



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE BOTÁNICA

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS Y DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN MAÍZ (*Zea mays* L.) EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO

SABINA VELÁZQUEZ MÁRQUEZ

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

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2014

La presente tesis titulada: **Expresión de proteínas y determinación de carbohidratos en maíz (*Zea mays* L.) en condiciones de estrés hídrico** realizada por la alumna: **Sabina Velázquez Márquez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
BOTÁNICA

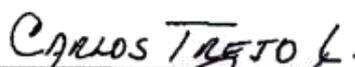
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



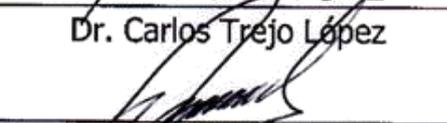
Dr. F. Víctor Conde Martínez

ASESOR



Dr. Carlos Trejo López

ASESORA


Dra. Adriana Delgado Alvarado

ASESOR


Dr. Aquiles Carballo Carballo

ASESOR


Dr. José O. Mascorro Gallardo

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Abril de 2014

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS Y DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN MAÍZ (*Zea mays* L.) EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO

Sabina Velázquez Márquez, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2014.

RESUMEN

La sequía es uno de los factores abióticos limitantes que causa reducción en el crecimiento, en la producción de biomasa y en el rendimiento de cultivos. Las variedades de maíz con cierta tolerancia a la sequía responden con cambios en su fisiología y metabolismo. Algunas de estas respuestas son disminución en el contenido relativo de agua, disminución del potencial osmótico, acumulación de solutos como la prolina y varios azúcares, así como también alteraciones en el contenido de proteínas. Las plantas de maíz tienen la capacidad de generar ajustes que les permite adaptarse y sobrevivir a ciertos niveles de déficit de agua. El objetivo del trabajo fue analizar el efecto del déficit de agua en la acumulación de solutos y en los cambios de proteínas en dos materiales de maíz VS-22 (tolerante) y AMCCG-2 (susceptible). El estudio se realizó a nivel de elongación del ápice de la radícula, a las 24, 48 y 72 h, y con tres potenciales de agua del sustrato (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa). A nivel de planta, los análisis se realizaron a las 7 semanas después de tratamiento de sequía, con un déficit de agua gradual del 50% iniciado a los 6 días después de la emergencia. Los resultados obtenidos en el ápice de la radícula de VS-22 demostraron que los diferentes niveles de déficit de agua del sustrato produjeron incrementos en la acumulación de solutos; como prolina, azúcares totales y específicos como glucosa, fructosa y sacarosa, además se detectó la acumulación del disacárido trehalosa, y se observó el mantenimiento de la elongación del ápice de la radícula. Los valores anteriores fueron menores en AMCCG-2. También se observaron cambios en el contenido y en el perfil de proteínas solubles en ambos materiales de maíz. A nivel de planta, el déficit de agua en VS-22 mostró disminución en el contenido relativo de agua (CRA) hasta de un 68 %, comparado con plantas de VS-22 en condiciones de riego, y el potencial osmótico (ψ_s) se redujo hasta -2.0 MPa, también se mostró incremento en la acumulación de solutos; prolina, glucosa, fructosa, sacarosa y azúcares totales, se evidenció la acumulación de trehalosa, así como cambios

en la acumulación de almidón y del perfil de proteínas. Estos resultados fueron detectados en menor grado para AMCCG-2, la cual resultó más afectada por el déficit hídrico suministrado. Se encontraron relaciones significativas entre acumulación de los diferentes solutos y cambios en los perfiles de proteínas, cuando las plantas fueron sometidas a déficit hídrico. También se observaron cambios significativos en la densidad de RUBISCO. Estos resultados pueden ser indicadores de ajuste osmótico en las plantas de la variedad VS-22 y como consecuencia mantener la turgencia celular durante periodos de falta de agua.

Palabras clave: Relaciones hídricas, acumulación de solutos, maíz, RUBISCO, proteínas solubles.

PROTEIN EXPRESSION AND DETERMINATION OF CARBOHYDRATES IN CORN (*Zea mays* L.) ON WATER STRESS CONDITIONS

**Sabina Velázquez Márquez, D.Sc.
Colegio de Postgraduados, 2014.**

ABSTRACT

Drought is one of the abiotic limiting factors in agriculture, causing a reduction of crop growth, biomass production and yield. Maize varieties with some tolerance to drought respond to water stress with changes in their physiology and metabolism. Some of these responses are a decrease in the relative water content and in the osmotic potential, the accumulation of solutes such as proline and various sugars, as well as alterations in protein content. Maize plants have the ability to generate adjustments that allow them to adapt and survive under water shortage. The objective of this work was to analyze the effect of water deficit on the accumulation of solutes and protein changes in two maize varieties VS -22 (tolerant) and AMCCG-2 (susceptible). The study was conducted at the level of the elongation of the radicle apex at 24, 48 and 72 h by using different substrate water potentials (-0.03 , -1.0 and -1.5 MPa), and at plant level 7 weeks after emergence with gradual water supply deficit of 50%. The results obtained in the apex of the radicle of VS- 22 showed that different levels of substrate water deficit resulted in an increased accumulation of proline, total and specific sugars such as glucose, fructose and sucrose. In addition, the disaccharide trehalose accumulation was detected, and it was observed that elongation of the radicle apex was maintained. The values for solute accumulation were lower in AMCCG-2. Changes in proteins content and profile in both maize cultivars were also observed. The investigation at plant level in VS -22 subject to water deficit showed a decrease in the relative water content (RWC) to 68 %, and of the osmotic potential (ψ_s) to -2.0 MPa, and also an increase in the accumulation of solutes: proline, glucose, fructose, sucrose and total sugars. Trehalose accumulation was evident, as well as changes in the accumulation of starch, and in the soluble protein profiles. The values for solute accumulation were lower in AMCCG-2, which was affected more by the water deficit. We found out that there were significant relationships between the different solutes accumulation and the changes in protein profiles when plants

were under water stress. Significant changes were also observed in the expression of RUBISCO. These results may be indicative of osmotic adjustment in plants of the variety VS-22 allowing them to maintain cell turgor during periods of water shortage.

Key words: Water relationships, solutes accumulation, RUBISCO, soluble proteins.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados por permitirme realizar y culminar mis estudios de doctorado.

A CONACyT por las facilidades proporcionadas para poder llevar a cabo la realización de este proyecto y poder continuar con mis estudios de doctorado.

Quiero agradecer al Dr. Víctor Conde por permitirme integrarme a su grupo de trabajo y brindarme toda su paciencia para poder formarme como doctora, gracias por su confianza y amistad

A los integrantes de mi consejo particular Dr. Carlos Trejo, Dra. Adriana Delgado, Aquiles Carballo y Oscar Mascorro por sus recomendaciones, su apoyo para mi formación muchas gracias

Al Dr. Ebandro que se portó muy comprensible conmigo, y siempre estuvo apoyándome durante mi estancia en el Doctorado

Al grupo de trabajo de bioquímica especialmente a mis compañeros de laboratorio que hicieron más amena mi estancia en el Colegio

DEDICATORIAS

A mí querido esposo, Jesús Rubén, gracias por todos tus consejos por fin estamos cerrando un círculo y vamos por más, esto solo es el inicio de muchos que nos falta. Te amo.

Este suceso quiero compartirlo con dos personas que siempre creyeron en mí incondicionalmente Carmen y Melecio gracias por su infinito amor y apoyo. Los amo

Con mucho amor para mis hermanos Noé, Norberto, gracias por su cariño que me brindan eso me impulsa a seguir adelante.

Para Lupita y mis queridos sobrinos que me han dado muchas alegrías y sonrisas Betito y Monse los quiero mucho

CONTENIDO

CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 Importancia del maíz.....	1
1.2 Tipos de estrés que afectan la producción de cultivos.....	2
1.3. La sequía y el estrés hídrico.....	3
1.4. Respuestas de las plantas al estrés hídrico.....	6
1.5. Cuantificación del estrés hídrico.....	8
1.6. Acumulación de solutos en respuesta al estrés hídrico.....	9
1.7. Ajuste osmótico.....	10
LITERATURA CITADA.....	12
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1 Características del material vegetal.....	18
2.2 Tratamientos y mediciones.....	18
2.2.1 Experimento I: elongación de radículas de maíz con déficit de agua, en charolas germinadoras y en condiciones de oscuridad.....	18
2.2.2. Experimento II: Crecimiento de plantas de maíz con déficit de agua, en condiciones de invernadero.....	20
2.3. Análisis estadístico.....	21
2.4. Contenido relativo de agua (CRA).....	21
2.5 Potencial de agua (Ψ_A), osmótico (Ψ_O) y de turgencia (Ψ_T).....	22
2.6. Extracción y determinación de azúcares.....	22

2.6.1 Obtención de las curvas estándar de calibración de glucosa, fructosa y sacarosa.....	23
2.7 Determinación de azúcares totales.....	24
2.7.1 Método Antrona.....	24
2.8 Determinación de Trehalosa.....	25
2.9 Determinación de almidón.....	27
2.10 Determinación de prolina.....	27
2.10.1 Extracción de prolina.....	28
2.11. Determinación y extracción de proteínas.....	29
2.11.1 Separación de proteínas en condiciones desnaturalizantes.....	29
2.11.2 Determinación del peso molecular.....	30
2.11.3 Inmunodetección de RUBISCO.....	31
LITERATURA CITADA.	32
CAPÍTULO 3	
EFFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO EN LA ELONGACIÓN DE LA RADÍCULA Y ACUMULACIÓN DE SOLUTOS EN <i>Zea mays</i> L.....	34
ABSTRACT.....	34
3.1 INTRODUCCIÓN.....	35
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.2.1. Material vegetativo.....	37
3.2.2. Tratamientos y mediciones.....	37
3.2.3 Contenido relativo de agua (CRA).....	39
3.2.4 Potencial de agua (Ψ_A), osmótico (Ψ_O) y turgencia (Ψ_T) de la radícula.....	39

3.2.5 Determinación de solutos.....	40
3.2.6 Determinación de Trehalosa.....	40
3.2.7. Determinación de prolina.....	41
3.3. RESULTADOS.....	42
3.3.1 Longitud de la radícula (cm).....	43
3.3.2 CRA y relaciones hídricas.....	44
3.3.3 Determinación y acumulación de solutos.....	46
3.3.4 Determinación de prolina.....	51
3. 4 DISCUSIÓN.....	53
3.4.1 Longitud de la radícula.....	53
3.4.2 Relaciones hídricas y acumulación de solutos.....	54
LITERATURA CITADA.....	59
CAPÍTULO 4. EFECTO DE ESTRÉS HÍDRICO EN LA CONCENTRACIÓN DE AZUCARES SOLUBLES, EN HOJAS DE DOS VARIEDADES MAÍZ VS-22 Y AMCCG-2.....	66
RESUMEN.....	66
4.1. INTRODUCCIÓN.....	67
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	70
4.2.1 Muestras de hojas para determinaciones fisiológicas y bioquímicas.....	71
4.2.2 Contenido relativo de agua (CRA).....	71
4.2.3 Determinación del potencial osmótico (Ψ_o).....	71

4.2.4 Determinación de prolina.....	72
4.2.5 Cuantificación de azúcares solubles: glucosa, fructosa y sacarosa.....	72
4.2.6 Cuantificación de almidón.....	73
4.2.7. Cuantificación de azúcares totales.....	73
4.2.8. Determinación de Trehalosa.....	74
4.2.9 Diseño experimental y análisis estadístico.....	74
4.3. RESULTADOS.....	76
4.3.1 Variables fisiológicas.....	76
4.4. DISCUSIÓN.....	85
LITERATURA CITADA.....	92
CAPÍTULO 5 CARACTERIZACIÓN DE PROTEINAS EN RADÍCULA Y HOJA DE MAÍZ (<i>Zea mays</i> L.) E INMUNODETECCIÓN DE RUBISCO.....	98
RESUMEN.....	98
5.1. INTRODUCCIÓN.....	100
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	102
5.2.1. Radícula de maíz.....	102
5.2.2 Plantas de maíz.....	103
5.2.3 Extracción de proteínas.....	104
5.2.4. Separación de proteínas en condiciones desnaturalizantes.....	104
5.2.5 Inmunodetección.....	105
5.2.6 Análisis estadístico.....	106

5.3. RESULTADOS.....	107
5.3.1 Determinación de proteína.....	107
5.3.2 Geles de electroforesis.....	110
5.4. DISCUSIÓN.....	117
5.4.1 Proteínas solubles.....	117
5.4.2. Análisis electroforético de maíz.....	118
LITERATURA CITADA.....	122
DISCUSION GENERAL.....	127
LITERATURA CITADA.....	133
CONCLUSIONES GENERALES	137

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Respuestas de la planta total a estrés hídrico. Del lado izquierdo respuestas a largo plazo o aclimatación; lado derecho respuestas a corto plazo.....	7
---	---

CAPÍTULO 2

Figura 1. Resumen el proceso de preparación de la columna para desionizar las muestras para la determinación de trehalosa.....	26
---	----

CAPÍTULO 3

Figura 1. Elongación del ápice de la radícula de dos variedades de maíz crecidas en diferentes potenciales hídricos (Ψ_A) del sustrato (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa) y con diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h). Los puntos son el promedio \pm E.E. ($n=10$).....	43
---	----

Figura 2. Elongación de la radícula de maíz (A) VS-22, (B) AMCCG-2 en diferentes potenciales hídricos (Ψ_A) del sustrato (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa) y con diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h).	44
---	----

Figura 3. Contenido relativo de agua en radícula de dos variedades de maíz crecidas en tres potenciales de agua del sustrato (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa), y con diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$). Cada barra son el promedio \pm E.E ($n=10$).....	44
--	----

Figura 4. Potencial hídrico (A), potencial osmótico (B) y potencial de turgencia (C) de los ápices de las radículas en dos variedades de maíz, crecidas en diferentes potenciales de agua (Ψ_A) del sustrato (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa) y a las 72 de incubación. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey 0.05). Las barra son el promedio \pm E.E ($n=10$).....	46
---	----

Figura 5. Acumulación de glucosa (A), fructosa (B) y sacarosa (C), ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PF}$) en los ápices de las radículas de dos variedades de maíz, crecidas en diferentes potenciales de agua (Ψ_A) del sustrato (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa) y con diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey 0.05). Cada punto son el promedio \pm E.E ($n=10$)..... 48

Figura 6. Acumulación de trehalosa ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) en los ápices de las radículas en dos variedades de maíz, crecidas en diferentes potenciales de agua (Ψ_A) del sustrato (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa) y con diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey 0.05). Cada punto es el promedio \pm E.E ($n=10$)..... 50

Figura 7. Concentración de almidón (mg g^{-1} PF) en los ápices de las radículas en dos variedades de maíz, crecidas con diferentes potenciales de agua (Ψ_A) del sustrato (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa) y con diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey 0.05). Cada punto son el promedio \pm E.E ($n=10$)..... 51

CAPÍTULO 4

Figura 1. Contenido relativo de agua A (CRA) y potencial osmótico (B) en hojas de dos variedades de maíz (VS-22 y AMCCG-2) con diferente déficit de agua. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $P < 0.05$. Cada barra es el promedio \pm E.E ($n=10$)..... 77

Figura 2. Relación entre el CRA y el potencial osmótico en hojas de 30 plantas de maíz por variedad (VS-22 y AMCCG-2), y con diferente déficit de agua..... 78

Figura 3. Efecto de la sequía en el contenido de azúcares solubles en hojas de maíz y correlación entre el PO y la acumulación de glucosa (A), fructosa (B) y sacarosa (C) en hojas de maíz con diferente estrés hídrico. En la figura D se observa la acumulación de azúcares en las variedades de maíz. Las columnas muestran la acumulación de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) de siete semanas de tratamiento de déficit hídrico. Las columnas muestran las barras de error y las medias correspondientes representan el \pm EE ($n=10$)..... 79

Figura 4. Efecto de déficit hídrico en la acumulación de azúcares totales (mg.g^{-1} PF) en hojas de maíz de dos variedades de maíz VS-22 y AMCCG-2 en estrés hídrico (riego, sequía). Las columnas representan el promedio de 10 repeticiones.....	81
Figura 5. Efecto del déficit hídrico en la acumulación de almidón (mg.g^{-1} PF) en hojas de dos variedades de maíz VS-22 y AMCCG-2. Las columnas representan el promedio de 10 repeticiones.....	82
Figura 6. Efecto del estrés hídrico en la acumulación de trehalosa ($\mu\text{g/mL}^{-1}$) de las variedades de maíz VS-22 y AMCCG-2 en estrés hídrico. Columnas negras riego y blancas sequía. Las columnas muestran las barras de error y las medias correspondientes representan el \pm EE ($n = 10$).....	83

CAPÍTULO 5

Figura 1. Efecto del déficit hídrico en el contenido de proteínas solubles (mg.g^{-1} PF) en radícula de dos variedades de maíz crecidas en tres potenciales de agua del sustrato (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa), y con diferentes periodos de incubación (24, 48 y 72 h). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$). Cada barra son el promedio \pm E.E ($n = 10$).....	108
Figura 2. Efecto del déficit hídrico en el contenido de proteínas solubles (mg.g^{-1} PF) en hojas de dos variedades de maíz crecidas en riego y déficit hídrico. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$). Cada barra son el promedio \pm E.E ($n = 10$).....	109
Figura 3. Patrón de proteínas de los ápices de las radículas en dos variedades de maíz, crecidas en diferentes potenciales de agua (Ψ_A) del sustrato (A,-0.03, -B, 1.0 y C, -1.5 MPa) a 72 de incubación (72 h. Las proteínas fueron separadas en geles de SDS-PAGE al 12.5% en todos los casos la concentración de proteína fue de $60\mu\text{g}$ por pozo. Figura 3B se observa las diferencias en porcentaje de densidad óptica.....	111
Figura 4. SDS-PAGE proteínas de hojas de dos variedades de maíz en respuesta al déficit hídrico con tratamiento de 7 semanas A (estándar de Rubisco); B (Riego AMCCG-2); C (riego VS-22); D (sequía AMCCG-2); E (sequía VS-22). En la figura 4 B podemos observar cambios de la densidad óptica dados.....	113

Figura 5. Western Blot, lado izquierdo y porcentaje de Rubisco de la subunidad pequeña del lado derecho en hojas de maíz de AMCCG-2 y VS-22 en condiciones de riego y sequía. Proteínas extraídas de hojas de maíz de siete semanas de tratamientos capacidad de campo y estrés hídrico A (Estándar de Rubisco), B (Testigo negativo); C (riego susceptible); D (riego tolerante); E (sequia susceptible); F (sequía tolerante). Los datos son el promedio \pm E.E (n=3).....

115

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Acumulación de prolina ($\mu\text{mol g}^{-1}$ PF) de los ápices de las radículas en dos variedades de maíz, crecidas en diferentes potenciales de agua (Ψ_A) del sustrato (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa) y con diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey 0.05). Cada punto es el promedio \pm E.E ($n=10$).....	52
Cuadro 1. Acumulación de prolina ($\mu\text{moles g}^{-1}$ PF) en hojas de maíz de las variedades VS-22 y AMCCG-2 con diferente déficit de agua.....	84

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

Debido al aumento de la población mundial y al ingreso económico *per capita*, la demanda de alimentos también ha aumentado. La organización mundial de la salud (OMS) estima que, para el año 2030 la demanda de los productos agrícolas se incrementará en aproximadamente 60%. De este incremento un porcentaje mayor al 85% se deberá a los países en desarrollo donde ocurrirá el mayor crecimiento poblacional (FAO, 2007). En el pasado, la producción agrícola tuvo un aumento a través de la incorporación de nuevas tierras de cultivo. Sin embargo, la disponibilidad de agua y de nuevas tierras es limitada, además del incremento que ha tenido la competencia por el uso del suelo debido a la demanda industrial, comercial y residencial (Hillel y Rosenz-Weing, 2002)

1.1 Importancia del maíz

El maíz es una gramínea con el grano de mayor volumen de producción a nivel mundial, seguido del arroz y del trigo, cuya adaptabilidad permite su cultivo en más de 113 países. Los tres principales productores por volumen de producción del grano son Estado Unidos, China y Brasil. Se destaca China por el mayor dinamismo en su cosecha, con una Tasa Media Anual de Crecimiento (TMAC) de 6.4%, entre el 2007 y el 2012. Por su parte, Estados Unidos presentó una TMAC de 3.7%, dejando de lado la afectación de la sequía severa del 2012, su tendencia decreciente es constante. El promedio de producción de los últimos tres años en EU es 9.0% inferior a la producción del 2007.

En México 50 % de la producción de maíz se obtiene de cinco estados de la república: Sinaloa, Estado de México, Jalisco, Chiapas y Michoacán (Muñoz, 2003), y es el principal cultivo, por su importancia en la ingesta alimenticia diaria de la población. No obstante, de los más de 30 millones de toneladas que se consumen anualmente, sólo 21.5 millones son producidos nacionalmente. Es decir, somos deficitarios en cerca de 28.1% del consumo nacional aparente.

Además, se considera que el maíz tiene una gran importancia socio-cultural, por presencia en un sin número de productos de nuestra vida cotidiana. También se ha llevado a cabo el proceso de domesticación y el mejoramiento del maíz continúa en el presente, ya que los agricultores indígenas y mestizos del país cultivan, seleccionan, guardan y usan su propia semilla de maíz año con año. Principalmente, se desarrolla en temperaturas medias de entre 25 y 30 °C; sin embargo, puede resistir, por periodos cortos, temperaturas de hasta 8 °C. Se adapta a casi todos los tipos de suelo, siempre y cuando se pueda satisfacer su alta demanda de agua y horas de sol (Edwards *et al.*, 2004).

