$  mayor (0.39) que en las mediciones anteriores (inicial 0.27 y final del período de sequía 0.32), ya que las plántulas expuestas a estrés hídrico mantuvieron una  $r/pa$  (0.29) similar a las mediciones anteriores (inicial 0.27 y final 0.34).

### **7.3. Cinética de la fase OJIP de la fluorescencia de la clorofila *a***

Los cambios en la  $FCa$  reflejan la interacción de las plantas con su medio y su capacidad de respuesta a los factores ambientales (Ceacero et al. 2012). Los cambios en las tasas de fotosíntesis tendrán un reflejo sobre la emisión de calor y fluorescencia y lo mismo ocurrirá en sentido contrario por ser procesos competitivos que ocurren simultáneamente (González et al. 2008). Brinda entendimiento sobre la estructura y función del aparato fotosintético, a pesar de que corresponde a una pequeña fracción de energía disipada por éste (Strasser et al.

1995). La FCa es un indicador de las modificaciones en la operación de la eficiencia cuántica del transporte de electrones a través del PSII (Henriques 2009).

Después de 26 días de tratamiento, los procesos de absorción, migración de la energía de excitación en la antena hacia los centros de reacción, la conectividad energética entre las antenas y los centros de reacción, la fotoquímica y el transporte de electrones secundario asociado con las reacciones primarias de la fotosíntesis fueron afectados negativamente en las cuatro familias de *P. leiophylla* (Fig. 6.3.5).

A los 17 días del período de sequía, cuando las plántulas presentaron promedios de  $\Psi_a$  entre -2.19 y -2.40 MPa, se registraron aumentos en la intensidad de  $F_0$  de 14, 10, 26 y 18% para las familias JT, SM, SR y TL, respectivamente; y disminuciones de 17, 5, 6.6 y 13% en la  $F_M$  con respecto al testigo. Lo anterior se vio acentuado el día 26 con un aumento del 31, 47, 36 y 62% respecto al testigo en  $F_0$  y una disminución de 22, 30, 30 y 38% en la  $F_M$ . La fluorescencia máxima  $F_M$  fue alcanzada en menor tiempo. Los fenómenos de foto-inhibición a menudo van acompañados de un incremento de  $F_0$  y un menor valor de fluorescencia máxima, en la que se desarrolló el estudio, pues en invierno la elongación celular de los esto se ha vinculado con una interrupción del transporte de electrones en los centros de reacción, que podría indicar un daño en el aparato fotosintético (Baquedano y Castillo 2006).

Consecuentemente tanto la fluorescencia variable ( $F_M - F_0$ ) como la fluorescencia variable al tiempo  $t$  ( $F_t - F_0$ ) disminuyeron, ocasionando un aumento en la diferencia entre los tratamientos de humedad  $\Delta V = V_{\text{sequía}} - V_{\text{testigo}}$  de los cocientes analizados  $V_{0P} = (F_t - F_0) / (F_M - F_0)$ ,  $V_{0K} = (F_t - F_0) / (F_K - F_0)$ ,  $V_{0J} = (F_t - F_0) / (F_J - F_0)$ . Sin embargo, se observó que  $\Delta V_{0K}$  resiste un estrés hídrico más severo que  $V_{0J}$ , puesto que permaneció sin ser afectado a  $\Psi_a$  cercanos a -2.40 MP el día 17.

El aumento observado en las acúlas de las cuatro familias de *P. leiophylla* en la curva  $V_{0P}$  podría interpretarse como la reducción de una proporción de centros de reacción que conlleva a la disminución en la eficiencia fotoquímica, y provoca el aumento de la disipación de energía por fluorescencia en cualquier punto en el tiempo durante la fase OJIP (González et al. 2008).

Las emisiones de FCa de la fase OJ han sido atribuidas al cierre o reducción parcial de la  $Q_A$  de los RC, la fase JI al cierre de los centros restantes y la fase IP a la remoción de la extinción de la plastoquinona (Strasser et al. 1995). En este estudio el estrés hídrico tuvo mayores efectos sobre la fase JI de  $V_{OP}$  en las acículas de las plántulas de *P. leiophylla*. Confirmándose también en la curva de  $\Delta V_{OP}$  como un incremento en la amplitud en la  $\Delta J$  de todas las familias, que indica la relación  $Q_A^-/Q_A$ . Lo anterior evidencia la disminución en el transporte de electrones hacia la  $Q_A^-$  por una sobre reducción del PSII del lado aceptor (Strauss et al. 2008). Esto también ha sido observado, entre otros estudios, en condiciones de alta irradianza (Li et al. 2009) y recientemente en un estudio donde Zhang et al. (2012) inhibieron la vía respiratoria mitocondrial oxidasa alternativa (AOX) en la maquinaria fotosintética mediante ácido salicilhidroxámico para demostrar el posible rol de esta vía contra la fotoinhibición por la alta irradianza. Mientras que la aparición franca del pico  $\Delta K$  exclusivamente en la curva  $\Delta V_{OP}$  de la familia JT, después de 17 días de riegos de recuperación, podría señalar un desacoplamiento del complejo que disocia el agua, conocido como complejo de evolución de oxígeno (OEC) (Srivastava et al. 1995, Strauss et al. 2008).

También el aumento de la banda K y la caída siguiente en la curva  $\Delta V_{OJ}$ , así como la disminución de la fluorescencia máxima  $F_M$ , son un indicador del desbalance de la distribución de energía, cuando la transferencia de electrones de OEC hacia el donador secundario tirosina Z (Yz) es más baja que la transferencia del PSII a  $Q_A$  y más allá (González et al. 2008). Por otro lado, Diener y Babcock (1996) atribuyeron la aparición de K a la primera reducción de la  $Q_A$  que ocurre después de la carga de separación entre el PSII y la feofitina durante la inducción por luz. La primera reducción de la  $Q_A$  y la reducción siguiente del PSII requiere de un electrón que generalmente está presente en (Yz) y no necesariamente está implicado del OEC (González et al. 2008).

En  $\Delta V_{OK}$  el aumento en la banda L que expresa la inestabilidad del sistema tripartita centro de reacción - complejo cosechador de luz - antena debido a la pérdida de conectividad y de intercambio de energía entre las unidades independientes del PSII. Resultando en una mala utilización de la energía de excitación y una menor estabilidad del sistema (Guha et al. 2013).

Éste aumento en la amplitud de las bandas K y L además de haber sido reportada como efecto del estrés hídrico en plantas (Guissé et al. 1995) también ha sido observado como resultado de otros factores de estrés abiótico como, el ozono (Desotgiu et al. 2012) altas temperaturas (Srivastava et al.1997) y alta irradianza (Zhang et al. 2012).