1.2 Tipos de estrés que afectan la producción de cultivos

Por otra parte, existen factores ambientales de estrés que causan daño a los cultivos y disminuyen su rendimiento considerablemente. En general, estos pueden ser clasificados en físicos, químicos y bióticos, siendo los dos primeros agrupados bajo el término de 'estreses abióticos'. Entre los factores físicos se pueden mencionar el estrés por déficit o exceso de agua, temperaturas altas-bajas y radiación *UV*. Entre los factores químicos son ampliamente estudiadas la contaminación atmosférica con metales pesados, toxinas, salinidad etc.

Finalmente, entre los factores bióticos pueden mencionarse la competencia, la herbívora, la alelopatía y patógenos en general (Richards, *et al.*, 2001; Araus, *et al.*, 2002).

Dentro de los estreses abióticos, son de amplia repercusión para el crecimiento y productividad de las plantas el estrés hídrico (por déficit) y las bajas temperaturas (frío). Se ha elegido el punto de estrés hídrico en la presente tesis como tema de estudio, fundamentalmente por su relevancia en aspectos ecofisiológicos de las plantas y su impacto en la producción agrícola.

1.3. La sequía y el estrés hídrico

La sequía ha sido objeto de preocupación en los principales lugares del mundo, por su influencia en la producción de alimentos así como la degradación de recursos edáficos (Stockon, 1983). Científicos han llegado a la conclusión que las temperaturas están en constante aumento y esto impactará sin duda en la agricultura.

Año tras año, gran parte de los cultivos de la mayoría de los agricultores del mundo se ven afectados por la sequía; en algunos casos las pérdidas son enormes, incluso la falta de agua en poca medida puede reducir el rendimiento y afectar la posibilidad de los agricultores de recuperar las inversiones hechas en los cultivos. Es por este motivo, que generalmente los agricultores siembran aquellos cultivos que mejor se adapten a la cantidad de agua disponible (FAOSTAT, 2010)

Sin embargo, en muchas partes del mundo, se usa la agricultura irrigada para aumentar los rendimientos. Internacionalmente; según el Programa Medio ambiental de Naciones Unidas, el uso del agua en la agricultura representa

cerca del 70% del consumo total. Los costos de irrigación dependen mucho de los precios de la energía y de la oferta de agua y han aumentado de manera sostenida. En este caso, el desarrollo e introducción de semillas híbridas que requieren menos irrigación podrían reducir los costos de producción y la competencia por el agua (Revisado en, Caballero, 2010).

En México, la sequía es el principal factor que limita la productividad de los cultivos anuales. El daño que pueda ocasionar la falta de agua depende particularmente de la etapa de desarrollo de la planta en la que ocurra; las etapas más críticas son la vegetativa y las cercanas a la floración (Edmeades *et al.*, 1996, Edmeades, 2004). Cuando las plantas se encuentran en condiciones de estrés hídrico pierden agua y su potencial disminuye. Esto ocurre normalmente de forma simultánea a una disminución del potencial de turgencia y una disminución del potencial osmótico (Blum, 2009). Sin embargo las plantas que poseen ajuste osmótico la bajada del potencial no implica necesariamente la pérdida de la turgencia ya que estas plantas son capaces de acumular de forma activa sustancias orgánicas que disminuyen el potencial de solutos, y en consecuencia evitan el desarrollo normal de la fisiología celular (Parry *et al.*, 2005).

El déficit hídrico es sin duda la condición ambiental transitoria y extrema a la que más frecuente se ven sometidas las plantas, es por esto que a lo largo de su historia evolutiva, las plantas han desarrollado múltiples mecanismos de defensa contra la desecación (Barceló, 1992; Bray, 2002). Por ejemplo una planta con un metabolismo fotosintético C4 como el maíz es intrínsecamente más eficiente en el uso hídrico, y transpira sólo la mitad que las del tipo C3 (Taiz y Zaiger, 2010), como arroz, trigo, soya y algodón. A pesar de esta

ventaja clave, la limitación hídrica, afecta adversamente el crecimiento, el desarrollo y el rendimiento del maíz durante las etapas reproductivas. En general, la limitación de agua provoca en las plantas un síndrome complejo integrado por una serie de procesos algunos de los cuales son deletéreos y otros adaptativos (Chávez *et al.*, 2002; 2003), pero en general lo primero que ocurre es una disminución en la presión de turgencia y el cierre estomático para reducir la pérdida de agua en el tejido. Un decremento en el potencial hídrico interno, produce hojas enrolladas, lo que reduce la superficie expuesta, disminuyendo la fotosíntesis y finalmente el crecimiento. Visualmente, la limitación hídrica se manifiesta como una reducción en la altura y rendimiento en biomasa (Hsiao, 1973; Westgate *et al.*, 2004).

Además la sequía incide directamente sobre la fotosíntesis así como sobre los niveles de proteínas y expresión de la enzima Rubisco; y que pueden aumentar o disminuir según el tipo de estrés y genotipo de la planta (Revisado en Verslues *et al.* 2011). Las proteínas solubles en las plantas tienen una función importante en diversos mecanismos celulares importantes, como metabolitos, iones de transporte y las respuestas a estrés abiótico y biótico (Revisado en López *et al.*, 2011).

El comportamiento de las plantas frente al estrés hídrico ha sido dividido en: escape, evitación y tolerancia (Levitt, 1972; Turner, 1986) las cuales se describen a continuación:

Escape: las plantas ajustan su fenología para cumplir su ciclo fuera de los períodos de déficit hídrico

Evitación: en este caso las plantas poseen mecanismos para evitar (o postergar) la deshidratación. Una estrategia es aumentar la capacidad de

absorción de agua gracias al incremento de la superficie radical o disminución de la resistencia hidráulica (Nilsen y Orcutt, 1996) siendo frecuente en plantas conocidas como 'derrochadoras de agua'. La estrategia inversa es la que adoptan las plantas 'ahorradoras', que minimizan las pérdidas de agua por diversas vías, tales como el cierre estomático y la disminución de la transpiración cuticular.

Tolerancia: este término se refiere a la capacidad de resistir en forma reversible a la deshidratación de los tejidos. Aunque el ejemplo extremo de esto son las llamadas '*plantas, poohíquidricas*' (Oliver, 1996), las plantas 'mediterráneas' como *Rosmarinus* o *Melissa* son capaces de soportar un alto grado de deshidratación de sus tejidos (Munné-Bosch y Alegre, 2000).

1.4. Respuestas de las plantas al estrés hídrico

Las plantas también pueden soportar la sequía evitando la deshidratación del tejido y manteniendo la turgencia celular y esto es posible debido a diversos procesos fisiológicos tales como cambios en la fluidez de la membrana, la fotosíntesis, cierre estomático, acumulación de solutos y la expansión celular (Chavés *et al.*, 2002, Serraj y Sinclair 2002).

Por lo tanto los cambios y ajustes tanto a nivel fisiológico y bioquímico de las plantas les permiten sobrevivir a la sequía. En la naturaleza las plantas están sujetas a respuestas diferentes dependiendo de la intensidad y la duración de déficit hídrico (Figura 1). En el caso de la pérdida de agua gradual pueden escapar a la deshidratación acortando su ciclo de vida u optimizar su recurso y aclimatarse; para el caso de una deshidratación rápida la planta reacciona minimizando la pérdida de agua o presentando protección metabólica (inducida

o constitutiva) contra los efectos del daño por deshidratación y el co-desarrollo de estrés oxidativo. Rápido o lento la desecación puede tener resultados totalmente diferentes en términos fisiológicos y bioquímicos o adaptación (Mc Donald y Davies 1996; Chaves *et al.*, 2003).

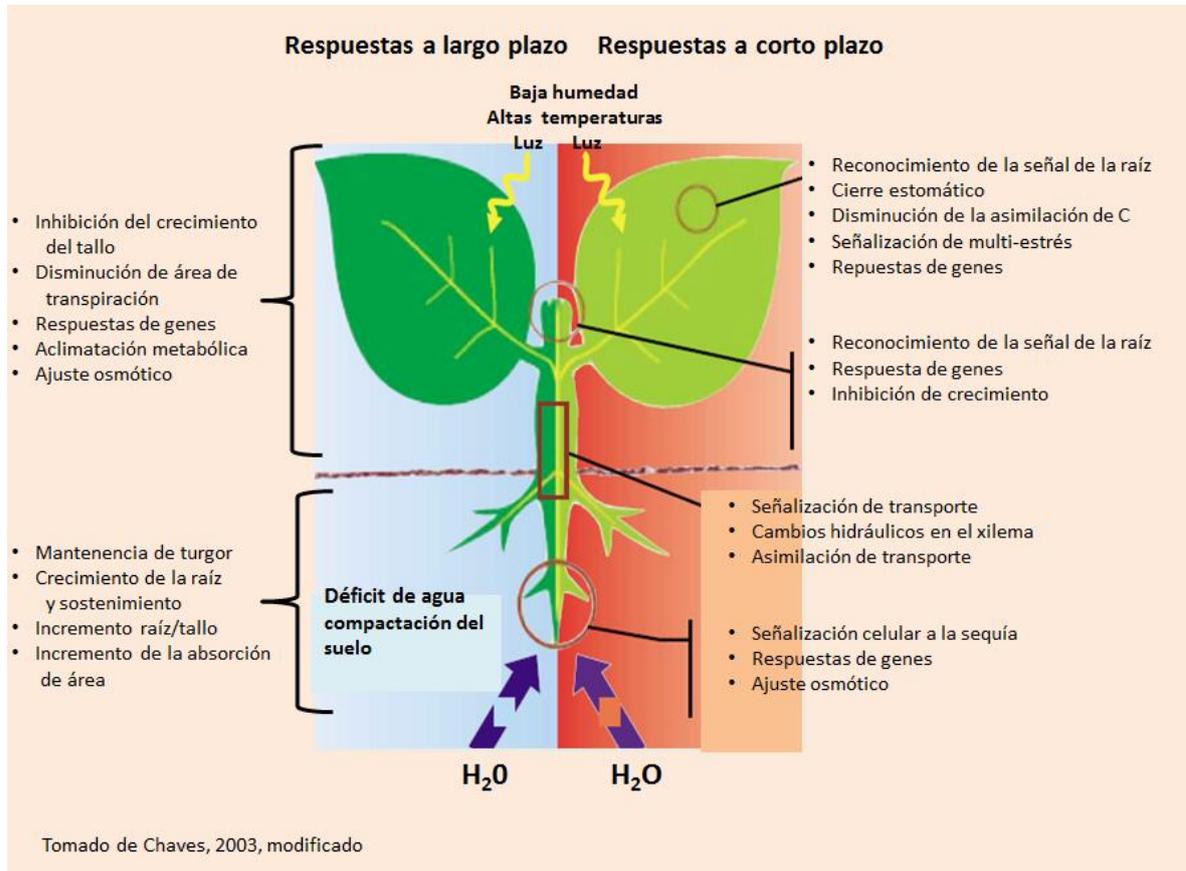


Figura 1. Respuestas de la planta a estrés hídrico. Del lado izquierdo respuestas a largo plazo o aclimatación; lado derecho respuestas a corto plazo.

Entre los solutos que se acumulan en este último mecanismo, se encuentran los azúcares que son moléculas de respuesta inmediata y son la principal fuente de energía de las células (Koch, 1996). Entre todos los azúcares, los disacáridos como la sacarosa y la trehalosa se ha observado que su función principal es de protección (Schüller, 2003) y permiten que se lleve a cabo un ajuste osmótico; éste se define como la acumulación activa de solutos en las

células vegetales provocando una reducción del potencial osmótico lo cual permite el mantenimiento de la absorción de agua y de la presión de turgencia.

1.5. Cuantificación del estrés hídrico

El estado hídrico de una planta (y la magnitud del estrés) puede ser evaluado estimando el potencial hídrico (Ψ_A) y el contenido relativo de agua (CRA), es decir, el contenido porcentual de agua en relación al contenido de agua a hidratación máxima (Turner, 1988). Sin embargo, se ha señalado que el grado de estrés no puede ser definido *per se* por el estado hídrico de la planta. Por ejemplo, el potencial hídrico puede ser en muchos casos una consecuencia y no una causa del control de la apertura estomática (Tardieu, 1997). Por otra parte, es bien conocido el hecho que las plantas pueden reaccionar a estímulos provenientes del suelo, aún antes que puedan detectarse cambios en el potencial hídrico (y aún más del CRA) de las hojas (Passioura, 1996). Además, dado que existen importantes diferencias entre especies en el grado de tolerancia al estrés, es complejo establecer parámetros objetivos que definan al estrés y su magnitud en forma general. Sin embargo, a pesar de las limitaciones señaladas (Schulte, 1992), es claro que el potencial hídrico y CRA son las formas más objetivas de cuantificar el estatus hídrico y de hecho su uso está ampliamente extendido en la literatura, sólo con el fin de poder comparar diferentes estudios, Hsiao (1973) definió tres grados de estrés hídrico:

Estrés leve: disminución del potencial hídrico de algunos bares (décimas de MPa) o del CRA en un 8-10 % comparado con plantas bien regadas bajo poca demanda evaporativa.

Estrés moderado: disminución mayor del potencial hídrico (aunque menor a 1.2- 1.5 MPa o una disminución del CRA entre 10 y 20%).

Estrés severo: disminución del potencial hídrico mayor a 15 bares (1.5 MPa) o disminución del CRA mayor a un 20%.

Esta escala, aunque de naturaleza arbitraria por las razones antes expuestas, será utilizada como referencia en el presente trabajo.

1.6. Acumulación de solutos en respuesta al estrés hídrico

Existe una relación entre el metabolismo del carbono, la acumulación de solutos y el efecto del déficit hídrico, esto se ha documentado en cereales como maíz, trigo y arroz (Yang *et al*, 2003).

La acumulación de estos solutos compatibles en los tejidos de las plantas, son productos de la fotosíntesis. La fotosíntesis proceso vital que se coordina y regula a través de los mismos azúcares producidos (Koch 1996, Sheen, 1996), el metabolismo y la distribución de los azúcares es un proceso muy dinámico y complejo debido a que varían con la fase de desarrollo (Young-Hee, 2006) y tipo de estrés abiótico y biótico.

La acumulación de solutos durante el estrés hídrico comprende azúcares tales como glucosa, fructosa, sacarosa, trehalosa y sorbitol; además de azúcares alcohol manitol y sorbitol, aminoácidos Prolina y aminos como betaina, glicina y poliamidas que se acumulan bajo estrés por sequía como osmolitos para mantener la turgencia celular y para estabilizar proteínas de la célula mediante el mecanismo de ajuste osmótico (Prioul, 2006).

1.7. Ajuste osmótico

El ajuste osmótico consiste en una disminución del potencial osmótico en los tejidos vegetales, lo que permite la entrada de agua e impide la disminución de la turgencia; se origina a través de la biosíntesis de osmolitos orgánicos de bajo peso molecular y por el aumento de iones (Cushman, 2001).

La acumulación de iones durante el ajuste osmótico ocurre principalmente en la vacuola, mientras que en el citoplasma se acumulan solutos compatibles que no afectan negativamente la funcionalidad de macromoléculas celulares (Taiz y Zeiger, 2010). Estos solutos son moléculas orgánicas de bajo peso molecular (osmolitos) como el aminoácido prolina, alcoholes-azúcar como el sorbitol y el manitol y una amina cuaternaria llamada glicina-betaína (Yancey *et al.*, 2005)

La prolina libre se acumula en el citoplasma, y tiene varias funciones de protección; se ha sugerido que la acumulación de este soluto permite a las plantas mantener una mejor turgencia, además de constituir una fuente de energía y nitrógeno útil para la planta (Fukuoka y Yamada 1984).

Por lo expuesto, el objetivo general fue analizar los efectos del estrés hídrico durante la imposición progresiva de déficit hídrico, evaluando las respuestas de dos variedades de maíz VS-22 (tolerante) y AMCCG-2 (Susceptible) desde el punto de vista fisiológico, así como cambios bioquímicos.

La tesis se encuentra dividida en siete capítulos. El primer capítulo incluye una introducción general que da un panorama amplio acerca del trabajo de investigación. El segundo capítulo aborda temas acerca de los procedimientos y materiales que se utilizaron para cumplir con los objetivos de este trabajo. En el tercer capítulo se analiza el efecto del déficit de agua en el crecimiento inicial y/o longitudinal de la raíz de dos variedades de maíz (VS-22 Y AMCCG-2). Se

utilizaron semillas recién germinadas que se colocaron en vermiculita ajustada a diferentes potenciales de agua (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa) a diferentes tiempos (24, 48 y 72 h). Se evaluó la elongación de la radícula, potenciales de agua, osmótico y de turgencia; la acumulación de azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa, trehalosa) almidón, trehalosa y el aminoácido prolina. En el cuarto capítulo, se determinó el efecto que tiene la reducción gradual del agua del suelo en la planta y se determinaron: el contenido relativo de agua, potencial osmótico, acumulación de solutos glucosa, fructosa, sacarosa, trehalosa, prolina y almidón en hojas de maíz de siete semanas de tratamiento por déficit de agua. Dada la importancia de las proteínas en los procesos de regulación de los efectos de déficit hídrico en el tejido vegetal, se abordó en un quinto capítulo la acumulación de proteínas solubles en radículas y hojas de maíz.

En general la cantidad de proteína tiene pocas modificaciones con el estrés sugiriendo que la disminución de la actividad puede estar relacionada a los cambios a nivel de activación de la enzima RUBISCO, que es la principal enzima que participa en la fotosíntesis. Además de lo ya descrito se da una explicación global en relación a los cambios fisiológicos y bioquímicos sufridos por la planta y esto se trata en el capítulo 6.

Los resultados mostraron que las plantas de la variedad tolerante (VS-22), tienen una capacidad mayor para la acumulación de solutos y un menor efecto en la expresión de RUBISCO durante los periodos de estrés. Lo anterior podría ser útil como un marcador para la selección de variedades tolerantes al déficit hídrico.

LITERATURA CITADA

- Araus, J.L., Slafer, G.A., Reynolds, M.P., Royo, C., 2002. Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for? *Annals of Botany* 89, 925-940.
- Barceló, J., Nicolás, G., Sabater, B., Sánchez, R., 1992. *Fisiología Vegetal* Ediciones Pirámide, S.A. Madrid.
- Blum A. 2009. Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Research* 112, 119–123.
- Bray E.A, 2002. Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the *Arabidopsis* genome. *Plant cell and environment*, 25,153-161.
- Caballero, M.D., 2010. Estudio de gran visión y factibilidad económica financiera para el desarrollo de infraestructura de almacenamiento y distribución de granos y oleoginosas para el mediano y largo plazo a nivel nacional. Pp. 256.
- Cushman, C.J. 2001. Crassulacean acid metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. *Plant Physiol.* 127, 1439-1448.
- Chaves M 2002. Water stress in the regulation of photosynthesis in the field. *Annals of Botany*, 89: 907-916
- Hsiao, T.C. 1973. Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology.* 24:519-570.

Chaves. M.M, Maroco, J.P, Pereira, J.S, 2003. Understanding plant responses to drought- from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30: 239-264

Edmeades , G.O ; Bolaños , J.and Chapman, S.C, 1996.Value of secondary traits in selecting for drought tolerance in tropical maize In developing drought and low N. tolerance maize . Proceedings of a Symposium .March 25-29, 1996 CIMMYT, Batán Edo. De México, México

Edmeades, G.O., Banziger, M., Schussler, J.R., Campos, H., 2004. Improving abiotic stress tolerance in maize: a random or planned process? In: Proceedings of the Arnel R. Hallauer International Symposium on Plant Breeding. Mexico City, 17 22 August 2003.

Edwards GE, Franceschi VR, Voznesenkaya EV. 2004. Single cell C4 photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm. *Annual Review of Plant Biology* 55, 173–196.

FAO 2007. The state on food and Agricultura Organization of the United Nations. Disponible en internet <http://www.fao./or/corps/statistics>.

FAOSTAT (Food and Agriculture Organization), FAO Statistics Division 2010

Fukutaku, y Yamada, Y, 1984. Sources of proline nitrogen in water-stressed soybean (*Glicine max L.*), 11. Fate of I5 N labeled protein. *Physiologia Plantarum*, 61, 622-628, 1984.

Hillel, D., Rosenzweig, C., 2002. Desertification in relation to climate variability and change. *Adv. Agron.* 77: 1 –38.

- Hsiao, T. 1976. Plant responses to water stress. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 24, 518, 4570.
- Houghton, J.T., Jenkins, G.J., Ephramus, J.J., 1990. *Climate Change: The IPCC Scientific Assessment*. Cambridge University Press, Cambridge
- Johnson, J.D, Tognetti R, Paris, P, 2002. Water relations and gas exchange in poplar and willow under water stress and elevated atmospheric CO₂. *Physiologia, Plantarum*, 115: 93-100.
- Koch, K, E; Vong W, y Xu, J.1996. Sugar and metabolic regulation of genes for sucrose metabolism: potential influence of maize sucrose synthase and soluble invertase responses on carbon partitioning and sugar sensing¹. *Journal of Experimental Botany*, 47: 1179-1185.
- Levitt, M. A, 1976. Simplified Representation of Protein Conformations for Rapid Simulation of Protein Folding. *J. Mol. Biol.* 104, 59-107.
- Lopés, M, S., Araus J.L., van Heerden, P.D.R., Foyer, C.H., 2011. Enhancing drought tolerance in C4 crops. *Journal of Experimental Botany*. 62, 3135–3153.
- Mc Donald, M.S and Davies 2003. *Photobiology of higher plants*; p. 131. Wiley. Chichester, England.
- Muñoz, O. 2003. *Centli- Maíz Prehistoria e Historia, Diversidad, Potencial, Origen Genético y Geográfico*. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco –México 210 p.