La prueba JIP destaca el efecto de la sequía en las cuatro familias de *P. leiophylla* en la disipación no fotoquímica de energía. La disipación de energía por RC activo del PSII ( $DI_0/RC$ ) aumentó con respecto al testigo en 93, 30, 73 y 76% el día 17; y 2.20, 3.98, 2.95 y 4.79 veces el día 26 del período de sequía, en las familias JT, SM, SR y TL respectivamente. La eficiencia cuántica de disipación de energía ( $\phi_{D0} = DI_0/ABS$ ) aumentó en 43, 17, 38, y 39% en el día 17; y 81, 136, 119 y 181% en el día 26. Una consecuencia de la sequía sobre la fotosíntesis es la exposición a un exceso de energía, la cual si no es disipada, puede ser perjudicial para el PSII, debido a la sobre reducción de los centros de reacción (Demmig y Adams 1992). Resultados similares fueron obtenidos por Guha et al. (2013), al someter plántulas de *Morus indica* de cinco meses de edad a condiciones de estrés hídrico durante 10 días.

Al mismo tiempo, al día 26 del período de sequía, las cuatro familias de *P. leiophylla* manifestaron relativamente poca disminución en la eficiencia máxima de la fotoquímica de PSII ( $\phi_{P0} = TR_0/ABS$ ): 16, 29, 25 y 38% en JT, SM, SR y TL con respecto al testigo.  $\phi_{P0}$  es la contra parte de  $\phi_{D0}$ , por ser la medida de la fracción de fotones absorbidos que siguen por la vía fotoquímica (Baker y Rosenqvist 2004). Existen evidencias de la relativa insensibilidad al cambio que presenta este parámetro cuando se utiliza para evaluar estrés en plantas (Strasser et al. 2000, Force et al. 2003) y particularmente en estrés hídrico en árboles (Bussotti et al. 2008, Ditmarová et al. 2009), pero aun así denota una fotoinhibición causada por el estrés hídrico en las cuatro familias.

Los parámetros que reflejan la probabilidad de que un excitón capturado mueva un electrón hacia la cadena de transporte de electrones más allá de la  $Q_A$  en el PSII ( $\Psi_{E0} = ET_0/TR_0$ ), la probabilidad de que un electrón del intersistema de transporte de electrones de PQ sea transferido para reducir el aceptor de electrones del PSI ( $\delta_{R0} = RE_0/ET_0$ ), la eficiencia cuántica del transporte de electrones ( $\phi_{E0} = ET_0/ABS$ ) y la eficiencia cuántica para la

reducción de los aceptores finales ( $\phi_{R0} = RE_0/ABS$ ) se observaron relativamente poco afectadas al día 17 de sequía en comparación con  $\phi_{D0}$ . Las diferencias de las plántulas del tratamiento de sequía respecto al testigo se acrecentaron hacia el día 26, al final del experimento y en el momento de mayor estrés.

Los valores elevados en el transporte de electrones y en la eficiencia y función fotosintética general detectados con fluorescencia en las plantas en buenas condiciones de humedad tienen que ver con la fotosíntesis neta y el crecimiento. A pesar de la poca disminución en la eficiencia del flujo de electrones éstos no necesariamente son conducidos hacia la reducción de carbono, sino hacia otras rutas metabólicas como por ejemplo las de defensa (Bussotti et al. 2008). Confiriéndole una alta resistencia al PSII frente al estrés hídrico en plantas superiores (Bukhov y Carpentier 2004).

La probabilidad de que un electrón de los acarreadores intermedios pueda moverse al aceptor final de PSI ( $\delta_{R0} = RE_0/ET_0$ ) manifestó muy poca reducción aún después de 26 días de sequía: 2, 16, 13% en las familias JT, SM y TL. Sin embargo particularmente la familia SR mostró un aumento de 12%, que quizás podría indicar una leve pero mayor eficiencia de transferencia de electrones hacia el PSI bajo condiciones de sequía (Campos et al. 2014a).

La disminución en la  $\Delta V_{IP}$  indicó una disminución en la eficiencia del transporte de electrones alrededor del PSI para reducir los aceptores finales de la cadena transportadora de electrones, como la ferredoxina y NADP debido al estrés hídrico en las cuatro familias.

El índice de desempeño ( $PI_{ABS}$ ) más la probabilidad de que un electrón pueda moverse de los aceptores de electrones inter-fotosistemas reducidos hacia los aceptores finales de electrones del FSI ( $PI_{total}$ ) son una expresión de la vitalidad de la planta que combinan criterios estructurales y funcionales al integrar la densidad de los RC, la eficiencia cuántica de la fotoquímica primaria, la habilidad de proveer electrones a la cadena de electrones entre PSI y PSII (Strasser *et al.* 2000). Ambos parámetros se vieron disminuidos en gran medida en las plántulas bajo condiciones de estrés hídrico debido principalmente a la suma de las disminuciones individuales de los parámetros que los componen como  $(RC/ABS)$ ,  $\phi_{P0}$ ,  $\psi_{E0}$  y  $\delta_{R0}$ .

Bussotti et al. (2010) encontraron que dos de las seis procedencias italianas de *Quercus petraea* sometidas a condiciones de estrés hídrico presentaron la mejor eficiencia fotosintética expresada en el índice de desempeño  $PI_{ABS}$  además de tener hojas más pequeñas y más biomasa foliar por área, características reconocidas como mecanismos de resistencia a la sequía. También se ha visto que el  $PI_{total}$  es afectado por el ozono en plántulas de *Populus* sp. (Desotgiu et al. 2012). Además, en un trabajo realizado para dar seguimiento al establecimiento de brinzales de *Quercus ilex* sub. *ballota* en campo, Ceacero et al. (2012) observaron un descenso en el  $PI_{ABS}$  vinculado a los períodos estivales e invernales.

En el presente estudio, a los 17 días de volver a aplicar riego ninguna de las familias recobró por completo las señales de fluorescencia, los parámetros de la prueba OJIP ni la amplitud y forma de la curva OJIP. Los 17 días del período con riegos de recuperación no fueron suficientes para que las plantas recuperaran totalmente la función de la fotoquímica primaria. Presentaron valores similares a los registrados a los 17 días de sequía aun cuando sus  $\Psi_a$  estuvieron muy cercanos al testigo. En plantas superiores después de un estrés hídrico significativo, la restauración de la actividad de PSII requiere de muchos días bajo condiciones de óptima hidratación. Sin embargo la restauración de la actividad de PSII precede mucho más rápido que el total de la capacidad fotosintética (Bukhov y Carpentier 2004).

Las cuatro familias manifestaron respuesta similares en las curvas  $\Delta V$  de las fases OJ, OK y OP y en la prueba JIP pero en diferente magnitud. Eso evidencia la variación en la susceptibilidad de los genotipos de estas cuatro familias de *P. leiphylla* a nivel de la fotoquímica primaria.