- Munne-Bosch, Alegre, L, 2000. Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta*, 210, 925-931
- Nilsen, ET; Orcutt D.M, 1996. Physiology of plants under stress abiotic factor. Pp.689
- Oliver, J., 1996. Desiccation tolerance in vegetative plant cells. *Physiologia Plantarum* 97: 779-787.
- Parry, M.L., Rosenzweig, C., Livermore, M, 2005. Climate change, global food supply and risk of hunger. *Philosophical Transactions of the royal society*. 360, 2125-2136
- Prioul, J.L., Pelleschi, S., Leonardi, S., Rocher, J.P., Cornic, Vienne, C. Thevenot, c, 2006. Analysis of the relationships between growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism using quantitative trait loci (QTLs) in young maize plants subjected to water deprivation. *Mol. Breeding*. 17, 21-39
- Pasioura, J.B., Stirzaker, R.J and Wilms, Y., 1996. Soil structure and plant growth: Impact of bulk density and biopores. *Plant and soil* 185,151-162.
- Richards, R.A., Condon, A.G., Rebetzke., 2001. Traits to improve yield in dry environments. In 'Application of physiology in wheat breeding' (Reynolds MP, Ortiz-Monasterio JI, McNab A eds.), CIMMYT, México DF. pp. 88-100.
- Serraj, R Sinclair, 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions. *Plant, Cell and Environment*. 25:333-341

- Sheen, J. 1996. Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* 274, 1900–1902
- Schüller H.J. 2003. Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 43, 139–160.
- Taiz, L., Zeiger.,1991. Water balance of the plant. Pages 97 - 98. In *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Redwood City, California.
- Tardieu, F., 1997. Drought perception by plants. Do cells of drought plants experience water stress? In 'Drought tolerance in higher plants. Genetical, physiological and molecular biological analysis' (Belhassen E. Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Pp. 15-26
- Turner, N.C., 1986. Adaptation to Water Deficits: a Changing Perspective. *Australian Journal of Plant Physiology* 13,175 – 190
- Turner, N.C. 1988. Measurement of plant water status by the pressure chamber technique. *Irrig. Sci.* 9,289-308.
- Westgate, M.E., M.E. Otegui, and F.H. Andrade. 2004. Physiology of the corn plant in *Corn: Origin, History, Technology, and Production*, C.W. Smith, J. Betran and E.C.A. Runge, (eds.) John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey.
- Wang, Yu. Bräutigam, A., Weber, A.P., y Xin-Guang Z. 2014. Three distinct biochemical subtypes of C4 photosynthesis? A modelling analysis. *Journal of Experimental Botany*.

Yancey, P.H., 2005 Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol.* 208:2819-2830

Young-Hee, C., Sang-Yoo., Sheen, J., 2006. Regulatory Functions of Nuclear Hexokinase1 Complex in Glucose Signaling. *Cell.*

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de investigación se realizó en los invernaderos del Colegio de Postgraduados y en el laboratorio de Bioquímica del Postgrado en Botánica.

2.1 Características del material vegetal

Se utilizaron dos variedades de maíz: VS-22, variedad sintética obtenida por el INIFAP, mediante selección a condiciones ambientales en donde el agua fue la limitante principal y AMCCG-2, híbrido de doble cruza desarrollado en el Colegio de Postgraduados, para calidad de grano en procesos industriales (nixtamalización), por lo que se presume que no posee tolerancia a condiciones de déficit de agua. Ambas variedades son recomendadas para los Valles altos del Centro de México (Puebla, Tlaxcala, Veracruz, México e Hidalgo). Son de ciclo intermedio (150 d), tienen índice alto de cosecha y muestran tolerancia a algunas enfermedades virales (Aguiles Carballo, 2013, comunicación personal).

2.2 Tratamientos y mediciones

2.2.1 Experimento I: Crecimiento de radículas de maíz con déficit de agua, en charolas germinadoras y en condiciones de oscuridad

Se utilizó como sustrato vermiculita grado 1, lavada con abundante agua y se secó en una estufa a 115°C por 72 h. posteriormente se pesaron 100 g de vermiculita que se colocaron en bolsas de plástico a las que se le agregó 10, 12.5 y 100 mL de agua destilada, se sellaron y se incubaron por 48 h para homogenizar el contenido de humedad. Transcurrido este tiempo se determinó el potencial de agua (Ψ_A) de la vermiculita para cada uno de los volúmenes de

agua adicionado, incubando una muestra de éstas en cámaras psicrométricas (Wescor C-52 Inc Utha, USA) por 4 h, y conectadas a un microvoltímetro de punto de rocío (Wescor HR-33T Inc Utha, USA). Los valores de Ψ_A fueron -1.5, -1.0 y -0.03 MPa, respectivamente.

Se seleccionaron semillas de forma y tamaño homogéneo que se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial (Clorox) al 10%, durante 15 min. Las semillas fueron germinadas en charolas con una cama de algodón y con una inclinación de 35° por 48 h, a una temperatura de 25±1 °C y en condiciones de oscuridad (Ellis *et al.*, 1985), este fue un tiempo suficiente para que la radícula principal alcanzará un longitud de 35 a 40 mm en promedio. En ese momento, la radícula de cada plántula se marcó con tinta china a 2.0 mm desde el ápice. Posteriormente las plántulas fueron trasplantadas en tubos de polivinilo (PVC) de 40 mm de diámetro interno y 100 mm de longitud, contenían vermiculita grado 1, las plántulas fueron sometidas a tres potenciales de agua (Ψ_A); -0.03 MPa (testigo), -1.0 (déficit de agua intermedio) y -1.5 (déficit de agua severo). Cada tubo fue sellado en sus extremos con polietileno negro y atado con una banda elástica, con el fin de mantener constante el Ψ_A de la vermiculita; se mantuvieron en crecimiento por 24, 48 y 72 h en la oscuridad a una temperatura de 25 ± 1 °C.

Transcurrido el tiempo correspondiente se desarmó el sistema de tubos PVC y las radículas fueron recolectadas, y se cuantificó el desplazamiento de los segmentos a partir de 2 mm marcados previamente. Los segmentos se colectaron y se almacenaron a -36 °C para estudios posteriores. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial de tratamientos, en el que los factores y los niveles fueron: las variedades (VS-22

y AMCCG-2), los potenciales (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa), y el tiempo de crecimiento (24, 48, 72 h). Las unidades experimentales fueron grupos de 6 plántulas con 10 repeticiones de dos experimentos independientes. Se realizaron análisis estadísticos en SAS (versión 9.0) y una comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

2.2.2. Experimento II: Crecimiento de plantas de maíz con déficit de agua, en condiciones de invernadero

El experimento se estableció en los invernaderos del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, México (19° 29'N y 98° 45' O, 2250 msnm) durante el período de verano 2012, con una temperatura de 25 y 16 °C (día/noche) y una humedad relativa de 56 y 76% (día/noche). Se usaron semillas de dos variedades de maíz con diferencias en su nivel de tolerancia a la sequía. VS-22 como tolerante a sequía, tiene un patrimonio genético de 25 líneas recombinadas a partir de Michoacan 21 y ha sido probada en condiciones de sequía a nivel de campo, y AMCCG-2 considerada como susceptible debido a que fue desarrollada bajo condiciones de riego. Las semillas fueron lavadas con agua y esterilizadas en una solución de hipoclorito de sodio (15% v/v), posteriormente se germinaron en charolas de plástico por 72 h a 25°C, y las plántulas fueron trasplantadas en macetas de plástico de 4L de capacidad; el sustrato fue una mezcla esterilizada de suelo de hojarasca y peat moss en una proporción (2:1). Después del trasplante (una planta por maceta) las macetas se mantuvieron cercanas a capacidad de campo (CC), y fueron cubiertas con plástico sujetado con bandas elásticas para evitar la pérdida de agua por evaporación. A los seis días después de la emergencia (DDE) se iniciaron los tratamientos de suspensión de agua. Se aplicaron dos

tratamientos de humedad: las plantas testigo estuvieron en riego constante y cercano a CC del sustrato. Las plantas con el tratamiento de déficit de agua consistieron en la adición del 50 % de agua utilizada por la planta durante las mediciones, con base en el peso total de la maceta. El régimen de riego se aplicó tres veces por semana, durante siete semanas. La distribución de las macetas fue al azar cada vez que se aplicó el riego.

2.3. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos, en los que los factores y los niveles fueron: las variedades (VS-22 y AMCCG-2) y el Ψ_A del sustrato. Para el caso de las hojas fue el mismo diseño sólo con dos tratamientos riego y sequía, las unidades experimentales fueron grupos de 10 plantas de maíz y con 10 réplicas dando un total de 40 plantas por tratamiento. Se realizaron análisis estadísticos en SAS (versión 9.0) y una comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

2.4. Contenido relativo de agua (CRA)

Se determinó el CRA de las radículas (capítulo 3) o de la 6ª hoja (capítulo 4) de maíz (según fuera el caso), Se tomaron muestras de 60 radículas de plántulas y/o una fracción de muestra de 10 hojas de maíz por cada repetición e inmediatamente se determinó el peso fresco (PF), se sumergieron en agua destilada aproximadamente por 24 h y se obtuvo el peso túrgido (PT). Las muestras se colocaron en estufa por 72 h a 70 °C hasta alcanzar un peso

constante y se determinó el peso seco (PS). Con estos datos se calculó el CRA de acuerdo a Kramer (2003).

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

2.5 Potencial de agua (Ψ_A), osmótico (Ψ_O) y de turgencia (Ψ_T)

En el experimento 1 se cortaron pequeñas secciones de radícula del desplazamiento de los 2 mm marcados. En el experimento II se hizo un extracto de hoja de maíz. Estas secciones de radícula o de extracto de hoja se colocaron en cámaras psicrométricas (Wescor C-52 Inc, Utha, USA) y se incubaron por 3 h. Transcurrido el tiempo se determinó el Ψ_A . El potencial osmótico (Ψ_O) se determinó en las mismas muestras de tejido, después de haber sido congeladas en nitrógeno líquido, e incubados nuevamente en las cámaras psicrométricas. El potencial de turgencia (Ψ_T) se calculó de la diferencia entre el Ψ_A y Ψ_O .

El Ψ_O del segmento de hoja de maíz se puso en jeringas estériles y se le extrajo la savia, posteriormente se colocaron 10 μL en un osmómetro de punto de congelación modelo Wescor C-52 Inc, Utha, USA y el cálculo fue de acuerdo a la ecuación:

$$\Psi_O = -CRT$$

Donde C es la concentración de solutos en milliosmols, R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta del tejido, ($^{\circ}\text{K}$).

2.6. Extracción y determinación de azúcares

Para la determinación de los diferentes solutos en la elongación de la radícula elongada o en la 6ª hoja de maíz, se realizó el protocolo siguiente:

Los azúcares se extrajeron con 4 a 6 incubaciones sucesivas de 10 minutos con etanol al 80% a 70 °C, y las determinaciones se realizaron de acuerdo al método de Scholes *et al.* (1996). Los extractos se evaporaron en estufa de aire forzado a 50 °C, se disolvieron en 1 mL de agua destilada, se colocaron en tubos eppendorf y se mantuvieron a -36 °C. Las determinaciones de glucosa, fructosa y sacarosa se realizaron enzimáticamente por la adición secuencial de hexocinasa, fosfoglucoisomerasa e invertasa. Las absorbancias se obtuvieron en un espectrofotómetro lector de micro-placas (Multiskan Ascent, Labsystem, Thermo). Los cálculos se realizaron utilizando curvas estándares de calibración, preparadas previamente para cada uno de los azúcares y se expresaron en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de PF.

2.6.1 Obtención de la curva estándar de calibración de glucosa, fructosa y sacarosa:

Se pesaron 15 mg de cada uno de los azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa), los cuales se disolvieron en 6 mL de agua destilada para obtener una solución con una concentración de $2.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A partir de esta solución se realizaron diluciones de 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/60, 1/70, 1/90, 1/100, y por último el blanco sin azúcar (solo agua destilada). De estas diluciones se tomaron 10 μL de cada uno y se depositaron en los pozos de microplacas, la mezcla para la curva estándar de calibración y las muestras, por pozo se utilizaron 200 μL de HEPES 100 mM pH 7.5 (Roche), 10 μL NAD 40 mM (Sigma), 10 μL ATP 100 mM pH 7.0 (Sigma) y 10 μL glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0.05 U por 1 μL de amortiguador HEPES (Roche) para la determinación de

glucosa, se agregaron 10 μL de la enzima hexoquinasa (0.05 U por 1 μL de amortiguador) y se dejó actuar durante 20 minutos, posteriormente se tomó la lectura a una longitud de onda de 340 nm. Para la fructosa, se le agregaron 10 μL de PPGI (fosfoglucosa isomerasa) 0.06 U por 1 μL de amortiguador en el caso de sacarosa, se agregaron 10 μL de la enzima invertasa (0.8 U por 1 μL de amortiguador) se deja actuar durante 20 minutos y después se toma la lectura del espectrofotómetro lector de microplacas (Multiskan Ascent, Labsystem, marca Thermo, USA).

2.7 Determinación de azúcares totales

2.7.1 Método Antrona

Se pesaron 12.5 mg de glucosa y se disolvieron en 5 mL de agua (o 25 mg en 10 mL) para tener una concentración de 2.5 mg mL⁻¹ o 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esta solución se utilizó para obtener la curva de calibración para determinar azúcares totales.

Las extracciones de azúcares de VS-22 y AMCCG-2, se realizó de acuerdo a Montreuil 1997. Se colocaron 300 μL de cada solución estándar o muestra en tubos de ensaye, y en otro tubo se agregó 300 μL de agua (tubo blanco). A todos los tubos se les agregaron 3 mL de la solución de antrona fría y se mezclaron durante 5 minutos en hielo, posteriormente los tubos se transfirieron a un baño de agua a 100°C durante 10 minutos, para detener la reacción los tubos, se colocaron nuevamente en hielo (10 minutos), y por último se midió la absorbancia de cada tubo a 625 nm. Para calcular concentración de azúcares totales de cada uno de las muestras problema se utilizó la curva de calibración elaborada previamente.

2.8. Determinación de Trehalosa

La cuantificación de trehalosa se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito por Avonce *et al.* (2006). Se pesaron 200 mg de radícula congelada o de muestra de hoja congelada en nitrógeno líquido y se pulverizaron en un mortero, la muestras se re-suspendieron en un 1 mL de agua grado HPLC y se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 mL, las muestras se incubaron a 95 °C en un baño seco y se centrifugaron a 14000 rpm por 5 min. Posteriormente, las muestras se desionizaron en una columna de 1 mL, preparada con resinas catiónicas y aniónicas y se filtraron en filtros millipore de 0.22 µm, (Figura 1). Una vez colectada la muestra, se guardó a -20°C.

Las muestras se inyectaron en un HPLC (Waters) con un controlador 600, un detector de índice de refracción 2414 y un autosampler 717 (inyector automático). Se utilizó una columna supelcosil LC-NH₂ de 25 cm x 4.6 mm. Como fase móvil se usó acetonitrilo-agua (75:25) a un flujo de 1 mL min

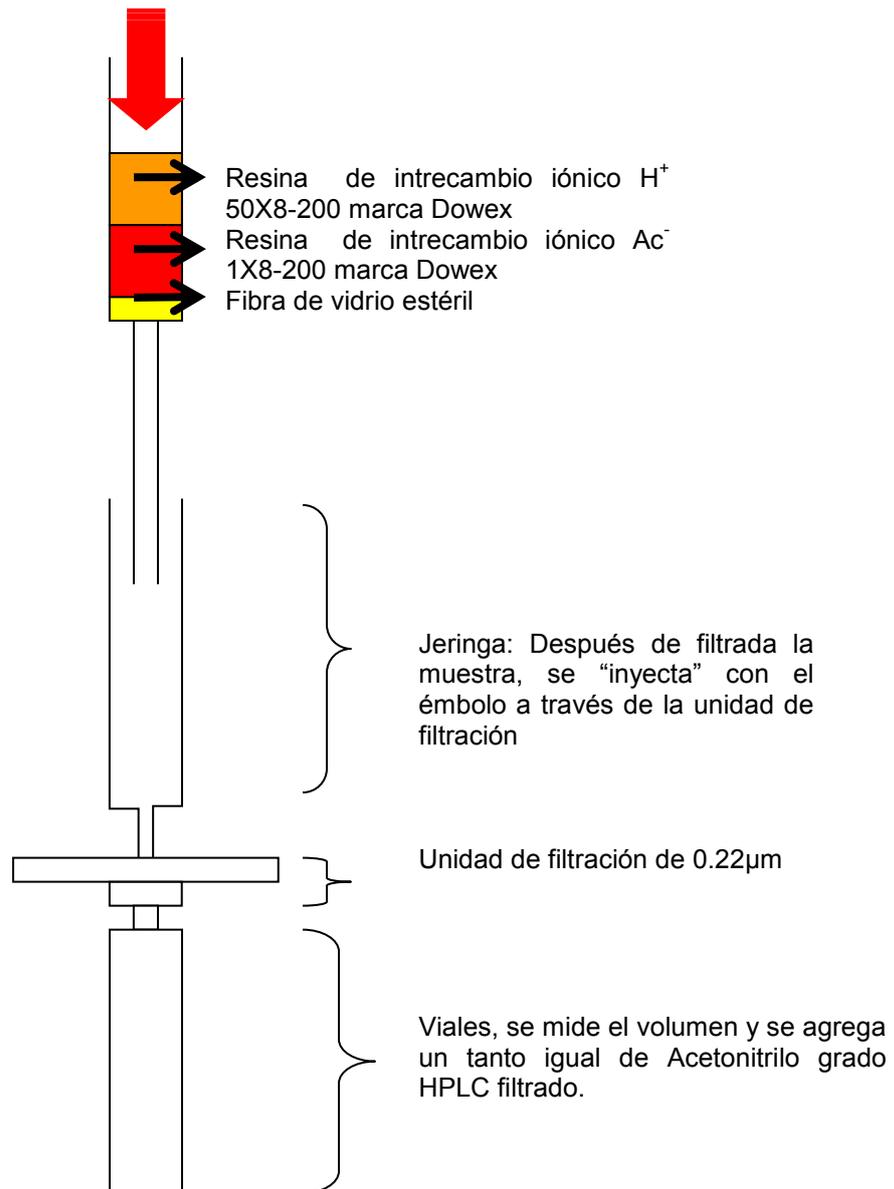


Figura 1. Resume el proceso de preparación de la columna para desionizar las muestras para la determinación de trehalosa.

2.9 Determinación de almidón

Extracción de almidón

Una vez extraídos los azúcares solubles de radículas y hojas, cada uno de los residuos sólidos se congelaron y posteriormente se utilizaron para la determinación del contenido de almidón a través de la medición de glucosa. Se pesaron 200 mg de residuos sólidos y se molieron por separado en un mortero con nitrógeno líquido, se le adicionó 1 mL (1000 μ L) de agua destilada y se colocó en tubos eppendorf con tapa de doble seguridad, los cuales se metieron a la autoclave durante 30 minutos a una temperatura de 121 °C; para la digestión del almidón se tomó una alícuota de 100 μ L de la muestra, a la que se le adicionó 100 μ L del amortiguador MES 500 mM con pH 4.5 (Sigma), 50 μ L de α -amilasa (0.5 U de α -amilasa Sigma), por 1 μ L de amortiguador MES y 50 μ L de amilogucósidasas, y se incubaron a 37°C por 5 h.

El almidón se cuantificó a través de la medición de glucosa como sustrato, en un espectrofotómetro marca (Jenway 6305) con una absorbancia de 340 nm. Por cada muestra se utilizaron 400 μ L de Hepes 100mM pH 7.5 (Roche), 40 μ L NAD 40 mM (Sigma), 40 μ L ATP 100 mM pH 7.0 (Sigma) y 40 μ L glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0.05 U por 1 μ L de amortiguador Hepes (Roche), 40 μ L de la dilución de la muestra y finalmente se agregaron 10 μ L de la enzima hexoquinasa 0.05 U por 1 μ L de amortiguador Hepes (Roche) se dejó que la enzima actuara durante 20 minutos y se tomó la lectura.

2.10 Determinación de prolina

El contenido de prolina fue evaluado con el método colorimétrico descrito por Bates *et al.* (1973), este método se fundamenta en la reacción de la ninhidrina con la prolina.

2.10.1 Extracción de prolina

Las determinaciones de prolina se hicieron utilizando 50 mg de material vegetal de cada de una de las muestras:

Las radículas de maíz (50 mg) o de hoja (50 mg) se trituraron, se mezclaron con ninhidrina ácida, sulfosalisilico al 3% y ácido acético glacial en una proporción

1:1:1 (v/v).

- El tejido vegetal se molió con 5 mL de ácido sulfosalisilico al 3%, y se filtra con papel Whatman N.4 (se embebe el papel con 1 mL de la solución ácido sulfosalisico).
- Se tomaron 2 mL de muestra y se colocaron en tubos de ensaye agregándoles 2mL de ninhidrina ácida y 2 mL de ácido acético glacial. El blanco lleva lo mismo en lugar de muestra, se adiciona agua destilada. Cada tubo se agitó en un vortex hasta que se obtuvo una emulsión.
- Los tubos se cubrieron con unas canicas y se colocaron en una gradilla a baño maría a ebullición durante 1 hora. Los tubos se sacaron y sumergieron en agua fría hasta que las muestras se enfriaron completamente (10 minutos), posteriormente se le agregaron 4 mLde tolueno y se agitaron en el vortex. Se tomó la fase superior de color rojo que se formó después de la agitación y se pasó a un tubo de ensaye y se procedió a dar lectura con una absorbancia de 520 nm en un espectro de UV/visible utilizando una curva de calibración L-prolina (Sigma)

- La concentración de prolina en el tejido se calculó con una curva de calibración de este aminoácido en una concentración máxima de 1000 nmoles.

2.11 Determinación y extracción de proteínas

El contenido de proteínas solubles se determinó en la 6a hoja de dos variedades de maíz VS-22 y AMCCG-2. Se pesaron 300 mg de radícula y de hojas de maíz las muestras se trituraron adicionando 3 volúmenes de 300 μ l de amortiguador de extracción (40 mM Tris H-Cl, pH=8.5, 1 mM Fluoruro de fenil sulfonil y 15 mM de β -mercaptoetanol) .Esta mezcla se centrifugó a 12,000g a 4°C por 10', después se tomó el sobrenadante, y de ahí se realizó la determinación de proteínas solubles usando el método de Bradford (1976).

La cuantificación de proteínas se realizó con base a una curva patrón de albúmina sérica bovina, se pesaron 10 gramos de este reactivo y se disolvieron en 5 mL de agua destilada con esto tenemos una solución stock de 2mg/mL.

2.11.1 Separación de proteínas en condiciones desnaturalizantes

La electroforesis en geles de poliacrilamida es uno de los métodos más utilizados para la purificación, análisis y caracterización de proteínas. La técnica permite separar moléculas cargadas y hay diferencias en movilidad en cuanto se les somete a la acción de un campo eléctrico.

En esta investigación se prepararon minigeles de SDS-PAGE de 1mm de grosor, y se separaron proteínas de radículas y de hojas de maíz en condiciones desnaturalizantes, con una unidad de electroforesis PROTEAN II (Diagnocell). El gel fue de tipo discontinuo, con un gel concentrador al 4% y un gel separador al 12% Laemli (1970). Se cargaron en cada carril del gel 20 μ g

de proteína de radícula y de hoja de las variedades de maíz VS-22 y AMCCG-2, también se preparó y separó en el gel la proteína (estándar) de RUBISCO purificada de espinaca (0.5 µg en 20µL Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y un kit de proteínas (preteñido) marcadoras de pesos moleculares conocidos. Para cargar las muestras en los carriles se les adicionó un volumen variable de mezcla de corrida (SDS 1 %, β-mercaptoetanol 1%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.05%), de tal manera que el volumen final no excediera a 40µl. La separación de proteínas se realizó a 95 V por 4 h en un buffer de electroforesis. Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se visualizaron en el gel mediante el método de tinción azul coomassie.

2.11.2 Determinación del peso molecular

Para la determinación del PM se requiere la obtención de la movilidad relativa (Rm) del kit de proteínas marcadoras con pesos moleculares conocidos y que fueron separadas simultáneamente con las diferentes muestras de proteínas solubles sujetas a electroforesis en gel.

$$Rm = \frac{\text{Distancia recorrida de una determinada proteína desde el origen del gel}}{\text{Longitud total del gel o frente del colorante}}$$

El Rm de las proteínas de PM conocido se grafica vs el log₁₀ de cada PM específico para cada proteína marcadora, y se obtiene una ecuación por regresión lineal.

La determinación de los PM de las proteínas de las muestras se realiza por comparación de la movilidad relativa de estas proteínas vs proteínas marcadoras de PM conocido, o bien por sustitución de los valores de Rm de las proteínas desconocidas en la ecuación de regresión lineal obtenida con las proteínas marcadoras.

2.11.3 Inmunodetección de RUBISCO

Los geles con las proteínas separadas sin teñir fueron transferidos a membranas de nylon cargadas positivamente de 0.2 μm (Mini Trans-Blots), con una fuente de poder a 250 mA por 2h, y en un buffer de transferencia (25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina y 20% de metanol V/V) (Towbin *et al.*, 1979). Posteriormente el blot se secó al aire por 20 veinte minutos y se almacenó en una bolsa ziplock a -20°C hasta la inmunodetección de la proteína RUBISCO.

Para la inmunodetección de RUBISCO el blot se colocó en una charola con solución de bloqueo (5 % de leche desengrasada (Sveltis) en 248 mM de Tris pH 7.4; 150 mM de NaCl y 0.5% de Tween 20) por dos horas en agitación suave y constante, después se realizaron 3 minilavados de 8 minutos cada uno con TBS-T, después de los lavados la membrana se incubo por dos horas con el primer anticuerpo (anti-Rubisco subunidad grande) diluido 1/4500 (Abcam) en TBS-T a temperatura ambiente, posteriormente, se realizaron 4 minilavados de 8 minutos con TBS-T, la membrana fue incubada con el segundo anticuerpo policlonal acoplado a peroxidasa (diluido 1/10,000 Abcam) por dos horas a temperatura ambiente en agitación suave, e inmediatamente después se realizaron 4 minilavados de 8 minutos. El procedimiento para el revelado de la RUBISCO de maíz en la membrana de nylon se realizó por Diaminobencidina (DAM Sigma) 1mg/10mLde PBS 20mM en presencia de peróxido de hidrógeno al 30%, por 7 minutos. Una vez reveladas las bandas se precipitaron, se enjuagó tres veces con agua destilada por 5 minutos en agitación suave y en oscuridad.

Para el análisis de la bandas de las proteínas inmunodetectadas, los blots se escanearon y se almacenaron como archivos electrónicos. El patrón de la

masa molecular, RUBISCO y el estándar de RUBISCO (Sigma) se determinaron utilizando la herramienta de medición de densidad en Imagen J (Imagine 1.34s; <http://rsbni.gov/ij>). Los efectos de los tratamientos de sequía versus riego fueron analizados comparando las densidades con su testigo respectivo. Los SDS-PAGE y análisis de los blots se repitieron tres veces. Se realizó un análisis estadístico de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

LITERATURA CITADA

- Verslues, P.E., Ober, S., Sharp, R.E., 1998. Root growth and oxygen relations at low water potentials. Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions. *Plant Physiol.* 116, 1403–1412.
- Avonce, N., Mendoza-Vargas, A., Moret, E., Iturriaga, G., 2006. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evol. Biol.* 6-109.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39, 205–207.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.*, 72, 248-254.
- Ellis, R.H., Hong, T.D. Roberts, E.H., 1985. Handbook of Seed Technology for Genebanks Volume II. Compendium of Specific Germination Information and Test Recommendations. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, pp. 221-237.
- Kramer, P.J., Boyer, S., 2003. Water Relation of Plants and Soils. Academic Press, Orlando, FL. Pp. 529.

- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 22, 680-685
- Montreuil, J., Vliegthart, J., 1997. *Glycoproteins*. Ed. Elsevier Science. Pp.572.
- Scholes, J., Bundock, N., Wilde, R., Rolfe, S., 1996. The impact of reduced vacuolar invertase activity on the photosynthetic and carbohydrate metabolism of tomato. *Planta* 200, 265-272.
- Towbin, H. Staehel, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76,4350-4354.

CAPÍTULO 3

EFFECTO DEL ESTRÉ HÍDRICO EN LA ELONGACIÓN DE LA RADÍCULA Y EN LA ACUMULACION DE SOLUTOS EN *Zea mays* L.

ABSTRACT

In this work we studied the effects of water deficit on the elongation of root tips of maize seedlings and the solutes accumulation in the varieties VS-22 (tolerant) and AMCCG-2 (susceptible). Three-millimeter long primary roots were labeled with black ink in the first two mm and their growth was continued for 24, 48 and 72 h in PVC tubes filled with vermiculite at three different water potentials (Ψ_w , -0.03, -1.0 and -1.5 MPa). Root elongation, different sugar and proline accumulation were determined after the incubation period. The Ψ_w of the substrate affected the dynamics of the primary root elongation in both varieties, in particular at the lower Ψ_w (-1.5 MPa), inhibiting root growth 70 % for VS-22 and 90% for AMCCG-2. Osmotic potential (Ψ_o) was reduced substantially in both varieties maintaining root tissue turgor; however, VS-22 had the highest turgor (0.67 MPa) compared to 0.2 MPa registered in AMCCG-2. These results suggest a capacity of osmotic adjustment in both varieties. The presence of sugars accumulation was evidenced from the first 24 h of radicle growth. Their concentration was higher for VS-22 compared with AMCCG-2 and the lower the Ψ_w , the higher the sugar accumulation. The presence of trehalosa was evidenced, showing significant accumulation differences, with values of 89.9 $\mu\text{g/mL}$ PF and 28.6 $\mu\text{g/mL}$ PF in VS-22 and AMCCG-2, respectively. Starch accumulation also showed significant differences between the primary roots of these two maize varieties, with a lower level in VS-22. The proline concentration also increased as the severity of water deficit was higher in both varieties. At 72 h the amount of proline in VS-22 was almost two-fold higher (16.2 $\mu\text{moles g}^{-1}$) than in AMCCG-2 (5.19 $\mu\text{moles g}^{-1}$). The accumulation of solutes in the primary root growth zone may be an indicator of osmotic adjustment, to maintain turgor and therefore the growth of seedlings.

3.1. INTRODUCCION

El déficit hídrico afecta el crecimiento vegetativo de los cultivos y puede reducir su productividad hasta 70% (Boyer, 1982; Edmeades, 1993; Jensen, 1995;). Sin embargo, cuando las plantas perciben déficit hídrico se activan mecanismos de adaptación a nivel fisiológico, metabólico y genético (Chaves, 2004). Entre las principales adaptaciones se encuentran el mantenimiento de la turgencia celular, cambios en la fluidez y modificación de la membrana, reducción de la actividad fotosintética, cambios en el metabolismo del carbono y en la acumulación de solutos (Chaves *et al.*, 2004). Dependiendo de la capacidad adaptativa que tenga la especie para tolerar sequía será la magnitud del cambio en las adaptaciones mencionadas (Atikson *et al.*, 2000; Baud *et al.*, 2004; Massonnet *et al.*, 2007).

En el cultivo de maíz se han seleccionado variedades que toleran condiciones moderadas de sequía, esta tolerancia es con base a la capacidad de realizar cambios fisiológicos y metabólicos (Skirycz *et al.*, 2010; Cramer, 2011). La raíz es el órgano primario sensor de déficit de agua en el suelo, y en plántulas de maíz se ha podido observar que el ápice de la raíz continúa creciendo aún en potenciales de agua del sustrato hasta de -1.6 MPa (Sharp y Davies, 1979; Westgate, 1985; Sharp y Hsiao, 1988), y esta es una característica de adaptación a condiciones limitantes de agua, la cual es crucial para la formación de la parte aérea de la planta (Sharp y Davies 1979; Westgate, 1985; Hsiao 2000; Mineo, 2010). Se ha observado en maíz que la zona de elongación de la radícula expuesta a condiciones de déficit de agua presenta capacidad de ajuste osmótico, con un incremento del 45% en la concentración de prolina (Sharp *et al.*, 1990; Voetberg y Sharp, 1991).

Aunque existen estudios fisiológicos en relación a la elongación de la radícula de plantas de maíz en condiciones de estrés hídrico, es muy importante continuar con la identificación y obtención de germoplasma de maíz que presente características fisiológicas y bioquímicas clave ante esta condición adversa. Se espera que los materiales considerados como tolerantes a sequía puedan tener una mejor eficiencia de uso de agua y acumulación de solutos, que les permita continuar creciendo ante el agobio de agua. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la disminución de humedad del sustrato en el crecimiento longitudinal de la radícula, y la acumulación de solutos, en dos variedades de maíz contrastantes en su respuesta al déficit hídrico VS-22 y AMCCG-2.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material Vegetal

Se utilizaron dos variedades de maíz: VS-22, material seleccionado para condiciones ambientales en donde el agua fue la limitante principal y AMCCG-2, material seleccionado para calidad de grano en procesos industriales (nixtamalización), por lo que se presume que no posee tolerancia a condiciones de déficit de agua.

Estado de México y recomendadas para los Valles altos del Centro de México (Puebla, Tlaxcala, Veracruz, México e Hidalgo). Son de ciclo intermedio (150 d), tienen índice alto de cosecha y muestran tolerancia a algunas enfermedades virales (Aguiles Carballo, 2013, comunicación personal).

3.2.2 Tratamientos y Mediciones

Se utilizó como sustrato vermiculita grado 1, lavada con abundante agua y se secó en una estufa a 115 °C por 72 h. Posteriormente se pesaron 100 g de vermiculita y se colocaron en bolsas de plástico y se les agregó 10, 12.5 y 100 mL de agua destilada, se sellaron y se incubaron por 48 h para homogenizar el contenido de humedad. Transcurrido este tiempo se determinó el potencial de agua (Ψ_A) de la vermiculita para cada uno de los volúmenes de agua adicionado, incubando una muestra de éstas en cámaras psicométricas (Wescor C-52 Inc, Utha, USA) por 4 h, y conectadas a un microvoltímetro de punto de rocío (Wescor HR-33T Inc, Utha, USA). Los valores de Ψ_A obtenidos fueron -1.5, -1.0 y -0.03 MPa, respectivamente.

Se seleccionaron semillas de forma y tamaño homogéneo y se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial (Clorox®) al 10 %, durante 15 min. Las semillas fueron germinadas en charolas con una cama de algodón y con una inclinación de 35° por 48 h, a una temperatura de 25 ± 1 °C y en condiciones de oscuridad (Ellis *et al.*, 1985), este fue un tiempo suficiente para que la radícula principal alcanzará una longitud de 35 a 40 mm en promedio. En ese momento, la radícula de cada plántula se marcó con tinta china a 2.0 mm desde el ápice. Posteriormente las plántulas fueron trasplantadas en tubos de cloruro de polivinilo (PVC) de 40 mm de diámetro interno y 100 mm de longitud, contenían vermiculita grado 1, las plántulas fueron sometidas a tres potenciales de agua (Ψ_A); -0.03 MPa (testigo), -1.0 (déficit de agua intermedio) y -1.5 MPa (déficit de agua severo). Cada tubo fue sellado en sus extremos con polietileno negro y ajustado con una banda elástica, con el fin de mantener constante (en lo posible) el Ψ_A de la vermiculita, y se mantuvieron en crecimiento por 24, 48 y 72 h en la oscuridad a una temperatura de 25 ± 1 °C.

Transcurrido el tiempo correspondiente se desarmó el sistema de tubos PVC y las radículas fueron recolectadas, y se cuantifico el desplazamiento de los segmentos de 2 mm marcados previamente. Los segmentos se colectaron y se almacenaron a -36 °C para estudios posteriores. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial de tratamientos, en el que los factores y los niveles fueron: las variedades (VS-22 y AMCCG-2), los potenciales (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa), y el tiempo de crecimiento (24, 48, 72 h). Las unidades experimentales fueron grupos de 6 plántulas con 10 repeticiones de dos experimentos independientes. Se realizaron análisis estadísticos en

SAS (versión 9.0) y una comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

3.2.3 Contenido relativo de agua (CRA)

Se determinó el CRA de las radículas en cada uno de los Ψ_A del sustrato. Se tomaron muestras de 60 radículas de plántulas de maíz por cada repetición e inmediatamente se determinó el peso fresco (PF), se sumergieron en agua destilada aproximadamente por 24 h y se obtuvo el peso túrgido (PT). Las muestras se colocaron en estufa por 72 h a 70 °C hasta alcanzar un peso constante y se determinó el peso seco (PS). Con estos datos se calculó el CRA de acuerdo a Kramer (2003).

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

3.2.4 Potencial de agua (Ψ_A), osmótico (Ψ_O) y de turgencia (Ψ_T) de la radícula

Se cortaron pequeñas secciones de radícula del desplazamiento de los 2 mm marcados. Estas secciones se colocaron en cámaras psicrométricas (Wescon C-52 Inc, Utha, USA) y se incubaron por 3 h. Transcurrido el tiempo se determinó el Ψ_A . El potencial osmótico (Ψ_O) se determinó en las mismas muestras de tejido, después de haber sido congeladas en nitrógeno líquido, e incubados nuevamente en las cámaras psicrométricas. El potencial de turgencia (Ψ_T) se calculó de la diferencia entre el Ψ_A y Ψ_O .

3.2.5 Determinación de solutos

Para la determinación de los diferentes solutos en la radícula, se utilizó también el desplazamiento de los 2 mm marcados desde el ápice de la radícula.

Los azúcares de los ápices (50mg) se extrajeron con 4 a 6 incubaciones sucesivas de 10 minutos con etanol al 80% a 70 °C, y las determinaciones se realizaron de acuerdo al método de Scholes et al. (1996). Los extractos se evaporaron a 50 °C, se disolvieron en 1 mL de agua destilada, se colocaron en tubos eppendorf y se mantuvieron a -38 °C. Las determinaciones de la glucosa, fructosa y sacarosa se realizaron enzimáticamente por la adición secuencial de hexocinasa, fosfoglucoisomerasa e invertasa. Las absorbancias se obtuvieron en un espectrofotómetro lector de micro-placas (Multiskan Ascent, Labsystem, Thermo). Los cálculos se realizaron utilizando curvas estándares de calibración, preparadas previamente para cada uno de los azúcares y se expresaron en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de PF.

3.2.6 Determinación de Trehalosa

La cuantificación de trehalosa se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito por Avonce *et al.*, (2006). Se pesaron 200 mg de radícula congelada en nitrógeno líquido y se pulverizaron en un mortero, las muestras se re-suspendieron en un 1 mL de agua grado HPLC y se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 mL, las muestras se incubaron a 95 °C en un baño seco y se centrifugaron a 14000 rpm por 5 min. Posteriormente, las muestras se desionizaron en una columna de 1 mL preparada con resinas catiónicas y aniónicas y se filtraron en filtros millipore de 0.22 μm . Las muestras se inyectaron en un HPLC (Waters) con un controlador 600, un detector de índice

de refracción 2414 y un autosampler 717 (inyector automático). Se utilizó una columna supelcosil LC-NH2 de 25 cm x 4.6 mm. Como Fase móvil se usó acetonitrilo-agua (75:25) a un flujo de 1 mL min⁻¹.

3.2.7. Determinación de prolina

El contenido de prolina fue evaluado con el método colorimétrico descrito por Bates *et al.* (1973), este método se fundamenta en la reacción de la ninhidrina con la prolina. Las radículas de maíz (50 mg) se trituraron, se mezclaron con ninhidrina ácida, ácido sulfosalicílico al 3% y ácido acético glacial en una proporción 1:1:1 (v/v). Las muestras se incubaron en baño maría a 100 °C por 1 h, la reacción se detuvo con hielo y el cromóforo se extrajo añadiendo 4 mL de tolueno. La concentración de prolina en el tejido se calculó utilizando una curva de calibración de este aminoácido, en una concentración máxima de 1000 nmols.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Longitud de la radícula (cm)

En la Figura 1 se observa que el sustrato con un Ψ_A de -0.03 MPa (testigo) y después de 72 h de incubación se obtuvo la elongación máxima de los 2 mm marcados desde el ápice de la radícula, los valores fueron de 12.4 y 12.1 cm en VS-22 y AMCCG-2, respectivamente. Conforme el Ψ_A del sustrato disminuyó a -1.0 y -1.5 MPa, la elongación de los ápices se redujo gradualmente hasta alcanzar 3.5 cm en VS-22 y 1.2 cm en AMCCG-2 a -1.5 MPa y después de 72 h de incubación. Fue interesante notar que no hubo inhibición completa en el crecimiento (Figura. 1 y Figura. 2) en las dos variedades de maíz estudiadas, y la reducción de la elongación fue más drástica para las radículas de la variedad AMCCG-2 (1.2 cm). Estos resultados mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en ambas variedades, y en función de los diferentes Ψ_A del sustrato.

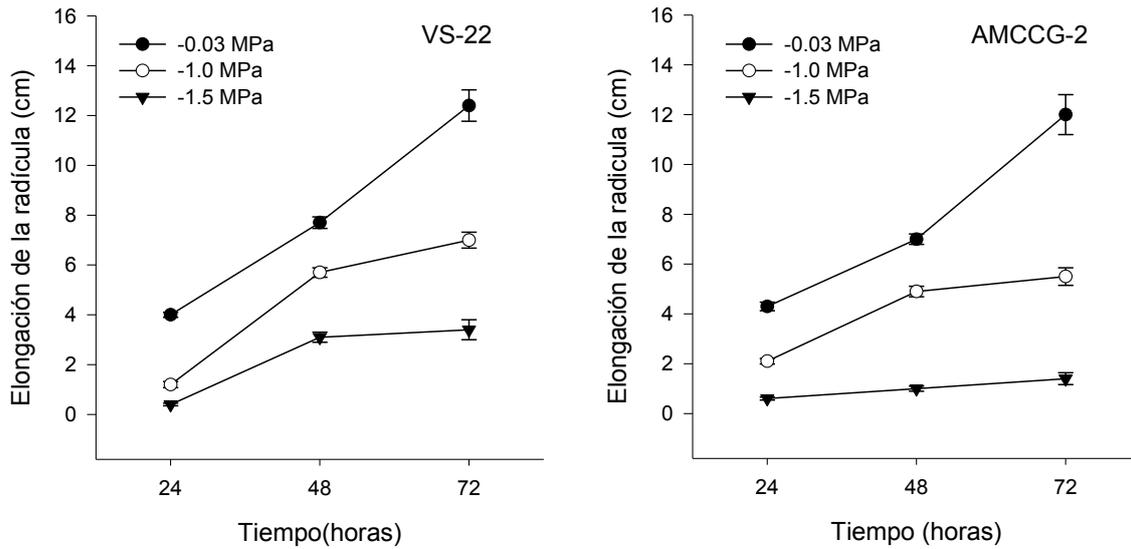


Figura 1. Elongación del ápice de la raíz de dos variedades de maíz crecidas en diferentes potenciales hídricos (Ψ_A) del sustrato (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa) y con diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h). Los puntos son el promedio \pm E.E. ($n = 10$).

El sustrato con Ψ_A de -1.5 MPa provocó una reducción en la elongación de la raíz del 70% para VS-22, mientras que para AMCCG-2 la afectación fue de un 90%, a las de 72 h de incubación. A pesar de la reducción en la elongación longitudinal del ápice de la raíz, se mantuvo el crecimiento de la misma (Figura 1 y Figura 2). Además, se observó que el ápice radicular mostró un aspecto delgado y sin crecimientos de raíces secundarias cuando fueron sometidas a -1.0 y -1.5 MPa (Figuras 2 A y B).