Al final del período de sequía, la familia JT presentó la menor afectación en la mayoría de los parámetros de la prueba JIP en comparación con las demás familias, demostrando la mejor eficiencia fotoquímica primaria, en el transporte de electrones entre densidad de centros de reacción funcionales en la clorofila y una menor necesidad de disipación de energía. También presentó la menor amplitud de la banda L (a 0.15 ms) en la curva  $\Delta V_{OK}$  aun cuando su  $\Psi_a$  había disminuido hasta  $\Psi_a$  de -3.31 MP, indicando una mayor estabilidad en el sistema tripartita centro de reacción - complejo cosechador de luz - antena bajo condiciones de extrema sequía (Guha et al. 2013). Después de 17 días de riego tuvo un recobro intermedio

de los parámetros de la prueba JIP. El mayor efecto del estrés hídrico sobre la fase rápida de la FCa en las plántulas de la familia JT fue observada en  $\Delta V_{OJ}$  por presentar la banda K más pronunciada al final de la sequía, que además se incrementó aún durante la etapa de recuperación. Eso, se manifestó también en la curva  $\Delta V_{OP}$  como un pico  $\Delta K$ , posiblemente a causa de la inhibición de la donación de electrones por un daño en el complejo desarrollador de oxígeno (OEC) resultando en la oxidación estable de Yz (Vredenberg 2008).

La familia SM manifestó estabilidad de los procesos de la fotoquímica a los 17 días del período de sequía donde alcanzó un  $\Psi_a$  de -2.99 MPa, tanto en los parámetros de la prueba JIP como en las fases OJIP. Al día 26 presentó una afectación intermedia con relación a las demás familias en la prueba JIP, pero mantuvo una de las menores diferencias con respecto al testigo en las curvas  $\Delta V_{OK}$  y  $\Delta V_{OJ}$  por una posible estabilidad del sistema tripartita centro de reacción - complejo cosechador de luz - antena y eficiencia del complejo desarrollador de oxígeno (Vredenberg 2008). Después de 17 días de riego, manifestó la segunda mejor capacidad de recuperación en la mayoría de los parámetros de la prueba JIP y en las fases de fluorescencia OP, OJ, muy cercanas al testigo pero, al igual que JT no presentó disminución de  $\Delta V_{OK}$ .

La familia SR tuvo una respuesta intermedia ante el estrés en la primera medición, no obstante, al final del período de sequía, el día 26 fue la segunda menos afectada, exhibió una diferencia con respecto al testigo menor que todas las familias en los parámetros ( $RC/ABS$ ,  $\psi_{E0}$ ,  $\phi_{R0}$ ), la proporción de  $Q_A$  reducida por pigmentos antena del PSII, la eficiencia de transferencia de electrones más allá de la  $Q_A$  de PSII y la reducción de los aceptores finales del PSI, y del  $\Delta V_{OP}$  que indica una menor flujo de energía absorbida en los centros de reacción y de la eficiencia fotoquímica. Al final del período de riegos de recuperación presentó las menores diferencias con respecto al testigo tanto en los parámetros de la prueba JIP como en las fases OJIP e incluso no presentó la banda L en  $\Delta V_{OK}$  demostrando un recuperación más rápida de la conectividad y de intercambio de energía entre las unidades independientes del PSII (Guha et al. 2013).

Por el contrario las acículas de la familia TL fueron las más afectadas de las cuatro familias. Presentó las mayores diferencias con respecto al testigo en todos los parámetros de la prueba

OJIP en los dos muestreos del período de sequía, donde al final alcanzó el menor  $\Psi_a$  (-3.65 MPa). Disminuyó su capacidad de absorción y transporte de electrones desde el PSII hasta el PSI, con una alta disipación no fotoquímica de la energía absorbida. Con un aumento en la  $\Delta V$  de las curvas de las fases OJIP evaluadas, sobre todo  $\Delta V_{0K}$ , donde mostró la mayor amplitud de la banda L que sugiere también una pérdida de conectividad y de intercambio de energía entre las unidades independientes del PSII. Al día 17 de riegos, no presentó recuperación en los parámetros de la prueba JIP aun cuando el  $\Psi_a$  del tallo fue de -0.59 MP. Demostró una baja regulación de la fotoquímica primaria y una alta necesidad de disipación para evitar el daño por exceso de energía.

#### **7.4. Contenido de peróxido de hidrógeno y actividad de la catalasa**

La activación y modulación de los mecanismos antioxidantes juega un rol clave en la resistencia de las plantas ante el estrés hídrico (Smirnoff 1993). El incremento observado en el contenido de  $H_2O_2$  foliar después de 17 días de sequía en la familia SR de *P. leiophylla* no se presentó en las otras familias estudiadas, por lo que consideramos que podría ser parte de la señalización que induce la expresión de numerosos genes de defensa en respuesta al estrés hídrico (Noctor et al. 2014), ya que las plantas de la familia SR tuvieron una mayor tolerancia al estrés, en contraste con las otras familias, hacia el final del período de sequía; además, las plantas de la SR también presentaron los mejores parámetros de  $FCa$  evaluados.

El  $H_2O_2$  está involucrado en el proceso de cierre estomático incrementando los niveles de  $Ca^{2+}$  en el citosol o inducido por el ácido abscísico (ABA). Además, el ABA puede inducir la producción de  $H_2O_2$  de las células guarda, de tal forma que las plantas pueden asegurar que los estomas están cerrados durante condiciones de estrés hídrico y evitar la pérdida de agua por transpiración (Wu et al. 2006). Sin embargo, la acumulación celular del  $H_2O_2$  en altas concentraciones es tóxica y lleva a la muerte celular. Por lo que la actividad CAT es de suma importancia para evitar la acumulación del  $H_2O_2$ . En nuestro estudio, el incremento en la actividad CAT de las familias JT y SM puede ser un indicador de una respuesta antioxidante, puesto que CAT es una de las principales enzimas que remueven el  $H_2O_2$  inducido en la

oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas foliares, y durante la fotorespiración (de Carvalho 2013).

Al final del período de sequía, al día 26, se registró el aumento en el contenido de  $H_2O_2$  y una disminución en la actividad CAT en las familias SM y TL comprometiendo la resistencia a la sequía de las plantas debido al daño oxidativo mayor y al mecanismo menos eficiente de remoción de  $H_2O_2$  como se ha señalado en otros estudios (Ditmarová et al. 2009); el incremento de  $H_2O_2$  lleva a la peroxidación lipídica de las membranas celulares y daño en ácidos nucleicos y proteínas (Smirnoff 1998, Rachmilenvitch et al. 2006). Munné et al. (2001), reportaron la acumulación de  $H_2O_2$  en hojas senescentes de plantas susceptibles expuestas a sequía. Lei et al. (2006 y 2007) observaron un incremento del contenido de  $H_2O_2$  en *Populus przewalskii* que causó un estrés oxidativo y reducción en el crecimiento.