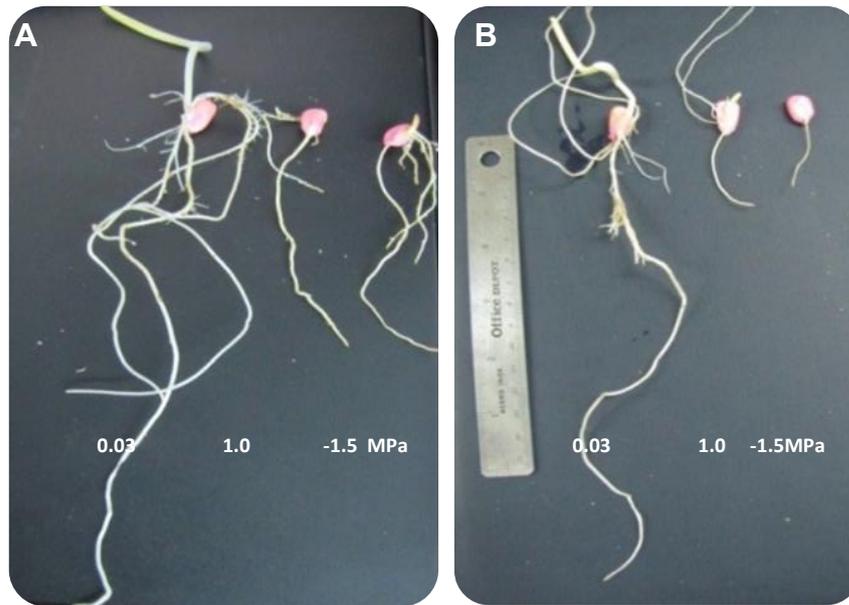


Figura 2. Elongación de la radícula de maíz (A) VS-22, (B) AMCCG-2 en diferentes potenciales hídricos (Ψ_A) del sustrato (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa) y con diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h).

3.3.2 CRA y Relaciones hídricas

En la Figura 3 se observa que el CRA mostró porcentajes de 95 y 90%, para VS-22 y AMCCG-2, respectivamente, con el Ψ_A -0.03 MPa; sin embargo, el Ψ_A de -1.5 MPa disminuyó el CRA hasta el 30 % para VS-22 y el 45% para AMCCG-2. Se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en las interacciones (Var* Ψ_A * tiempo).

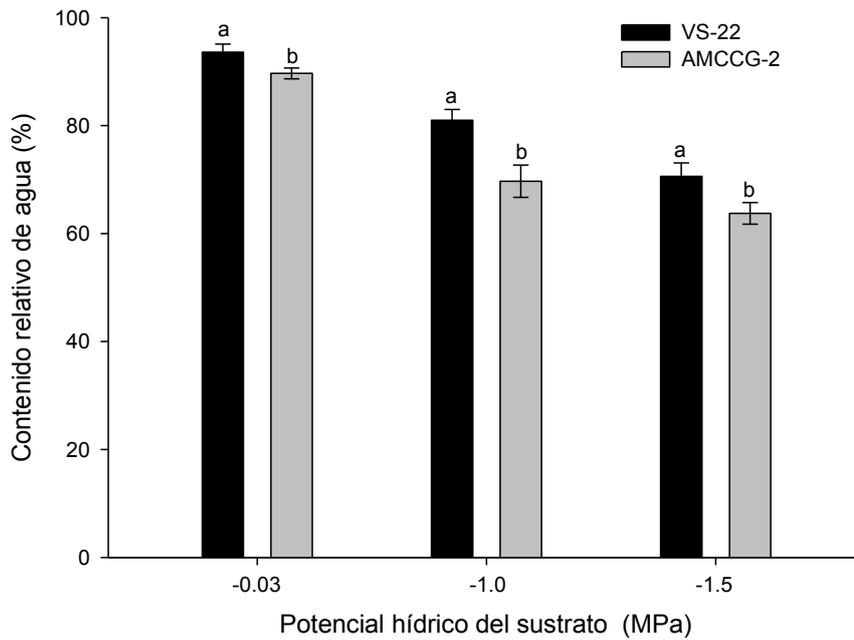


Figura 3. Contenido relativo de agua en radícula de dos variedades de maíz crecidas en tres potenciales de agua del sustrato (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa), y con diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$). Cada barra son el promedio \pm E.E ($n = 10$).

En las Figuras. 4 A, B y C se observó que cuando el Ψ_A del sustrato fue el más alto (-0.03 MPa) y después de 72 h de incubación los Ψ_A y de Ψ_o de los ápices de VS-22 fueron de -0.18 y -0.56 MPa, para AMCCG-2 fueron de -0.24, y de -0.78 MPa. A medida que el Ψ_A del sustrato disminuyó (-1.0 y -1.5 MPa) el Ψ_A y Ψ_o de los ápices se redujeron drásticamente, de tal manera que para el Ψ_A en el sustrato de -1.5 MPa VS-22 registró un Ψ_A en el tejido de -3.0 y un Ψ_o de -3.7 MPa, mientras que para AMCCG-2 el Ψ_A fue de -2.5 MPa y el de Ψ_o de -2.79 MPa.

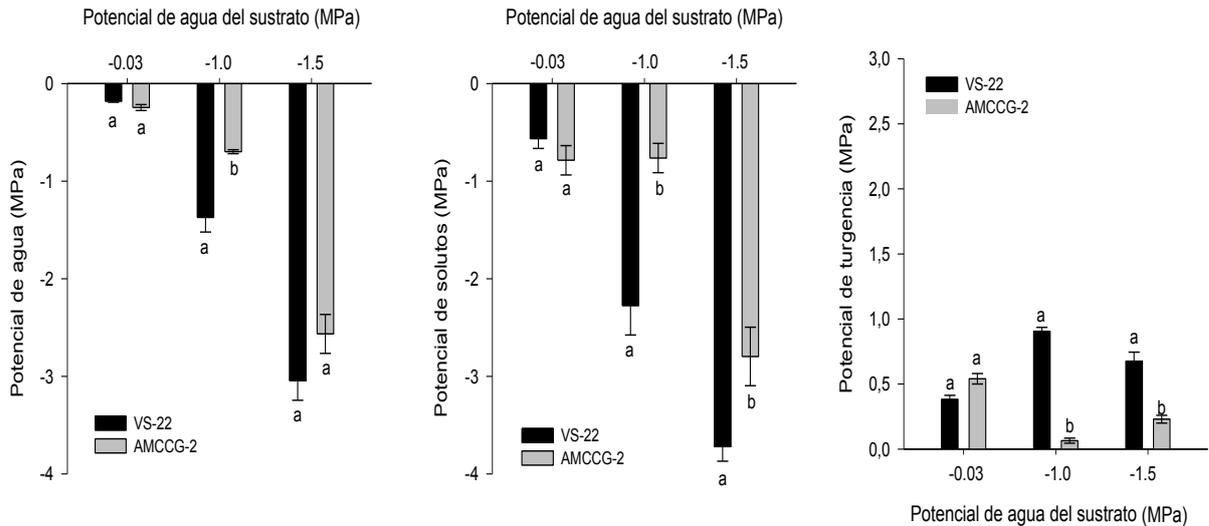


Figura 4. Potencial hídrico (A), potencial osmótico (B) y potencial de turgencia (C) de los ápices de las radículas en dos variedades de maíz, crecidas en diferentes potenciales de agua (Ψ_A) del sustrato (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa) y a las 72 de incubación. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey 0.05). Las barras son el promedio \pm E.E ($n = 10$).

Es importante observar que cuando el sustrato tuvo el Ψ_A -0.03 MPa, el potencial de turgencia (Ψ_T) fue estadísticamente similar en los dos materiales de maíz, sin embargo cuando el Ψ_A del sustrato disminuyó hasta valores de -1.5 MPa, la diferencia del mantenimiento en la turgencia entre los dos materiales de maíz, fue muy clara. La variedad VS-22 presentó los valores de turgencia promedio de 0.67 MPa, comparado con un valor de turgencia de 0.16 MPa para el material AMCCG-2 (Figura 4C).

3.3.3 Determinación y acumulación de solutos

Las Figuras 5A, 5B y 5C muestran que con un Ψ_A del sustrato de -0.03 MPa se detectó la presencia de glucosa, fructosa y sacarosa en los ápices de las radículas de las variedades de maíz VS-22 y AMCCG-2, después de 24, 48 y 72 h de incubación, la acumulación de estos solutos se incrementó

sustancialmente cuando la radícula fue sometida a Ψ_A de -1.0 y -1.5 MPa. Estos incrementos fueron más altos a medida que el Ψ_A del sustrato fue más severo hasta de -1.5 MPa, y después de 72 h de incubación. La acumulación de estos tres azúcares mostraron diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) a través del tiempo, y estas diferencias fueron más evidentes a las 72 h de incubación, con un déficit de agua más severo (-1.5 MPa).

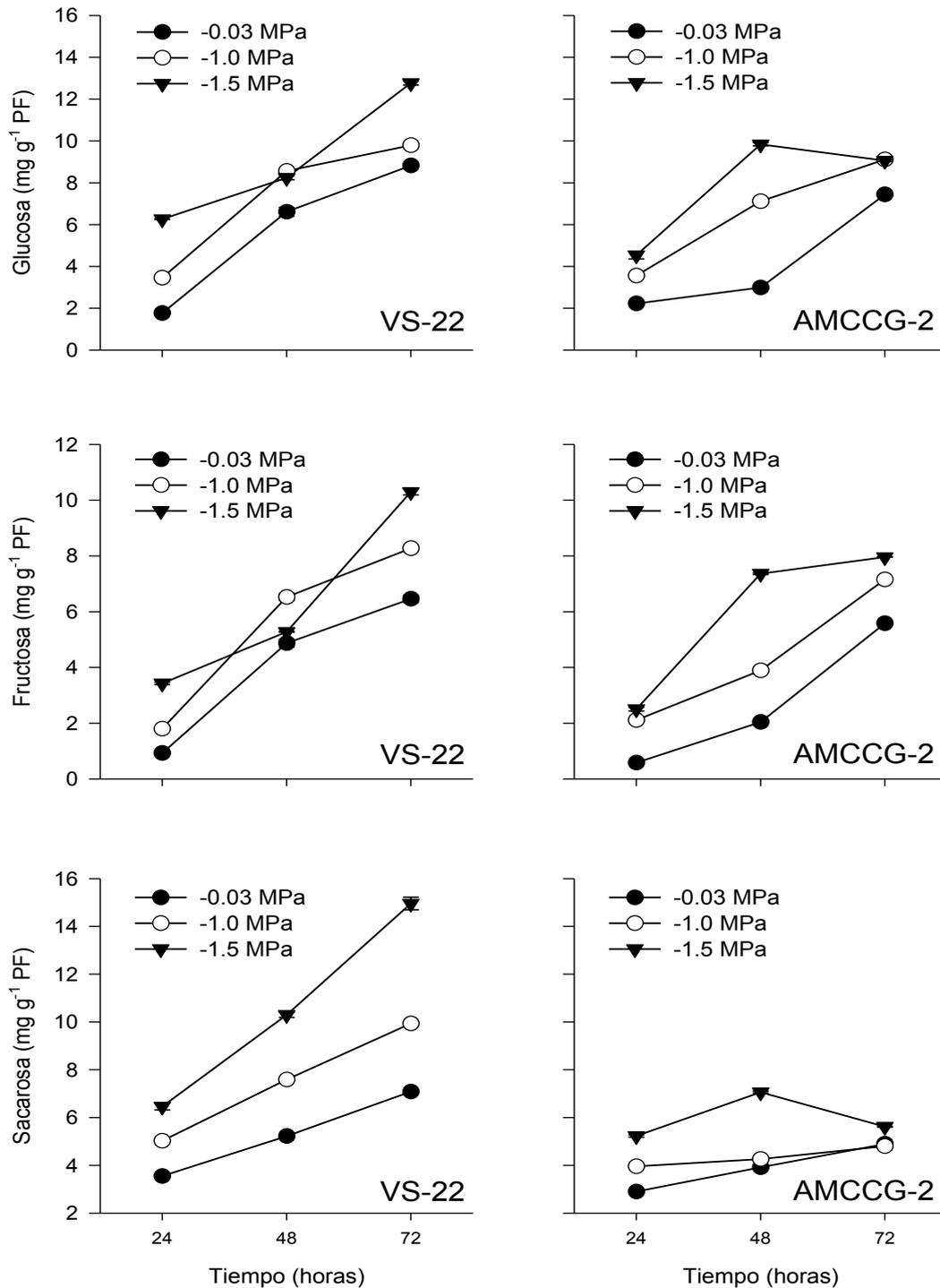


Figura 5. Acumulación de glucosa (A), fructosa (B) y sacarosa (C), ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PF}$) en los ápices de las radículas de dos variedades de maíz, crecidas en diferentes potenciales de agua (Ψ_A) del sustrato (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa) y con diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey 0.05). Cada punto son el promedio \pm E.E ($n=10$).

En general, se observó que después de 24 h de incubación los azúcares glucosa, fructosa y sacarosa fueron detectados y éstos se incrementaron linealmente cuando el déficit de agua del sustrato fue más severo (-1.5 MPa), y después de 72 h de incubación. En estas condiciones la variedad VS-22 presentó mayor acumulación de estos azúcares; glucosa ($14.9 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$), fructosa ($10.3 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$) y sacarosa ($15.8 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$), comparada con la variedad AMCCG-2, que mostró una acumulación menor en estos compuestos; para glucosa ($12.1 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$), fructosa ($7.3 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$) y sacarosa ($5.8 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$).

La acumulación notable de otro importante osmolito fue la trehalosa. En la Figura 6 se observó la ausencia total de este disacárido cuando el Ψ_A del sustrato fue de -0.03 MPa, en ambas variedades de maíz. La presencia de la trehalosa en el ápice de la radícula se evidenció cuando el Ψ_A del sustrato se redujo a -1.0 MPa, en particular, la variedad VS-22 fue la que registró la presencia mayor de trehalosa ($26.9 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ PF}$) desde las primeras 24 h de incubación y se incrementó sustancialmente a las 72 h, alcanzando valores de $89.9 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ PF}$, mientras que la variedad AMCGG-2 evidencio su presencia hasta las 48 h ($21 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ PF}$) de tratamiento y no mostró incrementos sustanciales a las 72 h ($28.6 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ PF}$).

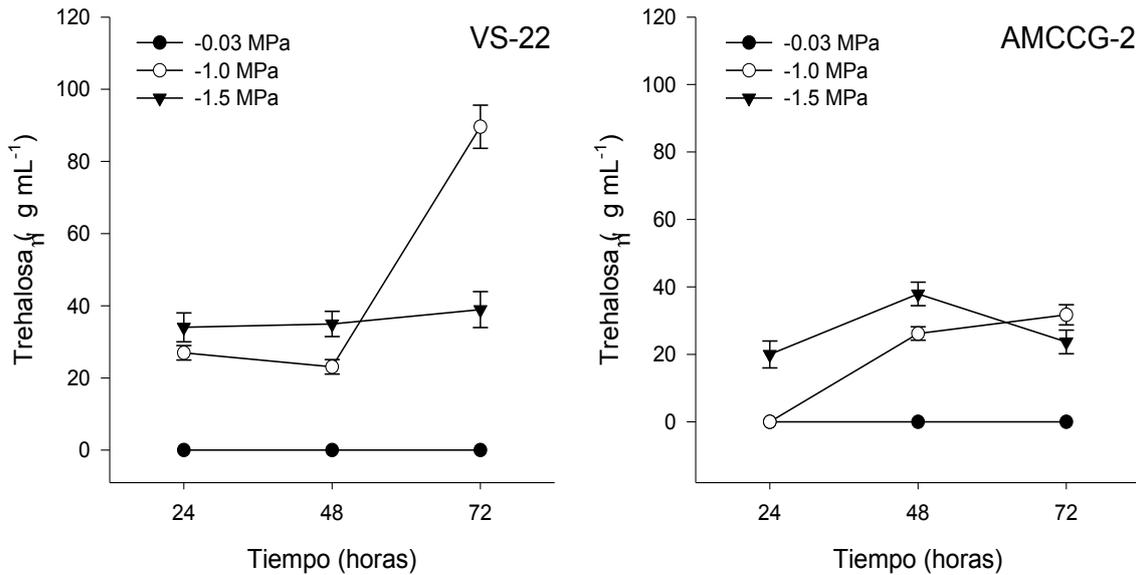


Figura 6. Acumulación de trehalosa ($\mu\text{g/mL}^{-1}$) en los ápices de las radículas en dos variedades de maíz, crecidas en diferentes potenciales de agua (Ψ_A) del sustrato (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa) y con diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey 0.05). Cada punto son el promedio \pm E.E ($n = 10$).

La Figura 7 Muestra la presencia de almidón en los ápices de la raíz de la variedad VS-22 y de la variedad AMCCG-2 cuando el potencial de agua del sustrato fue de -0.03 MPa y después de 24 h de incubación, y a medida que el tiempo de incubación avanzó hasta 72 h, se observó que la elongación del ápice aumentó y la acumulación de almidón disminuyó. Esta misma tendencia de disminución del almidón, aunque de manera más drástica se observó cuando el potencial de agua fue de -1.5 MPa, y a las 72 h de incubación, para ambas variedades de maíz.

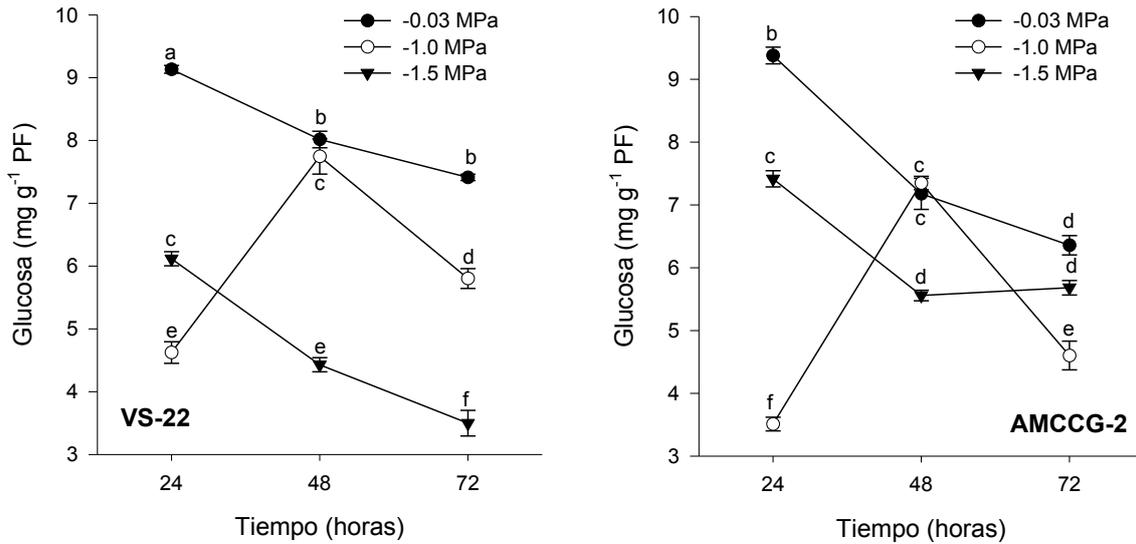


Figura 7. Concentración de almidón (mg g⁻¹ PF) en los ápices de las radículas en dos variedades de maíz, crecidas con diferentes potenciales de agua (Ψ_A) del sustrato (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa) y con diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey 0.05). Cada punto son el promedio \pm E.E. ($n=10$).

En el Ψ_A de -1.0 MPa a las 48 h se detectó un incremento del 70 % en la acumulación de almidón para VS-22, sin embargo, a las 72 h disminuyó significativamente posiblemente por el déficit hídrico más severo, mientras que en la variedad susceptible solo disminuyó un 30%.

3.3.4 Determinación de prolina

En el Cuadro 1, se observa la presencia de prolina en los ápices de la radícula en las dos variedades de maíz, en los diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h) y con un Ψ_A del sustrato de -0.03 MPa. Cuando el Ψ_A del sustrato se redujo a -1.5 MPa los valores en la acumulación de prolina se incrementaron notablemente. Esta acumulación fue más evidente en la variedad VS-22 a las 72 h de crecimiento, la prolina se incrementó hasta un 86 % comparado con los

valores observados con un Ψ_A de -0.03 MPa, mientras que el incremento de prolina para AMCCG-2 fue de solo cinco veces más (72 %). La proporción diferencial en la acumulación de este aminoácido entre variedades fue de 3:1 para VS-22 y AMCCG-2, respectivamente, a las 72 h. La concentración de prolina mostró diferencias significativas entre variedades, entre los diferentes Ψ_A (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa), así como, en los tiempos de muestreos evaluados (24, 48 y 72 h).

Cuadro 1. Acumulación de prolina ($\mu\text{mol g}^{-1}$ PF) de los ápices de las radículas en dos variedades de maíz, crecidas en diferentes potenciales de agua (Ψ_A) del sustrato (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa) y con diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey 0.05). Cada punto es el promedio \pm E.E ($n=10$).

		HORAS		
Variedades	Ψ_A (MPa)	24	48	72
VS-22	-0.03	0.09 c \pm 0.12	1.38d \pm 0.11	2.31 cd \pm 0.32
	-1.0	1.7 b \pm 0.16	3.67c \pm 0.26	4.40 bc \pm 0.27
	-1.5	6.17b \pm 0.80	7.30b \pm 0.36	16.2 a \pm 1.3
AMCCG-2	-0.03	0.76 c \pm 0.09	1.04 d \pm 0.1	1.32 d \pm 0.3
	-1.0	1.30 cd \pm 0.14	3.7c \pm 0.40	4.27 c \pm 0.37
	-1.5	0.54 c \pm 0.03	6.1b \pm 0.42	5.19 bc \pm 0.90

Medias \pm con distinta letra indican diferencias estadísticamente significativas entre columnas con $P < 0.05$. El E.E., $n = 10$.