La reducción en la abundancia de la RuBisCO a causa de la disminución de la tasa de fotorespiración por la fijación de  $O_2$  pudiera explicar la disminución de CAT. No obstante CAT no es la única molécula que desintoxica las células de  $H_2O_2$ , la ascorbato peroxidasa remueve el  $H_2O_2$  producido durante la reacción de Mehler y otros procesos cloroplásticos (Asada 1999), además también interactúan otros antioxidantes no enzimáticos (Foyer et al. 1997, Kar 2011). Por lo que no sólo la actividad CAT fue inhibida sino también el resto del sistema antioxidante, probablemente el estrés hídrico severo afectó negativamente varios procesos que indirectamente están involucrados en el sistema antioxidativo y que se reflejan rápidamente en genotipos más sensibles a tal estrés.

Al final del período de recuperación se observó una disminución en el contenido de  $H_2O_2$  en las plántulas de las familias SR y TL que estuvieron en sequía, además de un aumento significativo en la actividad CAT de las familias SM, SR y TL, lo que implica que su metabolismo se encontraba con una mayor actividad antioxidante. La capacidad de evitar o reparar el daño oxidativo mediante estrategias de generación de enzimas antioxidantes como CAT puede ser un importante complemento para entender el funcionamiento de la tolerancia a la sequía de árboles en condiciones de déficit hídrico (Guha et al. 2013).

Las familias de *P. leiophylla* estudiadas presentan diferentes respuestas tanto de estrés oxidativo como de actividad antioxidante. Aun cuando las plántulas estuvieron bajo las mismas condiciones antes del experimento, desde la primera medición, en el día 0 se observó variación en la actividad CAT. Así mismo durante el período de 26 días de estrés hídrico progresivo el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en la actividad CAT por respuesta a la sequía fueron diferentes en las cuatro familias, implicando variación en sensibilidad al estrés hídrico.

La familia JT fue la única que mantuvo los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en condiciones de sequía similares a los del testigo, además mostró la mayor actividad CAT y una capacidad de respuesta antioxidante mayor y más rápida que le permitió mantener estable el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En contraste con la familia TL que al día 17 no presentó reacción de CAT y al día 26 mostró una menor actividad CAT, indicando mayor sensibilidad del genotipo donde la fotorespiración o las sustancias antioxidantes son insuficientes para lidiar con el daño oxidativo causado por la sequía (Noctor et al. 2014). Las familias SM y SR mostraron una respuesta intermedia.

En la literatura se reporta una variación entre las plantas en estas respuestas, los genotipos con alta resistencia a la sequía presentan mayor actividad antioxidante que pueden eliminar con mayor efectividad las ERO (Munné et al. 2003, Shavaleva et al. 2006, Zhu et al. 2011). Gao et al (2009) mencionan diferencias entre tres especies de pino en respuesta a una sequía gradual de 28 días. *P. densata* demostró tener una mayor tolerancia que *P. tabuliformis* y *P. yunnanensis* debido a un incremento menor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y una mayor actividad CAT, además de menores daños de la membrana celular, mayor contenido de carotenoides y acumulación de prolina, entre otras moléculas antioxidantes. Así mismo, se ha encontrado variación en las respuestas ante el estrés oxidativo inducidas por la sequía entre especies por ejemplo en *Populus* (Yang et al. 2010) y entre poblaciones de *Populus cathayana* (Xiao et al. 2009).

## VIII. CONCLUSIONES

El 50% de las plántulas de *Pinus leiophylla*, progenie de las cuatro familias probadas resisten un estrés hídrico extremo con un  $\Psi_a$  promedio de hasta -3.35 MPa sin presentar marchitez permanente en temporada invernal.

El estrés hídrico extremo afectó todas las variables evaluadas, provocando un aumento en la concentración de los solutos celulares y la disminución en 1.12 veces del  $\Psi_o$ ; una disminución del 12% en la acumulación de biomasa de la parte aérea, y un efecto variable para cada familia sobre la raíz y la r/pa; un aumento en 29% en el contenido de la especie reactiva de oxígeno ( $H_2O_2$ ), que promueve el daño oxidativo y un decremento del 10% en la actividad antioxidante de la enzima catalasa. Además de afectar los procesos de absorción, migración de la energía de excitación en la antena hacia los centros de reacción, la conectividad energética ente las antenas y los centros de reacción, la fotoquímica y el transporte de electrones asociado con las reacciones primarias de la fotosíntesis. Provocando sobre todo el aumento de la disipación no fotoquímica de energía ( $DI_0/RC$  y  $\phi_{D0}$  en 3.87 y 1.50 veces, respectivamente) y disminuyendo el índice de vitalidad  $PI_{total}$  (85%), aun cuando promovió una disminución relativamente no tan severa (32%) de la eficiencia máxima de la fotoquímica de PSII ( $\phi_{P0}$ ).

La magnitud y velocidad del efecto del estrés hídrico progresivo sobre las plántulas de *P. leiophylla* y las respuestas a éste y a los riegos de recuperación dependió en gran medida de la familia a la que pertenecen.

Las plantas de la familia JT exhibieron la menor afectación ante el estrés hídrico extremo, muy probablemente sean las más capaces de activar las estrategias de adaptación en las peores condiciones de estrés hídrico. Manifestaron una mayor sensibilidad osmótica ante los cambios de humedad ( $\Psi_o$ ), una capacidad de respuesta antioxidante mayor y más rápida en su actividad CAT que le permitió ser la única que mantuvo estables los niveles de  $H_2O_2$ , y una mayor capacidad de mantener la funcionalidad y eficiencia fotoquímica. A pesar de sufrir restricciones en la acumulación de biomasa de la raíz, la proporción en la asignación de la

biomasa entre la raíz y la parte aérea no fue afectada significativamente. Aunque no tuvieron la recuperación más exitosa.

Las plántulas de la familia SM tardaron más días en ser afectadas por la sequía que las demás, manteniendo el mejor estado hídrico y la mayor estabilidad de los procesos fotoquímicos y la mayor actividad CAT a los 17 días sin riego, al final de la sequía fueron las únicas que presentaron un aumento en la relación r/pa. Sin embargo, ante el estrés extremo presentaron una afectación intermedia con relación a las demás familias. También manifestaron la segunda mejor capacidad de recuperación.

Las plántulas de la familia SR fueron las segundas menos afectadas por la sequía extrema. Exhibieron la mejor capacidad de recuperación, disminuyendo el 21% en el contenido de  $H_2O_2$  y una mayor actividad antioxidante con un aumento de 69% en la actividad catalasa. Presentaron una mayor recuperación y mejor conectividad e intercambio de energía entre las unidades independientes del PSII, aun cuando mostraron una limitación en la acumulación de biomasa de raíz y de la parte aérea como resultado del periodo previo de sequía extrema, exhibieron la menor diferencia en la relación r/pa con respecto al testigo.