3.4. DISCUSIÓN

3.4.1 Longitud de la radícula

Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron que el ápice de la radícula de maíz mantuvo su elongación continua por 72 h, aun en Ψ_A del sustrato de hasta -1.5 MPa. La reducción del Ψ_A en el sustrato provocó una disminución diferencial en el crecimiento longitudinal de la radícula entre las dos variedades de maíz, en la variedad VS-22 éste se redujo hasta el 70 % comparado con el Ψ_A de -0.03 MPa, mientras que en AMCCG-2 la reducción del crecimiento longitudinal alcanzó un valor de 90%. Sin embargo, el crecimiento se mantuvo y en ninguna de las dos variedades se presentó la inhibición completa del crecimiento del ápice. Al mismo tiempo, se observó que la disminución en la humedad del sustrato (-1.5 MPa) afectó la función celular de la radícula provocando un Ψ_A promedio del tejido de -3.0 MPa, y aún en estas condiciones se mantuvo el crecimiento longitudinal de manera discreta, tal vez debido a que la zona de diferenciación y elongación celular se encuentran cerca del ápice, como fue reportado por Baskin (2000) y Baluska (2001), indicando que se establece un gradiente de humedad continuo en el tejido de la raíz (Sharp y Davies 1979).

Se ha propuesto que la raíz se diferencia en zona de diferenciación (meristemo apical), zona de elongación y zona de terminación (Wu y Cosgrove 2000; Baluska, 2001; Baluska, 2010), y que presentan diferentes respuestas al estrés. Verslues *et al.* (1990 y 1998) y Pritchard *et al.* (1993) observaron que las paredes de la zona de transición de la región de alargamiento y de los ápices radiculares del maíz son muy sensibles a la acidificación, que estimula la elongación celular, y por lo tanto, sus células mantienen su crecimiento aun

con déficit de agua severo. El incremento y mantenimiento de la elongación de la radícula en maíz VS-22 a Ψ_A de -1,0 y -1.5 MPa en el sustrato, puede considerarse como un mecanismo adaptativo de tolerancia a la sequía, evitando los efectos adversos que provoca el déficit hídrico.

El crecimiento continuo del sistema radicular en condiciones de escasez de agua se considera como una característica determinante para garantizar el establecimiento y la supervivencia de las plantas, la raíz permite un anclaje efectivo al sustrato y una penetración en capas más profundas del suelo en donde puede encontrar agua, absorberla y moverla al tallo, para mantener el crecimiento de la parte aérea de la planta (Sharp, 1999; y 2004 Siemens, 2004, Baluska, 2010; Chaves, 2003; Chaves, 2004; Potocka *et al.*, 2011).

3.4.2 Relaciones hídricas y acumulación de solutos

Se determinó el CRA en las variedades de maíz VS-22 y AMCCG-2 sometidas a déficit hídricos del sustrato de -0.03, -1.0 y -1.5 MPa y con 72 h de incubación. La variedad VS-22 mostró una disminución del CRA del 30%, mientras que AMCCG-2 resultó más afectada disminuyendo hasta un 35%, estos valores porcentuales de déficit de agua de intermedio (-1.0 MPa) a severo (-1.5 MPa), mantuvieron turgentes los ápices de las raíces y sin inhibir su crecimiento.

El Ψ_A en la radícula de las dos variedades de maíz utilizadas (VS-22 y AMCCG-2) creciendo en un sustrato con Ψ_A de -1.5 MPa por 72 h, provocó una disminución de hasta -3.0 y -2.4 MPa para VS-22 y AMCCG-2, respectivamente. El Ψ_O se redujo, y el valor fue menor en VS-22 (-3.7 MPa) comparado con -2.7 MPa en la variedad AMCCG-2.

Estos resultados fueron similares a los encontrados por Serraj y Sinclair (2002) donde hubo una reducción del Ψ_O , y se reflejó en el incremento de la acumulación de solutos en el tejido radicular. En este trabajo se acumularon en mayor o menor grado los monosacáridos glucosa y fructosa (Figura 5), los disacáridos sacarosa (Figura 5) y trehalosa (Figura. 6), así como, el almidón y la prolina en los ápices de la radícula de ambos materiales de maíz de VS-22 y AMCCG-2. La detección de los azúcares, en particular de la glucosa, fructosa y sacarosa, así como de la trehalosa en etapas muy tempranas del desarrollo de las plántulas de maíz sometidas a déficit de agua, ha sido a la fecha poco documentado, y los estudios realizados hasta el momento involucran azúcares totales, reductores, ácido abscísico (ABA), prolina, etc. (Chavez, 2004). La detección de estos solutos en estas etapas del desarrollo de las plántulas no son derivadas del proceso de fotosíntesis, más bien son resultado del órgano de almacenamiento (endospermo), simultáneamente con la reducción del Ψ_O mostrado por las variedades de maíz. En plantas superiores se ha reportado la presencia y acumulación de algunos de los solutos mencionados en condiciones de déficit hídrico (Lannucci, 2004; Chavez, 2004), pero no han sido evidenciados en etapas muy tempranas del desarrollo de la raíz, como se muestra en este estudio.

La magnitud en la reducción del Ψ_A y del Ψ_O en la radícula, generaron un mantenimiento de turgencia en ambos materiales de maíz, siendo mayor en VS-22 con un valor de 0.67 MPa, mientras que para AMCCG-2 fue de 0.16 MPa. Lo anterior sugiere que ambas variedades llevaron a cabo un ajuste osmótico, con una mejor respuesta a la escasez de agua en la variedad VS-22 que fue seleccionada en ambientes limitantes de humedad.

Los resultados obtenidos en esta investigación mostraron que las plantas de maíz VS-22 y AMCCG-2 presentaron diferencias varietales en la sensibilidad a la disminución del Ψ_A del sustrato y en la acumulación de solutos. La variedad que es considerada tolerante a sequía VS-22 presentó una mayor acumulación de solutos comparada con AMCCG-2, ya que VS-22 acumuló 1.5 veces más glucosa, 2.9 veces más fructosa y 4.1 veces más sacarosa. El incremento de azúcares se ha observado en plántulas de maíz con déficit hídrico, como una respuesta activa y relacionada con ajuste osmótico (Mineo *et al.*, 2010). Esta respuesta mostrada por la radícula de maíz, también ha sido observada en los trabajos de Nayer y Reza (2008), en donde las raíces del maíz 701 acumularon casi el doble de azúcares cuando el Ψ_A fue de -1.76 MPa, los autores infirieron que esta acumulación se debió a que la concentración del almidón disminuyó debido al desdoblamiento del mismo a moléculas de glucosa.

Por otro lado, se ha observado que en muchas especies de plantas como *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Zea mays* L, *Solanum tuberosum*, el almidón se degrada y los productos finales se usan para la síntesis de sacarosa, durante estrés hídrico (Smith *et al.*, 2004; 2005), además la sacarosa puede funcionar como una molécula de señalización del estrés en la regulación del metabolismo de las plantas (Koch *et al.* 1996). Estos resultados apoyan la idea de que el déficit hídrico induce en VS-22 una eficiente translocación de carbono hacia el ápice de la radícula, lo que se podría considerar como una estrategia adaptativa que le permite comportarse como una variedad tolerante a sequía.

La trehalosa fue otro de los solutos que se detectó cuando la radícula se desarrolló en el sustrato con Ψ_A de -1.0 y -1.5 MPa, este disacárido se

incrementó notablemente en función de los tiempos de tratamiento a las 24, 48 y 72 h, los valores registrados para VS-22 fueron hasta de 3.2 veces más con respecto a AMCCG-2. Es importante resaltar la detección de este soluto en etapas muy tempranas del desarrollo de la raíz y en las condiciones experimentales de esta investigación, y que a la fecha no ha sido reportada, por lo que su función aquí no está bien definida, pero es probable que su presencia contribuya al crecimiento del ápice radicular, así como un osmoprotector que contribuye al mantenimiento de la elongación.

Se sabe que este azúcar se acumula en grandes cantidades en organismos altamente resistentes a la desecación, como algunas plantas de resurrección, en tardígrados y levaduras (Zentella et al., 1999). La principal evidencia de la presencia de la trehalosa en las plantas, proviene de los proyectos de secuenciación genómica de especies como *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Zea mays* u otros (Paul et al., 2008; Zhou et al., 2013). La trehalosa parece estar asociada a los mecanismos de adaptación de las plantas al estrés abiótico, funcionando como un osmoprotector, y el intermediario trehalosa 6-fosfato parece estar involucrado en la señalización del estrés, así como en la regulación del metabolismo del carbono y la fotosíntesis (Paul et al., 2008; Iturriaga et al., 2009). Se han producido plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* que acumulan más trehalosa, lo cual las vuelve más tolerantes a diferentes tipos de estrés abiótico, como la sequía, salinidad, frío y choque térmico (Garg et al., 2002; Miranda et al., 2007).

Contrario a la acumulación de los osmolitos descritos, nuestros estudios mostraron la presencia de almidón, que no presentó incrementos notables, y más bien su concentración se redujo hasta el 67.5% en VS.22 y hasta el 76%

para AMCCG-2, después de 72 h de incubación, su reducción fue más drástica (61.1%) cuando el Ψ_A fue de -1.5 MPa en VS-22. Posiblemente, la variedad VS-22 mostró disminución de almidón debido a cambios de codependencia provocados por el ambiente adverso y que representan una respuesta adaptativa como consecuencia de la degradación del almidón del endospermo como ha sido propuesto por autores como Smith *et al.* (2004); Smith *et al.*, (2005); (Bieniawska) *et al.*, 2007, que indican que en plantas con estrés abiótico el almidón es degradado para la síntesis de sacarosa.

La acumulación de prolina en la variedad tolerante VS-22 se acumuló en una proporción 3:1 con respecto a la variedad susceptible AMCCG-2, a las 72 h de incubación. Su acumulación en plantas con déficit hídrico ha sido documentado, como uno de los ajustes que realizan las plantas para disminuir su Ψ_O (Hare y Crees., 1998; Avendaño *et al.*, 2005) y mantener la turgencia en condiciones de déficit de agua (Yancey *et al.*, 2000), asociándose a la prevención de daños en la estructura de la membrana (Saradhi, 1995; Hamilton y Heckathorn, 2001; Mosert *et al.*, 2006).

Los efectos de la acumulación de prolina en la radícula primaria de las plántulas de maíz participan en el ajuste osmótico, y en el mantenimiento de la elongación de la radícula a Ψ_A muy bajos (Sharp *et al.*, 1990; Hare *et al.*, 1999) esto puede explicar por qué aun en un Ψ_A de -1.5 MPa la variedad de maíz VS-22 continuo su elongación hasta las 72 h.

Los mecanismos de tolerancia al estrés hídrico podrían estar asociados a la acumulación de solutos tales como azúcares y prolina, lo cual se ha especulado. La acumulación de azúcares solubles esta correlacionado con la tolerancia a la sequía (Hoekstra, 2001); el contenido de prolina puede ser por sí

mismo de importancia principal en el proceso de adaptación al estrés (Hare y Cress 1997; Avendaño *et al.*, 2005), y que puede servir como un marcador de selección para cultivares tolerantes, aun en plántulas de muy corta edad (72 h). El crecimiento de las radículas en condiciones de estrés y el incremento de los solutos como glucosa, fructosa, sacarosa, trehalosa y prolina demostraron que la tolerancia a la sequía está basada en la capacidad de ajuste que tengan las variedades de maíz estudiadas. Estos estudios pueden servir como base para la elaboración de marcadores bioquímicos para selección y mejoramiento genético de maíz.

LITERATURA CITADA

- Atkinson, C.J., Policarpo, M., Webster, A.D., Kingswell, G., 2000. Drought tolerance of clonal *Malus* determined from measurements of stomatal conductance and leaf water potential. *Tree Physiol.* 20, 557-563.
- Avonce, N., Mendoza-Vargas, A., Moret, E., Iturriaga, G., 2006. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evol. Biol.* 6-109.
- Avendaño, C. H., Trejo, C., López, M.J., Santacruz, A.D., Castillo, F., 2005. Comparación de la tolerancia a la sequía de cuatro variedades de maíz (*Zea mays* L.) y su relación con la acumulación de prolina. *Interciencia* 30, 560-564.
- Baluska, F., Jasik, J., Heldemann, H.G., Salajova, T., Volkmann, D., 2001. Latrunculin B-induced plant Dwarfism: plant cell elongation is F-actin-dependent. *Dev. Biol.* 223, 113-124.
- Baluska, F., Stefano, M., Dieter, V., 2010. Root apex transition zone: a signalling response nexus in the root. *Trends Plant Sci.* 15, 1360-1385.

- Baskin, T., 2000. On the constancy of cell division rate in the root meristem. *Plant Mol. Biol.* 43, 545-554.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39, 205–207.
- Baud, S., Vaultier, M.N., Rochat, C., 2004. Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 55, 397–409.
- Bieniawska, Z.D., Barratt, H.P., Garlick, A.P., Thole, V., Kruger, N.J., Martin, C., Zrenner, R., Smith, A.M., 2007. Analysis of the sucrose synthase gene family in Arabidopsis. *Plant J.* 49, 810–828.
- Boyer, J.S., 1982. Plant productivity and environment. *Science* 218, 443-448.
- Chaves, M.M., Oliveira, M.M., 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *J. Exp. Bot.* 55, 2365-2384.
- Chaves, M.M., Maroco, P., Pererira, S., 2003. Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. *Review Functional Plant Biology* 30, 239-264.
- Cramer, G., Urano, R.K., Delrot, S., Pezzotti, M., Shinozaki, K., 2011. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biol.* 11:163.
- Edmeades, G.O., Bolaños, J.H., Bello, M., 1993. Causes for silk delay in lowland tropical maize. *Crop Sci.* 33, 1029–1035.
- Ellis, R.H., Hong, T.D. Roberts, E.H., 1985. Handbook of Seed Technology for Genebanks Volume II. Compendium of Specific Germination Information

- and Test Recommendations. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, pp. 221-237.
- Garg, A.K., Kim, J.K., Owens, T.G., Ranwala, A.P., Choi, Y.D., Kochian, L.V., Wu, R., 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 15898-15903.
- Hamilton, W., Heckathorn, A., 2001. Mitochondrial adaptations to NaCl. complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiol.* 126, 1266-1274.
- Hare, P.D., Cress, W.A., 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* 21, 79-102.
- Hare P.D., Cress, W.A., Ataden, L.V., 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ.* 21, 535-553.
- Hare, P.D., Cress, W.A., Staden, L.V., 1999. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction *J. Exp. Bot.* 333, 413–434.
- Hoekstra, F.A., Buitink, J., 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.* 8, 431-438.
- Hsiao, T., Xu, L.K., 2000. Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *J. Exp. Bot.* 51, 1595-1616.
- Iturriaga, G., Suarez, R., Nova, B.F., 2009. Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3793-3810.
- Jensen, S.D., 1995. Genetic improvement of maize for drought tolerance. In: Jewell, D.C., Waddington, S.R., Ransom, J.K., Pixley, K.V. (Eds.),

- Proceedings of the Fourth Eastern and Southern African Regional Maize Conference, Harare, Zimbabwe. CIMMYT, Mexico, pp. 67–75.
- Koch, K., Vong, W., Xu, J., 1996. Sugar and metabolic regulation of genes for sucrose metabolism: potential influence of maize sucrose synthase and soluble invertase responses on carbon partitioning and sugar sensing. *J. Exp. Bot.* 47, 1179-1185.
- Kramer, P.J., Boyer. S., 2003. *Water Relation of Plants and Soils*. Academic Press, Orlando, FL.
- Massonnet, C., Costes, E., Rambal, S., Dreyer, E., Regnard, J.L., 2007. Stomatal regulation of photosynthesis in apple leaves: evidence for different water-use strategies between two cultivars. *Ann. Bot.* 100, 1347-1356.
- Miranda, J.A., Avonce, A., Suárez, R., Thevelein, J.M., Dijck, P.V., Iturriaga, I., 2007. A bifunctional TPS–TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 226, 1411-1421.
- Moser, B.S., Boy, F., Jampatongb, S., Stampa, P., 2006. Effects of preanthesis drought, nitrogen fertilizer rate, and variety on grain yield, yield components, and harvest index of tropical maize. *Agr. Water Manage.* 81, 41-58.
- Nayer, M., Reza, R., 2008. Drought-induced accumulation of soluble sugars and proline in two maize varieties. *World Applied Sciences Journal* 3, 448-453.
- Paul, M.J., Primavesi, L.F., Jhurreea, D., Zhang, Y., 2008. Trehalose metabolism and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 417-441.

- Potocka, L., Szymanowska, J., Karczewsky, J., 2011. Effect of mechanical stress on Zea root apex. I. Mechanical stress leads to the switch from closed top en meristes organization. *J. Exp. Bot.* 62, 4583–4593.
- Pritchard, J., Hetherington, P.R., Fry, S.C., Tomos, A.D., 1993. Xyloglucan endotransglycosylase activity, microfibril orientation and the profiles of cell wall properties along growing regions of maize roots. *J. Exp. Bot.* 44, 1281–1289.
- Saradhi, P.P., Aliarora, S., Prasas, K.V., 1995. Proline accumulates in plants exposed to uv radiation and protects them against uv-induced peroxidation. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 209, 1-5.
- Scholes, J., Bundock, N., Wilde, R., Rolfe, S., 1996. The impact of reduced vacuolar invertase activity on the photosynthetic and carbohydrate metabolism of tomato. *Planta* 200, 265-272.
- Serraj, R., Sinclair, T.R., 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions. *Plant Cell Environ.* 25, 333–341.
- Sharp, R.E., Davies, W.J., 1979. Solute regulation and growth by roots and shoots of water-stressed maize plants. *Planta* 147, 43-49.
- Sharp, R.E., Hsiao, T.C., Silk, W.K., 1990a. Growth of the maize primary root at low water potentials. II. The role of growth and deposition of hexose and potassium in osmotic adjustment. *Plant Physiol.* 93, 1337-1346.
- Sharp, R.E., Kuhn, W.S., Hsiao, T.C., 1988. Growth of the maize primary root at low water potentials spatial distribution of expansive growth. *Plant Physiol.* 87, 50-57.

- Sharp, R.E., Poroylo, V., Hejlek, I.J., Spollen, G.W., Springer, G.K., Bohnert, H.J., Nguyen, T.H., 2004. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *J. Exp. Bot.* 407, 2343–2351.
- Sharp, R.E., Pritchard, J., Voetberg, G.S., 1990b. Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. *Plant Physiol.* 93, 1329-1336.
- Siemens, J.A., Zwiazek, J.J., 2004. Changes in root water flow properties of solution culture-grown trembling aspen (*Populus tremuloides*) seedlings under different intensities of water-deficit stress. *Physiol. Plantarum* 121, 44–49.
- Skirycz, A., Inze, D., 2010. More from less: plant growth under limited water. *Curr. Opin. Biotech.* 21, 197–203.
- Smith, S.M., Fulton, D.C., Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Dunstan, H., Hylton, C., Zeeman, S.C., Smith, A.M., 2004. Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* 136, 2687–2699.
- Smith, A., Zeeman, S., Smith, S., 2005. Starch degradation. *Annual Review in Plant Biology* 56, 73-98.
- Verslues, P.E., Sharp, R.E., 1999. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. II. Metabolic source of increases proline deposition in the elongation zone. *Plant Physiol.* 119, 1349-1360.
- Verslues, P.E., Ober, S., Sharp, R.E., 1998. Root growth and oxygen relations at low water potentials. Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions. *Plant Physiol.* 116, 1403–1412.

- Voetberg, G.S., Sharp, R.E., 1991. Growth of the maize primary root at low water potentials. Role of increased proline deposition in osmotic adjustment. *Plant Physiol.* 96, 1125-1130.
- Westgate, M.E., Boyer, J.S., 1985. Osmotic adjustment and the inhibition of leaf root, stem and silk growth at low potentials in maize. *Planta* 164, 540-549.
- Yamaguchi, M., Sharp, R.E., 2010. Complexity and coordination of root growth at low water potentials: recent advances from transcriptomic and proteomic analyses. *Plant Cell Environ.* 33, 590–603.
- Yancey, P.H., 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Bot.* 208, 2819-2830.
- Zentella, R., Mascorro, J.O., Dijck, P.V., Folch, J.M., Bonini, B., Van, C., Zhang, J., Primavesi, L.F., Jhurrea, D., Andralojc, P.J., Mitchell, R.E., Powers, S.J., Schluemann, H., Delatte, T., Wingler, A., Paul, M.J., 2009. Inhibition of SNF1-related protein kinase 1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol.* 149, 1860-1871.
- Zhou, M.L., Zhang, Q., Sun, Z.M., Chen, L.H., Liu, B.X., Zhang, K.X., Zhu, X.M., Shao, J.R., Tang, Y.X., Wu, Y.M., 2013. Trehalose metabolism related genes in maize. *J. Plant Growth Regul.* DOI: 10.1007/s00344-013-9368-y.

CAPÍTULO 4

EFFECTO DE ESTRÉS HÍDRICO EN LA CONCENTRACIÓN DE SOLUTOS, EN HOJAS DE DOS VARIEDADES MAÍZ VS-22 Y AMCCG-2.

RESUMEN

La sequía es uno de los factores abióticos más importantes que causa reducción en el crecimiento, en la producción de biomasa y en el rendimiento de cultivos. Las variedades de maíz con cierta tolerancia a la sequía responden y genera ajustes que les permite adaptarse y sobrevivir al déficit de agua con cambios en su fisiología y metabolismo. Algunas de estas respuestas son disminución en el contenido relativo de agua, disminución del potencial osmótico, acumulación de solutos como la prolina y varios azúcares, así como también alteraciones en el contenido de proteínas. Con base a lo anterior el objetivo del trabajo fue analizar el efecto del déficit de agua en la acumulación de solutos en dos materiales de maíz VS-22 (tolerante) y el híbrido AMCCG-2 (sensible). El estudio se realizó en hojas de maíz a las 7 semanas después de la emergencia, con un déficit de agua gradual del 50%. El déficit de agua en VS-22 provocó disminución en el contenido relativo de agua (CRA) hasta un 70 % y un potencial osmótico (Ψ_o) de -2.0 MPa, comparado con plantas testigo de VS-22 con un CRA de 98% y un PO de -0.64 MPa. Las plantas de AMCCG-2 con déficit de agua mostraron un CRA del 70. % y un PO de -1.52 MPa. Se evidencio incremento en la acumulación de solutos: prolina, azúcares totales, glucosa, fructosa y sacarosa, así como también la acumulación de trehalosa, y cambios en la acumulación de almidón. Se encontraron relaciones significativas entre los parámetros hídricos y acumulación de los diferentes solutos en las plantas sometidas a déficit hídrico. Estos resultados pueden ser indicadores de ajuste osmótico en las plantas de la variedad VS-22, las cuales demostraron mantener la turgencia celular durante el periodo de falta de agua.

4.1. INTRODUCCIÓN

La sequía es una de las causas de estrés ambiental más importante que afecta la productividad agrícola en todo el mundo (Boyer 1982, Araus *et al.*, 2002; Chavez 2002). Existen mecanismos fisiológicos involucrados en las respuestas celulares de la planta al déficit hídrico, por lo que existe un interés considerable en implementar programas de mejoramiento que traten de incrementar la tolerancia al estrés abiótico, las cuales han tenido cierto éxito, pero están limitadas por la naturaleza multigénica del maíz (Umezawa *et al.*, 2004; 2006).

Los cambios fisiológicos y bioquímicos que ocurren en respuesta al estrés por sequía son diferentes en cada especie de planta. Algunas de las respuestas más importantes son la acumulación de solutos, aquí se incluyen los azúcares que son moléculas de respuesta inmediata y son la principal fuente de energía de las células, la versatilidad estructural de los carbohidratos ofrece la posibilidad de una comunicación sistemática o glicosilada (Koch, 1996). Al acumularse como polisacáridos éstos sirven como almacén de energía a largo plazo.

El maíz presenta la vía fotosintética C4, es un proceso que se lleva a cabo por la ruta de Hatch y Slack (C4) donde intervienen principalmente dos enzimas de carboxilación la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPcase) y la Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenase (RUBISCO). El paso inicial es la fijación de carbono inorgánico por PEPCase, seguido por el movimiento del producto de cuatro carbonos ácidos a un compartimento interior donde se localiza RUBISCO (Hatch, 1976; Kanay y Edwards, 1999). Esta última inicia el metabolismo fotosintético del carbono, determinando la tasa a la cual el CO₂

será incorporado en azúcar fosfato a través de la carboxilación de la enzima RUBISCO (López *et al.*, 2007).

Uno de los productos de la fotosíntesis es la glucosa, además de su importancia como fuente principal de carbono, para muchos organismos es una molécula reguladora, clave en el control de la fisiología celular, metabolismo, ciclo celular, desarrollo y expresión génica. En plantas superiores los azúcares incluida la glucosa modulan diferentes procesos, que van desde la germinación de la semilla hasta la última etapa de la senescencia. El papel de los azúcares como reguladores se ha estudiado en mayor profundidad en organismos celulares que deben enfrentarse a situaciones adversas, lo cual obliga al reajuste continuo del metabolismo según la disponibilidad de nutrientes (Schüller, 2003). También se ha postulado la acumulación de otros solutos compatibles como prolina. La acumulación de este compuesto en la planta generaliza la respuesta al estrés ambiental, incluyendo bajos potenciales de agua, tiene una función como agente osmótico en particular debido a su ion híbrido, altamente hidrofílico además se puede acumular en altas concentraciones en el citoplasma sin interferir con la estructura celular del metabolismo (Yancey *et al.*, 1982).

Entre los azúcares, los disacáridos como la sacarosa y la trehalosa además de ser fuentes de energía en forma de moléculas estables, también pueden funcionar como compuestos protectores. Esta comunicación es necesaria para la coordinación del metabolismo con el desarrollo y presiones ambientales y depende de la transferencia de información. (Schüller, 2003; Jhonstan, 2005).

Particularmente se ha observado que la trehalosa tiene una función importante en las señales metabólicas y en la tolerancia a la sequía (Holström *et al.*, 1996).

Las regiones áridas y semiáridas de México enfrentan el problema de la escasez de agua, sin embargo, el cambio climático y las manipulaciones antropocéntricas ha provocado que estas regiones comiencen a ser vulnerables a la sequía, debido a esto es importante y prioritario evaluar caracteres fisiológicos y bioquímicos en variedades disponibles que han sido sujetas a estudios de mejoramiento para tolerancia a sequía. Es por eso que el objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos del estrés hídrico en la acumulación de prolina y carbohidratos solubles en plantas de las variedades de maíz VS-22 y AMCCG-2.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se estableció en los invernaderos del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, México (19° 29'N y 98° 45' O, 2250 msnm) durante el período de verano 2012, con una temperatura de 25 y 16 °C (día/noche) y una humedad relativa de 56 y 76% (día/noche). Se usaron semillas de dos variedades de maíz con diferencias en su nivel de tolerancia a la sequía: VS-22 como tolerante a sequía, la cual tiene un fondo genético de 16 cruza y ha sido probada en condiciones de sequía a nivel de campo y AMCCG-2 considerada como susceptible debido a que su obtención se hizo bajo condiciones de riego. Las semillas fueron lavadas con agua y sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio (15% v/v) para la esterilización superficial, posteriormente las semillas se germinaron en charolas de plástico por 72 h a 25°C, y las plántulas fueron trasplantadas en macetas de plástico de 4 Lts de capacidad, el sustrato fue una mezcla esterilizada de suelo de hojarasca peat moss, en una proporción (2:1). Después del trasplante las macetas se mantuvieron cercanas a capacidad de campo (CC). A los seis días después de la emergencia (DDE) se iniciaron los tratamientos de déficit de agua. Se aplicaron dos tratamientos de humedad: en el primero las plantas estuvieron en riego constante y cercano a CC del sustrato, y el tratamiento de déficit hídrico que consistió en la reducción gradual del 50% de la humedad del suelo perdida por transpiración, la determinación del déficit estuvo basada en el peso total de la maceta y agua transpirada por planta. El riego y la reducción de agua se realizaron cada tercer día; el tratamiento fue aplicado durante siete semanas

4.2.1 Muestras de hojas para determinaciones fisiológicas y bioquímicas

Siete semanas después del tratamiento de déficit hídrico se recolectaron muestras de la sexta hoja (liguladas totalmente expandidas).

Los segmentos medios de cada hoja fueron colectadas para los siguientes análisis: 2cm para contenido relativo de agua (CRA) y 8 cm para potencial osmótico (Ψ_o), prolina, azúcares y trehalosa. Las muestras para Ψ_o , azúcares, prolina y trehalosa se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

4.2.2 Contenido relativo de agua (CRA)

El CRA fue medido para determinar el estado de hidratación de la planta. Se utilizó la sexta hoja completamente expandida y usando un sacabocado de 1cm de diámetro, se cortaron tres discos por cada hoja y se usaron 30 plantas en cada tratamiento. Primeramente se midió el peso fresco (PF) de cada disco de la hoja e inmediatamente fueron embebidas en agua destilada durante 24 h en cajas Petri, después de este tiempo se determinó el peso túrgido (PT) eliminado el exceso de agua en papel secante, por último se pusieron a secar en bolsas de papel en una estufa a 60°C hasta que adquirieron peso constante. Con estos datos se calculó el CRA usando la siguiente fórmula:

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

4.2.3 Determinación del potencial osmótico (Ψ_o)

El Ψ_o del segmento de hoja de maíz se puso en jeringas y se le extrajo la savia posteriormente se colocaron 10 μL en un osmómetro de punto de congelación modelo Wescor C-52 Inc, Utha, USA y el cálculo fue de acuerdo a la ecuación:

$$\Psi_o = \text{CRT}$$

Donde C es la concentración de solutos en milliosmols, R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta del tejido, (K).

4.2.4 Determinación de prolina

Para la determinación de prolina se utilizó el método establecido por Bates (1973) Se hicieron utilizando 100 mg de material vegetal de cada de una de las muestras, las cuales se molieron con 2,5 mL de ácido sulfosalicilico al 3%; el compuesto se filtró con papel Watman #1. El sobrenadante se utilizó para realizar las determinaciones tratándolas con ninhidrina ácida y tolueno, lo cual hace una separación de fases. La fase superior de color rojo que se formó después de la agitación, se separó en otro tubo de ensaye y se procedió a dar lectura con una absorbancia de 520 nm en un espectrofotometro de UV/visible (Jenway 6305); el contenido de prolina fue expresado por μ moles de peso fresco.

4.2.5 Cuantificación de azúcares solubles: glucosa, fructosa y sacarosa

Los azúcares solubles en hojas de plantas de maíz fueron extraídos con 4 a 5 lavados sucesivos de 10 minutos en etanol (80%, v/v, 70°C). Los extractos se evaporaron a 50°C y se disolvieron en 1mL en agua destilada, y se determinaron enzimáticamente como describe Scholes *et al.* (1996). Las determinaciones de la glucosa, fructosa y sacarosa se realizaron enzimáticamente por la adición secuencial de hexocinasa, fosfoglucoisomerasa e invertasa. Las absorbancias se obtuvieron en un espectrofotómetro lector de micro-placas (Multiskan Ascent, Labsystem, Thermo). Los cálculos se realizaron utilizando curvas estándares de

calibración, preparadas previamente para cada uno de los azúcares y se expresaron en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de PF.

4.2.6 Cuantificación de almidón

El contenido de almidón se determinó usando el método enzimático de Scholes (1996) a través de la medición de la glucosa. Una vez extraídos los azúcares solubles de hoja, cada uno de los residuos sólidos se congelaron y se molieron por separado en un mortero con nitrógeno líquido, se le adicionó 1 mL de agua destilada y se metieron a la autoclave por 45 minutos a una temperatura de 121 °C. Para la digestión del almidón se tomó una alícuota de 100 μL de la muestra, a la que se le adicionó 100 μL del amortiguador compuesto por MES 500 mM con pH 4.5 (Sigma), 50 μL de α -amilasa (0.5 U de α -amilasa Sigma), y 50 μL de amiliglucosido, una vez realizada la digestión se procedió a leer en el espectrofotómetro a 340nm.

4.2.7. Cuantificación de azúcares totales

Los azúcares totales se determinaron por el método colorimétrico de antrona, de acuerdo a Montreuil *et al.* (1997), con modificaciones para un micro-método. Se pesaron 100 mg de hoja, y se realizaron 5 extracciones sucesivas con 5 mL de etanol al 80% en baño maría con temperatura de 70°C, los extractos se concentraron por evaporación en una estufa a 50°C y se re-suspendieron en 1 mL de agua destilada.

De las extracciones de los azúcares de VS-22 y AMCCG-2 que se utilizó para la determinación de azúcares totales, se colocaron 600 μL de agua destilada en tubos de ensaye de cada solución estándar o muestra y 600 μL de agua para el

blanco, se agregaron 3 mL de la solución de antrona en frío en cada tubo ensaye y se agitaron por 5 minutos en hielo, posteriormente los tubos se transfirieron a un baño de agua de 100°C durante 10 minutos, para detener la reacción se coloraron en hielo (10 minutos) y por último se midió la absorbancia de cada tubo a 625 nm.

4.2.8. Determinación de Trehalosa

Se utilizaron 200mg de peso fresco de hoja de maíz y se molieron hasta pulverizar, posteriormente se agregó un 1mL de agua grado HPLC y la mezcla de transfirió a un tubo eppendorf de 1.5mL, se calentó la muestra a 95°C en baño seco y se centrifugó a 14000 rpm por 5'. Posteriormente, las muestras se desionizaron en una columna de 1 mL preparada con resinas catiónicas y aniónicas y se filtraron en filtros millipore de 0.22 µm. Las muestras se inyectaron en un HPLC (Waters) con un controlador 600, un detector de índice de refracción 2414 y un autosampler 717 (inyector automático). Se utilizó una columna supelcosil LC-NH2 de 25 cm x 4.6 mm. Como Fase móvil se usó acetonitrilo-agua (75:25) a un flujo de 1 mL min⁻¹.

4.2.9 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial de tratamientos, con 10 repeticiones donde los factores fueron las variedades y los niveles de déficit de humedad, la unidad experimental consto de seis plantas. Se realizó un análisis de varianza, cuando se encontraron diferencias estadísticas se hizo un análisis de comparación de medias de Tukey con un $P \leq 0.05$.

La relación entre la acumulación de los diferentes solutos y los parámetros fisiológicos se analizó mediante la correlación de Pearson y utilizando el paquete SAS 2009.

4.3. RESULTADOS

4.3.1 Variables fisiológicas

El contenido relativo de agua (CRA) de la hoja, se ha usado como un indicador del estatus de agua de la planta (Sinclair y Ludlow, 1985).

Durante el período de siete semanas las plantas bien irrigadas (testigo) tuvieron un CRA del 98y 96% en ambas variedades (Figura 1), por el contrario; las plantas sometidas a déficit de agua presentaron una disminución significativa ($P \leq 0.05$) del CRA de hasta 30% en ambas variedades indicando que estuvieron en estrés. En plantas bien irrigadas el Ψ_o mostró valores entre -0.64 MPa para VS-22 y -0.7 MPa en AMCCG-2 (Figura 1 A), indicando una escasa acumulación de solutos en estas plantas. Sin embargo el Ψ_o de las plantas de maíz VS-22 y AMCCG-2 se vio significativamente influenciada por el déficit hídrico ($P \leq 0.05$), así los Ψ_o se redujeron hasta -2.0 MPa para VS-22 y -1.52 MPa para AMCCG-2 estos valores indican una diferencia de Ψ_o de 23% entre VS-22 y AMCCG-2 (Figura 1B).

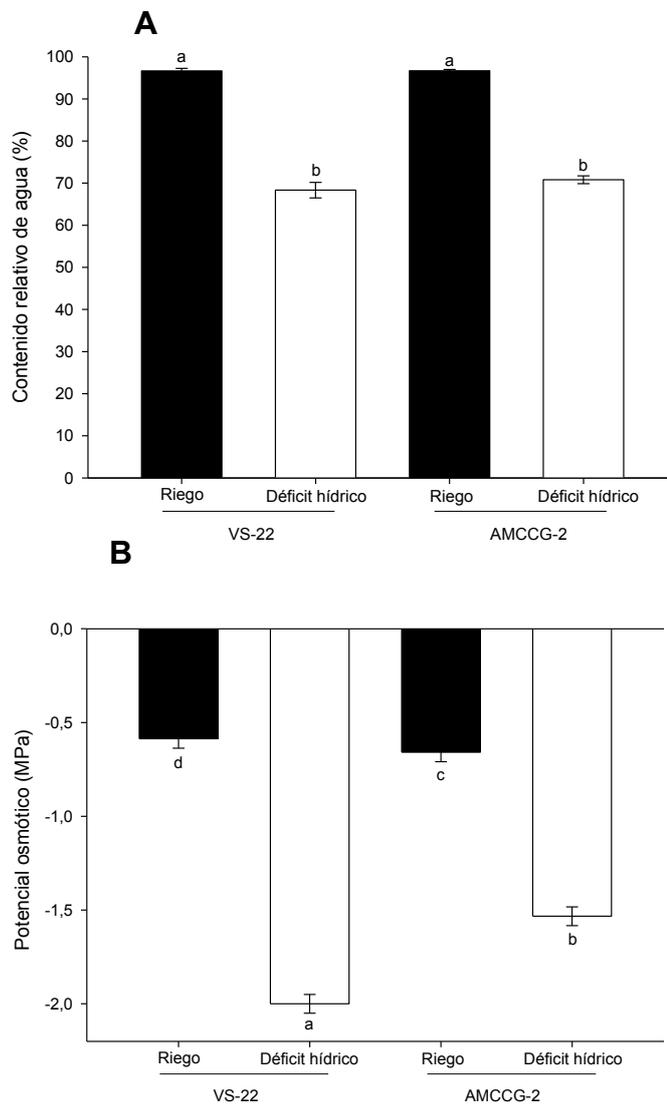


Figura 1. Contenido relativo de agua A (CRA) y potencial osmótico (B) en hojas de dos variedades de maíz (VS-22 y AMCCG-2) con diferente déficit de agua. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas $P < 0.05$. Cada barra es el promedio \pm E.E ($n = 10$).

Por otro lado en plantas mantenidas cercanas a CC, el Ψ_o se mantuvo en valores de -0.64 MPa para VS-22 y -0.7 MPa en AMCCG-2 (Figura 1B) a lo largo del experimento. Sin embargo el Ψ_o de las plantas de maíz VS-22 y AMCCG-2 se vio significativamente influenciada por el déficit hídrico ($P \leq 0.05$), así el Ψ_o disminuyó hasta -2.0 MPa en VS-22 y -1.52 MPa en AMCCG-2

(Figura 1B), al comparar estos valores la diferencia fue de 23% entre VS-22 y AMCCG-2.

El efecto de déficit hídrico en el Ψ_o fue negativo para ambas variedades. Un análisis de correlación entre CRA y Ψ_o mostró una correlación positiva entre estas dos variables (Figura. 2).

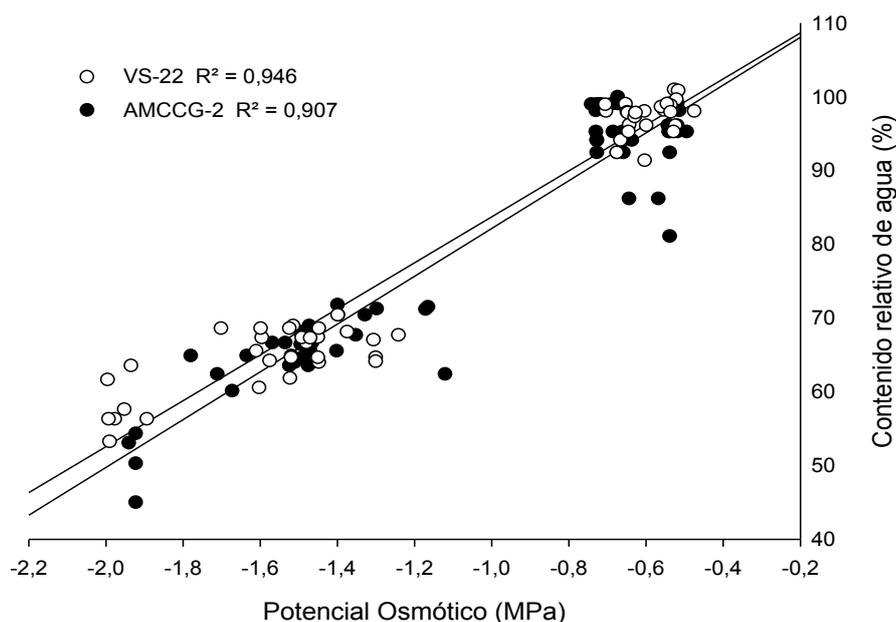


Figura 2. Relación entre el CRA y el potencial osmótico en hojas de 30 plantas de maíz por variedad (VS-22 y AMCCG-2), y con diferente déficit de agua.

La correlación de CRA y Ψ_o bajo estrés es el resultado de la regulación recíproca de ambas variables; se evidencia que conforme disminuye el Ψ_o se reduce el porcentaje del CRA en las hojas de maíz cuando el déficit hídrico es más severo hasta de -1.5 MPa del sustrato. Por el contrario, los PO son bajos cuando el porcentaje del CRA es cercano a CC en las plantas de maíz.

En las figuras 3A, B y C se observa el efecto del déficit hídrico en hojas de maíz de las variedades VS-22 y AMCCG-2, y su incremento de solutos, en

particular de la glucosa, fructosa y sacarosa, los tres azúcares muestran correlación positiva con la reducción de los Ψ .

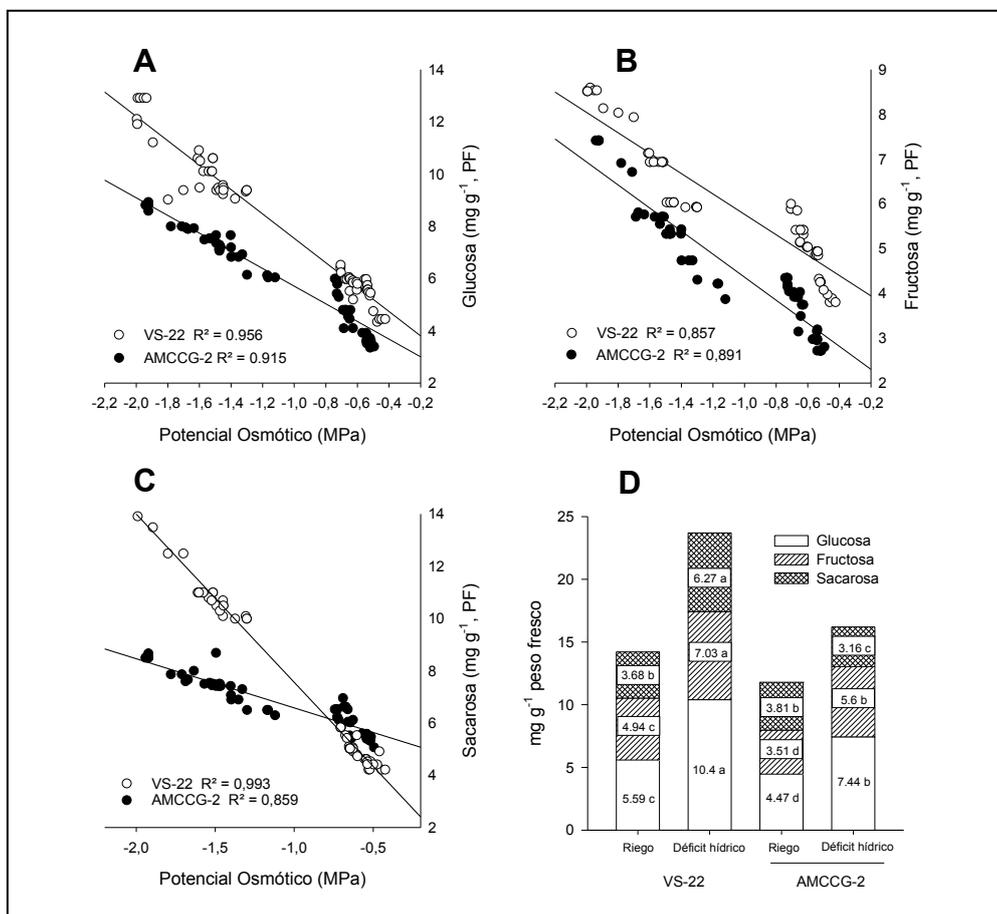


Figura 3. Efecto de la sequía en el contenido de azúcares solubles en hojas de maíz y correlación entre el PO y la acumulación de glucosa (A), fructosa (B) y sacarosa (C) en hojas de maíz con diferente estrés hídrico. En la figura D se observa la acumulación de azúcares en las variedades de maíz. Las columnas muestran la acumulación de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) de siete semanas de tratamiento de déficit hídrico. Donde muestran las barras de error y las medias correspondientes representan el \pm EE (n = 10).