Las plántulas de la familia TL fueron las más afectadas por el estrés hídrico, alcanzaron el menor  $\Psi_a$  (-3.65 MPa en promedio), fueron afectadas en la acumulación de biomasa en la parte aérea, presentaron la reacción oxidativa más tardía y la actividad antioxidante CAT fue menor incluso que el testigo, también mostraron la menor estabilidad en los procesos de la fotoquímica primaria y una alta necesidad de disipación para evitar el daño de la en la que se desarrolló el estudio, pues en invierno la elongación celular de los fotoinhibición. Así mismo presentaron la menor capacidad de recobro, a pesar de que alcanzaron un  $\Psi_a$  del tallo de -0.59 MP y una recuperación total del  $\Psi_o$ , y disminución oxidativa del  $H_2O_2$  acompañada de un aumento significativo en la actividad antioxidante CAT, exhibieron una disminución en la biomasa de la raíz y la parte aérea y no presentaron recobro en los parámetros fotoquímicos, demostrando haber sufrido un daño sin reparación en los fotosistemas de las acículas.

En conjunto la evaluación del estado hídrico y osmótico, de la concentración de  $H_2O_2$ , la actividad de la catalasa, de la fase rápida de la fluorescencia de la clorofila *a* mediante la prueba JIP y las curvas de las fases OJIP permitió realizar un perfil de la respuesta fisiológica ante el estrés hídrico de las plántulas de las cuatro familias de *P. leiophylla*, útil para identificar las familias que posiblemente sean capaces de lidiar mejor en condiciones de estrés hídrico en campo.

## IX. LITERATURA CITADA

Aebi HE (1984) Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 105:121-126.

Abdel KDZ (2001) Drought and gibberellic acid-dependent oxidative stress: effect on antioxidant defense system in two lettuce cultivars. *Pak. J. Biol. Sci.* 4:1138-1143.

Abrams MD (1988) Sources of variation in osmotic potentials with special reference to North American tree species. *For. Sci.* 34:1030-1046.

Asada, K. 1999. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:601–639.

Atzmon N, Moshe Y, Schiller G (2004) Ecophysiological response to severe drought in *Pinus halepensis* Mill. trees of two provenances. *Plant Ecol.* 171:15-22.

Azofeifa Á. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20:153-175.

Baker NR, Rosenqvist E (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.* 55: 1607-1621.

Baquadano F, Castillo F (2006) Comparative ecophysiological effects of drought on seedlings of the Mediterranean water saver *Pinus halepensis* and water spenders *Quercus coccifera* and *Quercus ilex*. *Trees* 20: 689-700.

Barton AM, Teeri JT (1993). The ecology of elevational positions in plants: drought resistance in five montane pine species in southeastern Arizona. *Am. J. Bot.* 89:15-25.

Boltz BA, Bongarten BC, Teskey RO (1986) Seasonal patterns of net photosynthesis of loblolly pine from diverse origins. *Can. J. For. Res.* 16:1063-1068.

Boyer JS (1995) Measuring the water status of plants and soils. Academic Press. San Diego, CA, EUA.

Bray EA (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* 2:48-54.

Bukhov NG, Carpentier R (2004) Effects of water stress on the photosynthetic efficiency of plants. In: Papageorgiou CG y Govindjee (eds.) Chlorophyll fluorescence: A signature of photosynthesis. *Advances in photosynthesis and respiration Series.* Springer, Dordrecht, pp. 321-362.

Bussotti F, Desotgiu R, Pollastrini M, Cascio C (2010) The JIP test: a tool to screen the capacity of plant adaptation to climate change. *Scand. J. For. Res.* 25:43-50.

Campos H, Trejo C, Peña VCB, García NR, Conde MFV, Cruz OMR (2014a) Photosynthetic acclimation to drought stress in *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck seedlings is largely dependent on thermal dissipation and enhanced electron flux to photosystem I. *Photosyn. Res.* Publicado en línea: 6 May 2014. DOI:10.1007/s11120-014-0008-6

Campos H, Trejo C, Peña VCB, García NR, Conde MFV, Cruz OMR (2014b) Stomatal and non-stomatal limitations of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under water stress and re-watering: Delayed restoration of photosynthesis during recovery. *Environ. Exp. Bot.* 98:56-64

Calamassii R, Della RG, Falusi M, Paoletti E, Strati S (2001) Resistance to water stress in seedlings of eight European provenances of *Pinus haleoensis* Mill. *Ann. For. Sci.* 58: 663-672.

Castelán MN (2011) Respuesta a la sequía de *Abies religiosa* (H.B.K.) Schl. et Cham. en individuos de cinco procedencias. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias UNAM, México DF.

Chuine I, Beaubi EG (2001) Phenology is a major determinant of tree species range. *Ecol. Lett.* 4:500-510.

Ceacero CJ, Díaz HJL, del Campo AD, Navarro CRM (2012) Evaluación temprana de técnicas de restauración forestal mediante fluorescencia de la clorofila y diagnóstico de vitalidad de brinzales de encina (*Quercus ilex* sub. *ballota*). *Bosque* 33:191-202.

Challenger A (1998) Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y futuro. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, DF.

Chaumont F, Tyerman SD (2014) Aquaporins: Highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant physiol.* 164:1600-1618.

Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues ML, Ricardo CPP, Osorio ML, Carvalho I, Faria T, Pinheiro C (2002). How plants cope with water stress in the field. *Photosynthesis and growth.* *Ann. Bot.* 89:907-916.

CONAFOR (2007) SIRE-Paquetes tecnológicos *Pinus leiophylla* Schl. & Cham. Jalisco, México. In: <http://www.cnf.gob.mx:8080/snif/portal/usuarios/fichas-sire> (consultado el 28 octubre 2012).

Cornejo OE, Emmingham W (2003) Effects of water stress on seedling growth, water potential and stomatal conductance of four *Pinus* species. *Crop Res.* 25:159-190.

Cregg BM, Zhang JW (2001) Physiology and morphology of *Pinus* species. *Crop Res.* 25:159-190.

Cuevas RRA, de la Garza LLP, Nepamuceno MF (1992) Estudio comparativo de la tolerancia a la sequía en procedencias de *Pinus greggii* E. In: Memoria de la Reunión Científica Forestal y Agropecuaria. Centro de Investigación de la Región Centro. SARH, INIFAP, Campo Experimental Coyoacán. México, DF, pp:225-236.

Danneberger TK (2000) Effects of humidity on plant growth. In: Wilkinson RE (ed) Plant-environment interactions. Marcel Dekker, Inc. Nueva York.

De Boodt M, Verdonck O, Cappaert I (1974) Method for measuring the water release curve of organic substrates. *Acta Hort* 37 2054-2062.

de Carvalho MHC (2013) Drought stress and reactive oxygen species. Production, scavenging and signalling. *Plant Signal. Behav.* 3:156-165.

Demmig AB, Adams III W (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:599-626.

Diener BA, Babcock GT (1996) Structure, dynamics, and energy conversion efficiency in Photosystem II. In: Ort DR, Yocum F (eds) *Oxygenic Photosynthesis: the Light Reactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp 213-247.

Ditmarová L, Kurjak D, Palmroth S, Kmet J, Střelcová K (2009) Physiological responses of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings to drought stress. *Tree physiol.* 30: 205-213.

Duan B, Yin C, Li C (2005) Responses of conifers to drought stress. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.* 11:115-122.

Dvorak WS, Hodge GR, Kietzka JE (2007) Genetic variation in survival, growth, and stem form of *Pinus leiophylla* in Brazil and South Africa and provenances resistance to pitch canker. *South For.* 67:125-135.

Ern H (1976) Descripción de la vegetación montañosa en los estados mexicanos de Puebla y Tlaxcala. *Willdenowia. Beiheft*, No. 10. Botanischer Garten und Botanisches Museum, Berlin-Dahlem.

Foyer CH, Lopez DH, Dat J, Scott IM (1997) Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant.* 100:241-54.

Gao D, Gao O, Xu HY, Ma F, Zhao CM, Liu JO (2009) Physiological responses to gradual drought stress in the diploid hybrid *Pinus densata* and its two parental species. *Trees* 23:717-728.

Gómez JDM, Ramírez HC, Jasso MJ, López UJ (2010) Variación en características reproductivas y germinación de semillas de *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. *Rev. Fitotec. Mex.* 33:297-304.

Guha A, Sengupta D, Ranachandra RA (2013) Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence kinetics and leaf protein analyses to track dynamics of photosynthetic performance in mulberry during progressive drought. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 119:71-83.

Farjon A, Styles B (1997) *Flora neotropica*, Vol. 75, *Pinus* (Pinaceae). New York Botanical Garden. EUA, Nueva York.

Force L, Critchley C, van Rensen J (2003) New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. *Photosyn. Res.* 78:17-33.

Foyer CH, Noctor G (1999) Leaves in the dark see the light. *Science* 284:599-601.

Foyer CH, Bloom AJ, Queval G, Noctor G (2009) Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 455-484

Furlan A, Llanes, A, Luna V, Castro S (2012) Physiological and biochemical responses to drought stress and subsequent rehydration in the symbiotic association peanut-*Bradyrhizobium* sp. ISRN Agronomy 318083.

González MS, Perales VH, Salcedo AMO (2008) La fluorescencia de la clorofila *a* como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Reb.* 27: 119-129.

Gordon C, Woodin SJ, Alexander IJ, Mullins CE (1999) Effects of increased temperature, drought and nitrogen supply on two upland perennials of contrasting functional type: *Calluna vulgaris* and *Pteridium aquilinum*. *New Phytol.* 142:243-258.

Guissé B, Srivastava A, Strasser RJ (1995) Effect of high temperature and water stress on the polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient of potato leaves. In: Mathis P (ed) *Photosynthesis: From Light to the Biosphere*, Vol IV. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp 913–916.

Henriques FS (2009) Leaf Chlorophyll Fluorescence: Background and Fundamentals for Plant Biologists. *Bot. Rev.* 75:249-270.

Hernández PC (2001) Variación geográfica en la respuesta a la sequía en plántulas de *Pinus greggii* Engelm. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Edo. Méx.

Herrera SJ, López DH, Mora HME (2007) Stress in callus of *hippocratea excels*: catalase activity hydrogen peroxide content and canophyllol accumulation. *Interciencia* 32:253-256.

Hsiao TC (1973) Plant responses to water stress. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24:219-570

Hsiao TC, Acevedo E (1974) Plant responses to water deficits, water-use efficiency and drought resistance. *Agric. Meteorol.* 14: 59-84.

Jaquish BC (2011) Abasto y manejo de semillas a partir de la recolección en rodales naturales, áreas de producción y huertos semilleros. In: Vargas HJJ, Bermejo VB, Leding FT (eds) Manejo de recursos genéticos forestales. CONAFOR, México, pp 79-89.

Jasso MJ, López UJ, Jiménez CM, Jacob CV (1994) Evaluación fenológica vegetativa de *Pinus leiophylla* en un huerto semillero. Memorias I Congreso Mexicano sobre Recursos Forestales, México, pp 97.

Jiménez CM, Zwiazek JJ (2014) Adventitious sprouting of *Pinus leiophylla* in response to salt stress. Ann. For. Sci. Publicado en línea 1 de Mayo 2014. DOI:10.1007/s13595-014-0379-z

Johnsen KH, Major JE (1999) Shoot water relations on mature black spruce families displaying a genotype x environment interaction in growth rate. I. Family and site effects over tree growing seasons. Tree Physiol. 19:367-374.

Johnsen KH, Major JE (2011) Técnicas ecofisiológicas en la evaluación de germoplasma. In: Vargas HJJ, Bermejo VB, Leding FT (eds) Manejo de recursos genéticos forestales. CONAFOR, México, pp139-160.

Kar RK (2011) Plant responses to water stress. Role of reactive oxygen species. Plant Signal. Behav. 6:1741-1745.

Kozlowski TT (1999) Water deficit and plant growth. Vol. 1. Academic Press, Nueva York, EUA.

Kozlowski TT, Pallardy SG (2002) Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. Bot. Rev. 68:270-334.

Kramer JP, Boyer JS (1995) Water relations of plants and soils. Academic Press, San Diego, CA, EUA.

Kumar KR (2011) Plant responses to water stress: Role of reactive oxygen species. Plant Singn. Behav. 6:1741-1745.

Landis TD (1989) Irrigation and water management. In: Landis TD, Tinus RW, McDonald SE, Barnett JP (eds) The container tree nursery manual. Vol. 4, US Department of Agriculture, Forest Service, Washington, DC, pp: 109.

Larsen JB (1981) Geographic variation in winter drought resistance of Douglas fir. Silvae Genet. 30:4-5.

Larsen JB, Mekic F (1991) The geographic variation in european silver fir (*Abies alba* Mill.) Silvae Genet. 40:188-198.

Lei Y, Yin C, Li C (2006) Differences in some morphological, physiological, and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*. *Physiol. Plant.* 127:182–191.

Lei YB, Yin CY, Li CY (2007) Adaptive responses of *Populus przewalskii* to drought stress and SNP application. *Acta Physiol. Plant.* 29:519–526.

Levitt J (1980) Responses of plants to environmental stresses. Vol II, water, radiation, salt and other stresses. Academic Press, EUA, San Francisco.

Li PM, Cheng LL, Gao HY, Jiang CD, Peng T (2009) Heterogeneous behavior of PSII in soybean (*Glycine max*) leaves with identical PSII photochemistry efficiency under different high temperature treatments. *J. Plant Physiol.* 166:1607-1615.

López R, Aranda I, Gil L (2009) Osmotic adjustment is a significant mechanism of drought resistance in *Pinus pinaster* and *Pinus canariensis*. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales* 18:159-166.

López R, López HU, Collada C, Cano FJ, Emerson BC, Cochard H, Gil L (2013) Vulnerability to cavitation, hydraulic efficiency, growth and survival in an insular pine (*Pinus canariensis*). *Ann. Bot.* 111:1167-1179.

Major JE, Johnson KH (2001) Shoot water relations of mature black spruce families displaying a genotype x environment interaction in growth rate. III. Diurnal patterns as influenced by vapor pressure deficit and internal water status. *Tree Physiol.* 21:579-587.

Martínez TT, Vargas HJJ, López UJ, Muñoz OA (2002a) Respuesta al déficit hídrico en *Pinus leiophylla*: acumulación de biomasa, desarrollo de hojas secundarias y mortandad de plántulas. *Terra* 20:291-301.

Martínez TT, Vargas HJJ, Muñoz OA, López UJ (2002b) Respuesta al déficit hídrico en *Pinus leiophylla*: consumo de agua y crecimiento en plántulas de diferentes poblaciones. *Agrociencia* 36:365-376.

Martiñón MRJ, Vargas HJJ, López UJ, Gómez GA, Vaquera HH (2010) Respuesta de *Pinus pinceana* Gordon a estrés por sequía y altas temperaturas. *Rev. Fitotec. Mex.* 33:239-248.

Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence-*a* practical guide. *J. Exp. Bot.* 51:659-668.

Miller PR, de Bauer MLI, Hernández TT (2002). Oxidant exposure and effects on pine forests in the Mexico City and Los Angeles, California air basins. In: Fenn ME, de Bauer MLI, Hernández TT (eds) *Urban Air Pollution and Forests: Resources at Risk in the Mexico City Air Basin*, *Ecol. Stud.* Springer-Verlag, New York, pp 225-242.

Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7:405-410.

Morales VMG, Ramírez MCA, Delgado VP, López UJ (2010) Indicadores reproductivos de *Pinus leiophylla* Schltdl. et Cham. En la cuenca del río Angulo, Michoacán. Rev. Mex. Cien. For. 1:31-38.

Munné BS, Jubany MT, Alegre L (2001) Drought-induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defences in chloroplasts. Plant Cell Environ. 24:1319–1327.

Munné BS, Jubany MT, Alegre L (2003) Enhanced photo and antioxidative protection, and hydrogen peroxide accumulation in drought-stressed *Cistus clusii* and *Cistus albidus* plants. Tree Physiol. 23:1–12.

Musálem M, Martínez GS (2003) Monografía de *Pinus leiophylla* Schl. et Cham. Proyecto de investigación manejo sustentable y conservación de la biodiversidad de los bosques de clima templado frío de México. Proyecto Sierra Madre. INIFAP. Chapingo, México.

Nanayakkara B, Lagane F, Hodgkiss P, Dibley M, Smaill S, Riddell M, Harrington J, Cown D (2014) Effects of induced drought and tilting on biomass allocation, wood properties, compression wood formation and chemical composition of young *Pinus radiata* genotypes (clones). Holzforschung 68: 455–465.

Nguyen QA, Bouchet LF (2003) Osmotic adjustment in three year old seedling of five provenances of maritime pine (*Pinus pinaster*) in response to drought. Tree Physiol. 23:397-404.

Noctor G, Mhamdi A, Foyer CH (2014) Update on the Physiology of Reactive Oxygen Metabolism during Drought. The Roles of Reactive Oxygen Metabolism in Drought: Not So Cut and Dried. Plant Physiol. 164:1636–1648.

Perry JP (1991) The pines of Mexico and Central America. Timber Press. EUA, Portland.

Prieto RJ, Cornejo OE, Domínguez CP, Návar JJ, Marmolejo MJ, Jiménez PJ (2004) Estrés hídrico en *Pinus engelmannii* Carr., producido en vivero. Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales 13:443-451.

Rachmilevitch S, DaCosta M, Huang B (2006) Physiological and biochemical indicators for stress tolerance. In: Plant-environmental interactions. Huang B (ed) Taylor & Francis Group, New York, EUA, pp:321-345.

Ramachandra RA, Viswanatha CK, Vivekanandan M (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. J. Plant Physiol. 161:1189-1202.

Richardson DM, Rundel PW, Jackson ST, Teskey RO, Aronson J, Bytnerowicz A, Wingfield MJ, Procheş (2007) Human Impacts in Pine Forests: Past, present and future. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 38:275-297.

Rodríguez BA, Vargas MCF, Buonamici A, Vendramin GG (2009) Genetic diversity and phylogeographic analysis of *Pinus leiophylla*: a post-glacial range expansion. *J. Biogeogr.* 36:1807-1820.

Rzedowski J (2006) Vegetación de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 1ª ed. digital, México, DF.

Sanders GJ, Arndt SK (2012) Osmotic adjustment under drought conditions. In: Arcona R (ed) Plant Responses to drought stress. From morphological to molecular features. Springer Berlin Heidelberg, pp 199-229.

Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen E (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339-346.

Scholz F, Stephan BR (1982) Growth and reaction to drought of 43 *Abies grandis* provenances in a greenhouse study. *Silvae Genet.* 31: 27-35.

Scott HD (2000) Soil physics. Agricultural and environmental applications. Ames, Iowa State University. Iowa EUA, pp 201-207

Seiler JR, Johnson JD (1988) Physiological and morphological responses of three half-sib families of loblolly pine to water-stress conditioning. *Forest Sci.* 34:487-495.

Secchi F, Zwieniecki MA (2014) Down-regulation of plasma intrinsic protein1 aquaporin in poplar trees is detrimental to recovery from embolism. *Plant Physiol.* 164:1789-99.

Shvaleyeva AL, Silva CE, Breia E, Jouve L, Hausman JF, Almeida MH, Maroco JP, Rodrigues ML, Pereira JS, Chaves MM (2005) Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity. *Tree Physiol.* 26:239-248.

Smirnoff N (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* 125:27-58.

Sofa A (2011) Drought stress tolerance and photoprotection in two varieties of olive tree. *Acta Agric. Scand.* 61:11-720.

Spollen WG, Sharpo RE, Saab IN, Wu Y (1993) Regulation of cell expansion in roots and shoots at low water potentials. In: Smith JAC, Griffiths H (eds) Water deficits. Plant responses from cell to community. Bios Scientific, Oxford, pp 37-52.

Srivastava A, Guissé B, Greppin H, Strasser RJ (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. *Biochim. Biophys. Acta* 1320:95-106.

Steudle E (1993) Pressure probe technique: basic principles and application to studies of water and solute relations at the cell, tissue and organ level. In: Smith JAC, Griffiths H (eds) Water

deficits Plant responses from cell to community. Bios Scientific Publishers Limited, UK, pp 5-31.

Strasser R, Srivastava A, Govindjee (1995) Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.* 61:32-42.

Strasser R, Srivastava A, Tsimilli MM (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus M, Pathre U, Mohanty P (eds.) *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*. Taylor & Francis, London, pp 445-483.

Strasser R, Tsimilli MM, Srivastava A (2004) Analysis of the fluorescence transient. In: George C, Papageorgiou C, Govindjee C (eds) *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. *Advances in Photosynthesis and Respiration Series*. Springer, Dordrecht, pp 321-362.

Strasser R, Tsimilli MM, Qiang S, 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*. *Biochim. Biophys. Acta* 1797:1313-1326.

Strasser R, Stirbert AD (2001) Estimation of the energetic connectivity of PS II centers in plants using the fluorescence rise O–J–I–P. Fitting of experimental data to three different PSII models. *Math. Comput. Simul.* 56:451–461.

Strauss AJ, van Heerden PDR, de Beer M, Krüger GHJ, Strasser RJ (2008) Changes in O-J-I-P Fluorescence Rise Kinetics During Dark Chilling Provide Insight into Genotype-Specific Effects on Photosynthesis and N<sub>2</sub> Fixation in Soybean. In: Allen JF, Gantt E, Golbeck JH, Osmond B (eds) *Photosynthesis. Energy from the Sun 14th international Congress on Photoynthesis*, pp 1593-1597.

Su H, Li Y, Liu W, Xu H (2014) Changes in water use with growth in *Ulmus pumila* in semiarid sandy land of northern China. *Trees* 28:41-52.

Susiluoto S, F Berninger (2007) Interactions between morphological and physiological drought responses in *Eucalyptus microtheca*. *Silva Fenn.* 41:221-229.

Taiz L, Zeiger E (2006). *Fisiología vegetal*. Vol. I y II, Universitat Jaume, Castellón de la Plana.

Tan W, Blake TJ, Boyle TJB (1992) Drought tolerance in faster and slower growing black spruce (*Picea mariana*) progenies: stomatal and gas exchange responses to osmotic stress. *Physiol. Plant.* 85:639-644.

Tardieu F, Parent B, Caldeira CF, Welcer C (2014) Genetic and physiological controls of growth under water deficit. *Plant Physiol.* 164: 1628-1635.

Triantaphylidès C, Krischke M, Hoerberichts FA, Ksas B, Gresser G, Havaux M, Van Breusegem F, Mueller MJ (2008) Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiol.* 148:960-968.

Van Buijtenen JP, Bilan V, Zimmerman RH (1976) Morphophysiological characteristics related to drought resistance in *Pinus taeda*. In: Cannell MG Last F (eds) *Tree physiology and yield improvement*. Academic Press, Londres, Inglaterra, pp: 349-359.

Vargas HJJ, López UJ (2011) Diseños genéticos y métodos estadísticos en la evaluación de germoplasma de especies forestales In: Vargas HJJ, Bermejo VB, Leding FT (eds) *Manejo de recursos genéticos forestales*. CONAFOR, México, pp 113-127.

Vargas HJJ, Muñoz OA (1988) Resistencia a sequía: II. Crecimiento y supervivencia en plántulas de cuatro especies de *Pinus*. *Agrociencia* 72:197-208.

Vargas HJJ y López UJ (2011) Diseños genéticos y métodos estadísticos en la evaluación de germoplasma de especies forestales In: Vargas HJJ, Bermejo VB, Leding FT (eds) *Manejo de recursos genéticos forestales*. CONAFOR, México, pp 113-127.

Vredenberg WJ (2008) Analysis of initial chlorophyll fluorescence induction kinetics in chloroplasts in terms of rate constants of donor side quenching release and electron trapping in photosystem II. *Photosynth. Res.* 96:83–97

Wang H, Yamauchi A (2006) Growth and function of roots under abiotic stress in soils. In: Huang B (ed) *Plant-Environmental Interactions*. Taylor & Francis Group, New York, pp 271-299.

Waring RH, Clearly BD (1967) Plant moisture stress: evaluation by pressure bomb. *Science* 155:1248-1254.

Warm E, Laties G (1982) Quantification of hydrogen peroxide in plant extracts by the chemiluminescence reaction with luminol. *Phytochem. Anal* 21:827–831.

Wu Y, Ballif J, Huang B (2006) Molecular mechanisms in hormonal regulation of drought tolerance. In: Huang B (ed) *Plant-environmental interactions*. Taylor & Francis Group, New York, pp 101-120.

Xiao X, Yang F, Zhang S, Korpelainen H, Li C (2009) Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress. *Physiol. Plant.* 136:150-168.

Xu Z, Zhou G, Shimizu H (2010) Plant responses to drought and rewatering. *Plant Signal Behav* 5:649-654.

Yang F, Wang Y, Miao LF (2010) Comparative physiological and proteomic responses to drought stress in two poplar species originating from different altitudes. *Physiol. Plant.* 139:388-400.

- Young RA (1991) *Introducción a las Ciencias Forestales*. Editorial Limusa. México, DF.
- Young RA, Boshier D, Boyle T (2000) *Forest conservation genetics: principles and practice*. CABI Publishing, Oxon.
- Yordanov I, Velikova V, Tsonev T (2003) Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulg. J. Plant Physiol. Special Issue*: 187-206.
- Yunusa IAM, Thomson SE, Pollock KP, Lu YW, Mead DJ (2005) Water potential and gas exchange did not reflect performance of *Pinus radiata* D. Don in an agroforestry system under conditions of soil water deficit in a temperate environment. *Plant Soil* 275:195-206.
- Zhang JW, Feng Z, Cregg BM, Schumann CM (1997) Carbon isotopic composition, gas exchange, and growth of three populations of ponderosa pine differing in drought tolerance. *Tree Physiol.* 17:461-466.
- Zhang LI, Gao HY, Zhang ZS, XUE ZC, Meng QW (2012) Multiple effects of inhibition of mitochondrial alternative oxidase pathway on photosynthetic apparatus in *Rumex* K-1 leaves. *Biol. Plant.* 56:365-368.
- Zhu YJ, Li L, Jia ZQ (2011) Research advances on drought resistance mechanism of plant species in arid zones of China. *Sciences in Cold and Arid Regions* 3:448-454.
- Zobel B, Talbert J (1988). *Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales*. Editorial Limusa. México, DF.
- Zolfaghari F, Fayyaz P, Nazari M, Valladares F (2013) Interactive effects of seed size and drought stress on growth and allocation of *Quercus brantii* Lindl. seedlings from two provenances. *Turk. J. Agric. For.* 37: 361-368.
- Zou C, Sands R, Sun O (2000) Physiological responses of radiata pine roots to soil strength and soil water deficit. *Tree Physiol.* 20:1205-1207.