Entre mayor es la acumulación de azúcares los valores de los Ψ_0 son más reducidos, tanto en VS-22 como en AMCCG-2. La acumulación de la glucosa es mayor comparada con la acumulación de fructosa y sacarosa, posiblemente por ser la glucosa un requerimiento de energía básica para el crecimiento de las plantas. La acumulación y la distribución de azúcares solubles en la lámina foliar de VS-22 y AMCCG-2 fueron variables. Mientras que las plantas de maíz

bien irrigadas (testigo) mostraron valores de Ψ_0 alto y escasa acumulación de los azúcares mencionados.

La variedad VS-22 acumuló mayor cantidad de azúcares solubles en condicione de estrés hídrico, y la glucosa fue el monosacárido con mayor concentración ($10.4 \text{ mg.g}^{-1} \text{ PF}$) seguido de la fructosa ($7 \text{ mg.g}^{-1} \text{ PF}$) y por último el disacárido sacarosa ($7.44 \text{ mg.g}^{-1} \text{ PF}$). La respuesta de AMCCG-2 en la acumulación de solutos fue menor por efecto del déficit de agua, se obtuvieron valores menores de glucosa de $5.6 \text{ mg.g}^{-1} \text{ PF}$, seguido de fructosa con $3.51 \text{ mg.g}^{-1} \text{ PF}$ y sacarosa con $3.16 \text{ mg.g}^{-1} \text{ PF}$.

En la Figura 3D se muestra la acumulación de los tres azúcares identificados; glucosa, fructosa y sacarosa a las siete semanas (DE) de déficit hídrico. En esta condición es interesante resaltar que la concentración de sacarosa en hoja de VS-22 fue de $6.2 \text{ mg.g}^{-1} \text{ PF}$ versus $3.1 \text{ mg.g}^{-1} \text{ PF}$ en AMCCG-2, representando un incremento de 35% para VS-22, la cual es una variedad tolerante a la sequía que acumula mayor cantidad de solutos; mientras que AMCCG-2 se incrementó solo un 12%, posiblemente debido a que es una variedad susceptible a la escasez de agua. Esta respuesta sugiere que las especies vegetales, e incluso variedades (como en este caso) tienen una respuesta diferente en cuanto a la acumulación de diversos osmolitos aun cuando las condiciones ambientales de desarrollo sean similares.

En la Figura 4 se observan incrementos distintos en la acumulación de azúcares totales en las variedades VS-22 y AMCCG-2 sujetas a déficit de agua. En las plantas testigo los azúcares totales registraron valores más bajos en ambas variedades.

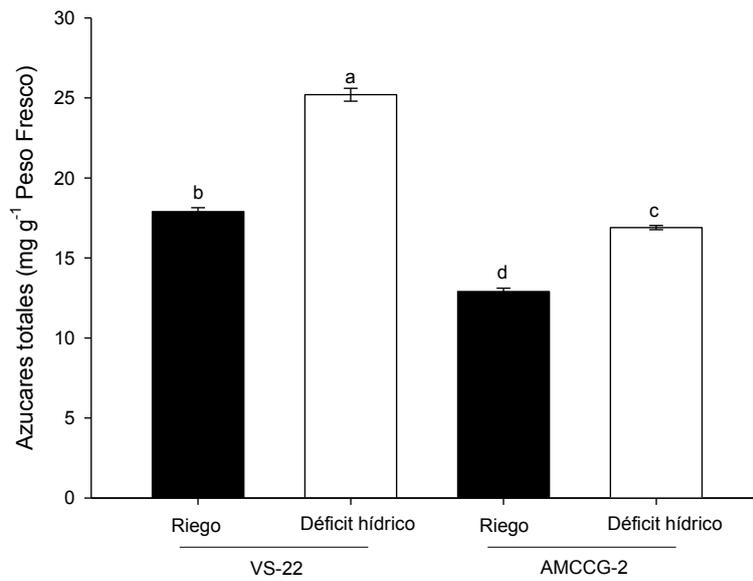


Figura 4. Efecto de déficit hídrico en la acumulación de azúcares totales (mg.g⁻¹ PF) en hojas de maíz de dos variedades de maíz VS-22 y AMCCG-2 en estrés hídrico (riego, sequia). Las columnas representan el promedio de 10 repeticiones

La Figura 5 muestra que el déficit de agua produjo alteraciones en la acumulación de almidón en las variedades de maíz VS-22 y AMCCG-2. La concentración de almidón disminuyó hasta 6.2 mg.g⁻¹ PF en VS-22 y 5.4 mg.g⁻¹ PF en AMCCG- 2; mientras que la concentración de este polisacárido de reserva en plantas en condiciones de riego presentó valores de 10.7 mg.g⁻¹ PF en VS-22 y 9.9 mg.g⁻¹ PF para AMCCG-2.

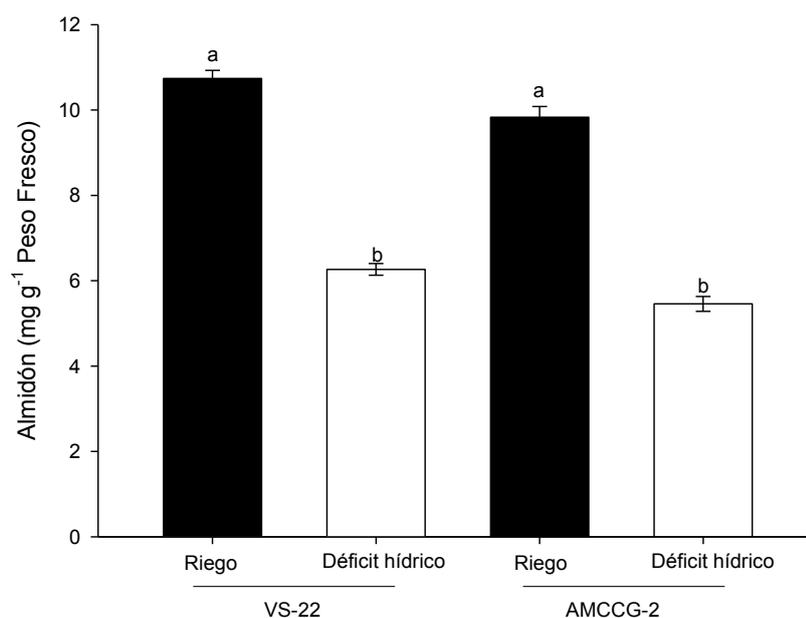


Figura 5. Efecto del déficit hídrico en la acumulación de almidón (mg.g⁻¹ PF) en hojas de dos variedades de maíz VS-22 y AMCCG-2. Las columnas representan el promedio de 10 repeticiones.

La obtención de valores bajos de almidón en plantas sometidas a estrés hídrico puede deberse a la demanda intensiva de los productos de hidrólisis (solutos) del polisacárido que requieren estas plantas sometidas a déficit de agua, sobre todo en la variedad VS-22.

En la Figura 6 se evidencia la presencia y la acumulación de la trehalosa en las variedades de maíz VS-22 y AMCCG-2 en condiciones de estrés hídrico y con riego cercano a capacidad de campo. El déficit de agua en VS22 provocó incrementos en los valores de este disacárido hasta de 29 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ PF, mientras que en las plantas de la misma variedad mantenidas en riego la acumulación de la trehalosa mostró valores ($7.1\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ PF) muy bajos, indicando un incremento de 24% de trehalosa en las plantas con déficit hídrico.

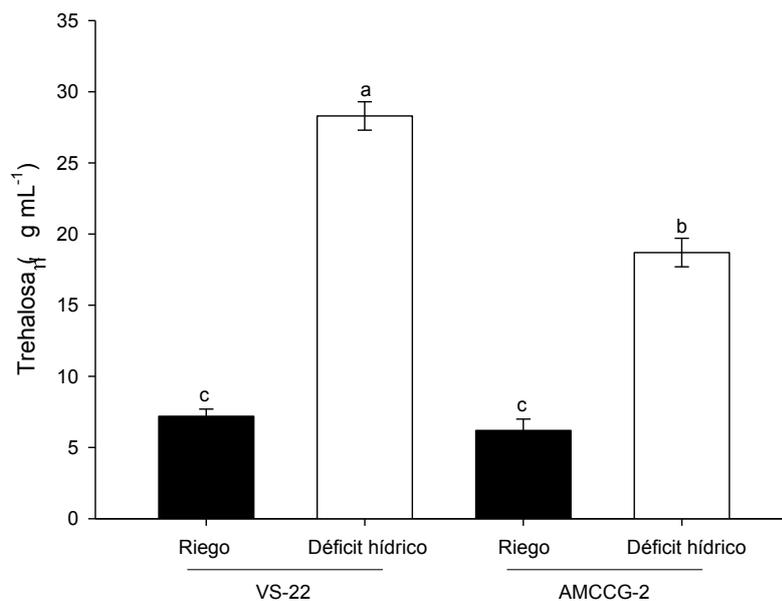


Figura 6. Efecto del estrés hídrico en la acumulación de trehalosa ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) en las variedades de maíz VS-22 y AMCCG-2 con estrés hídrico. Columnas negras riego y blancas sequía. Las columnas muestran las barras de error y las medias correspondientes representan el \pm EE (n = 10).

A pesar de que la variedad AMCCG-2 estuvo sometida al mismo grado de sequía que VS-22, la acumulación de trehalosa fue escasa ($6.3 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ PF), valores similares ($6.2 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ PF) se encontraron cuando las plantas de AMCCG-2 se mantuvieron en riego. Los valores de trehalosa aquí reportados en plantas tolerantes a sequía como lo es VS-22, pueden indicar síntesis del disacárido ante condiciones de estrés por agua.

En el cuadro 1 se presentan los cambios en la acumulación de prolina en hojas de ambas variedades de maíz sometidas a dos diferentes tratamientos de humedad. En condiciones de déficit hídrico la variedad VS-22 presentó una concentración de prolina de $22.3 \mu\text{moles g}^{-1}$ PF, mientras que en riego los valores fueron de $3.0 \mu\text{moles g}^{-1}$ PF. AMCCG-2 registró valores de $6.7 \mu\text{moles g}^{-1}$ PF en sequía y $2.1 \mu\text{moles g}^{-1}$ PF en condiciones de riego.

Cuadro 1. Acumulación de prolina ($\mu\text{moles g}^{-1}$ PF) en hojas de maíz de las variedades VS-22 y AMCCG-2 con diferente déficit de agua.

Variedad	Tratamiento	Prolina
VS-22	Riego	3.0 c
	Estrés hídrico	22.3a
AMCCG-2	Riego	2.1d
	Estrés hídrico	6.7b
DHS (TUKEY 0.05)		0.16

Los valores representan las medias \pm E.E (n=10). Las letras entre columnas indican diferencias estadísticamente significativas con $P \leq 0.05$

Los resultados de prolina indican que el déficit hídrico causó un incremento de 7.4 veces más de este compuesto comparado con el testigo de riego en la variedad VS-22, mientras que en la variedad AMCCG-2 el incremento fue 3.2 veces.

4.4. DISCUSIÓN

Los resultados indican que las plantas de maíz de las variedades VS-22 y AMCCG-2 crecidas en macetas y con diferente disponibilidad de agua, mostraron disminución del CRA hasta del 28 y 30 %; indicando que los valores porcentuales disminuyeron a medida que aumentó el déficit de agua a las seis semanas DE; resultados similares por Moussa (2008), quien reportó que el CRA de plantas de maíz está en función de la disponibilidad de agua. La reducción del CRA hasta del 30 % evidenciaron de manera confiable que las plantas se encontraban en estrés hídrico, según lo indicado por Turner, (1988). La sobrevivencia de las plantas de maíz y el mantenimiento de su crecimiento radica en su capacidad de ajustes fisiológicos y bioquímicos, o bien en su eficiencia de uso de agua ante esta condición de escasez de agua.

Una correlación positiva entre el CRA, potencial osmótico indica que el incremento en la transformación del aumento en la acumulación de solutos con un comportamiento de sigmoidea a exponencial, y con una disminución del Ψ_0 en ambas variedades, aunque esta respuesta de incremento en la acumulación de solutos fue menor en AMCCG-2. Esto nos sugiere un buen estado de hidratación de la planta debido a la acumulación de solutos y quizá un aumento en la tolerancia a la sequía.

En general, se considera que la acumulación de solutos es un indicador de ajuste osmótico. Estos resultados son similares a los encontrados por Blum (1996) quien encontró al igual que en el presente trabajo una reducción del Ψ_0 , y un incremento en la acumulación de solutos, como se muestra en la Figura 3. La acumulación de azúcares en las plantas como respuesta al estrés hídrico está ampliamente documentada en la literatura y se considera que esta

acumulación de solutos puede llevar a cabo el proceso del mecanismo de ajuste osmótico, y por consiguiente a la sobrevivencia de las plantas. Cuando se cuantificó la acumulación de hexosas en extracto crudo de hojas de maíz, se detectó incremento gradual de glucosa, fructosa y sacarosa en ambas variedades con tratamiento de déficit hídrico. Se demostró que la variedad VS-22 presentó mayor capacidad para acumular glucosa (57%), fructosa (20%) y sacarosa (49.6%) en comparación con AMCCG-2 que mostró acumulaciones menores de estos azúcares, ante la misma condición de déficit hídrico. Estos resultados concuerdan con los reportados por Nayer (2008), quien señaló que durante el proceso de estrés hídrico en plantas de maíz la acumulación de moléculas de hexosas se incrementa esto quizás se deba a el proceso de fotosíntesis y la degradación del almidón.

Estos resultados concuerdan con los encontrados en la presente investigación ya que se observó un incremento de glucosa y fructuosa. Mahajan y Tuteja (2005) indican que la acumulación de azúcares en hojas de haba en condiciones de estrés hídrico, se debe a un incremento en la actividad de la enzima invertasa. En cultivares de manzana se ha observado que hay una conversión de estas hexosas simples y otros azúcares como sacarosa y almidón en azúcares alcohol (Wang *et al.*, 1996). La función de estos polioles es principalmente retener las moléculas de agua permitiendo un mantenimiento de la turgencia celular en tejidos y de esta forma evitar la pérdida de agua (Wang *et al.*, 1995).

La acumulación de estos azúcares solubles en las dos variedades estudiadas sugiere que pueden tener un efecto protector sobre las células. Esto ha sido estudiado también por Valentovič (2006); y Dekankova *et al* (2004); quienes

encontraron incremento en la acumulación de azúcares en todos los órganos de maíz. El déficit hídrico provocó altos niveles de azúcares en las variedades estudiadas (Figura 3) y entre estos la mayor acumulación fue para la glucosa en VS-22, comparado con AMCCG-2. La glucosa es el principal monosacárido del proceso de fotosíntesis; y esto a su vez puede ser usado para ajustar la demanda de la planta para realizar ajuste osmótico y estabilización de la membrana; al parecer esta acumulación fue más eficiente para la variedad tolerante VS-22, ya que los aminoácidos y los azúcares solubles están considerados solutos orgánicos involucrados en el ajuste osmótico (Ullah *et al.*, 1993; Saneoka *et al.*, 1995; Lacerda *et al.*, 2001).

Los niveles altos de glucosa y fructosa en condiciones de déficit hídrico son indicadores de un metabolismo incrementado de la sacarosa, probablemente dirigido a la síntesis de almidón. Estos resultados indicaron que la acumulación preferente de glucosa en hojas de maíz VS-22 y AMCCG-2, son significativamente más altos que los de fructosa, y esto quizás se deba a la actividad de la sacarosa invertasa que fue más eficiente Cuellar, (2008) observó que cuando las plantas de frijol se someten a estrés hídrico durante la etapa de preantesis y llenado de grano, se acumula más fructosa y esto se debe a que la sacarosa se degrada preferentemente por la sacarosa sintasa; este mecanismo también se ha observado en *Arabidopsis thaliana* (Kleczkowski; 2003) A la fecha, existe poca información sobre las diferencias de las actividades de ambas enzimas en respuesta al déficit hídrico.

En las variedades VS-22 y AMCCG-2 se encontró una alta acumulación de fructosa, esto quizás se deba como un mecanismo de protección como respuesta al déficit hídrico (Santarius, 1973). Se ha sugerido que los fructanos

hidrolizados podrían disminuir el potencial hídrico del líquido intracelular y permitir la continua expansión foliar durante los períodos de sequía (Darbyshire, 1978).

Se ha encontrado que la planta *Festuca novae* sintetiza fructanos durante déficit hídrico prolongando, lo cual podría evidenciar que los fructanos actúan indirectamente al proporcionar carbono y energía para la síntesis de otros protectores e incrementar la presión osmótica. Las moléculas de fructosa podrían acumularse durante el crecimiento de planta y también cuando experimentan estrés de frío o déficit hídrico ligero (David, 2009), esto se debe a la alta concentración de sacarosa que es el resultado de la baja demanda respiratoria en órganos receptores bajo estrés. La enzima clave de la biosíntesis de fructanos, 1-SST, es inducida por un alto contenido de sacarosa que se acumula en la hojas de gramíneas (Woodson, 1987)

Los datos obtenidos en estos experimentos en relación a la acumulación de azúcares sugieren que la presencia de sacarosa y sus derivados representan las principales formas de carbono fotosintéticamente asimilado de las plantas. La sacarosa sintetizada en hojas verdes se exporta vía floema para proporcionar recursos de carbono y energía a los órganos no fotosintéticos. La sacarosa no sólo funciona como un metabolito de transporte, contribuye también a la fuerza osmótica para la translocación vía floema (flujo de masas) y sirve como señal para activar o reprimir genes específicos de tejidos. (Farrar *et al.* 2000; Foyer *et al.* 2003)

Los resultados aquí mostrados indican que la concentración de almidón durante el déficit hídrico en ambas variedades de maíz (Figura 5) Disminuyó hasta un 56.5% en VS-22 y un 63 % para AMCCG-2, mientras que en el

tratamiento de riego la concentración no disminuyó, y se mantuvo en niveles constantes 11.2 mg.g⁻¹ PF. Lo anterior ya se ha reportado por otros autores, presentando la tendencia de disminución en condiciones de déficit hídrico, la interpretación que se le ha dado es el resultado de la competencia con el disacárido sacarosa (Smith *et al.*, 2004), ya que un déficit hídrico moderado en maíz causó una reducción en el cociente de partición almidón/sacarosa lo que indica que la síntesis de almidón es más inhibida que la síntesis de sacarosa (Smith *et al.*, 2005).

La reducción en la fijación de carbono y la inhibición de la actividad fotosintética por sequía también altera el equilibrio metabólico de los carbohidratos. Para las plantas, la regulación basada en los carbohidratos representa un mecanismo valioso para ajustarse al cambio ambiental (Koch, 1996). Se ha reportado que un incremento en los transcritos de β -amilasas bajo sequía sugiere que cuando los niveles de fotosíntesis caen, los carbohidratos almacenados como almidón pudieran ser movilizados de los cloroplastos. Esto podría explicar el incremento en los niveles de glucosa observados para VS-22 y AMCCG-2, siendo el más afectado la variedad susceptible en la acumulación de almidón, esto quizá se deba a que no se está sintetizando moléculas de glucosa.

La acumulación de Prolina se evidenció de manera contundente en plantas que crecieron en condiciones de déficit hídrico durante siete semanas, este compuesto se acumuló en un 85 % en VS-22 versus 22.5 % en plantas con riego, AMCCG-2 acumuló el 65% de Prolina versus 22.5% en riego, estas diferencias fueron significativas ($P \leq 0,05$) entre variedades y tratamientos. Lo anterior puede indicar que la acumulación alta de Prolina en plantas con estrés de agua produce una movilización más eficiente de este aminoácido, lo cual es

importante para mitigar agobio por déficit de agua y mantener el potencial de turgencia, para que las células puedan mantenerse creciendo. Se sabe que la prolina es uno de los aminoácidos que está ampliamente involucrado en la respuesta a diferentes estreses ambientales particularmente salinidad y déficit hídrico (Trovato *et al.*, 2008).

El aumento de azúcares y aminoácidos en plantas con déficit hídrico están considerados como los principales constituyentes de ajuste osmótico, lo que presumiblemente resulta de una diferencia en la tasa de fijación de carbono y la tasa de exportación (Turner *et al.*, 1980; Yoshiba *et al.*, 1997; Mundree *et al.*, 2002; Chaves, 2004), aunque las bases de las diferencias entre cultivares aún no está claro.

También hay otras moléculas orgánicas como betaina y glicina, que participan en la estabilización de las membranas y enzimas durante la condición de estrés. Se ha descrito que la acumulación de este aminoácido (Prolina) en condiciones de estrés, se presenta como una respuesta adaptativa y es común en varios organismos tan diversos como eubacterias, algas, invertebrados hasta protozoos (Delaunay y Verma 1993).

En condiciones de riego la acumulación de trehalosa en VS-22 y AMCCG-2 estuvo presente en concentraciones muy bajas, porque en la naturaleza una acumulación de trehalosa actúa como mecanismo de tolerancia a sequía, los bajos niveles de esta azúcar se debe a que no están sintetizando trehalosa debido a la baja funcionalidad de la enzima de la trehalasa (Gamez, *et al.*, 2004); sin embargo, el déficit hídrico en VS-22 provocó un incremento notable del 74% de trehalosa, con respecto a AMCCG-2 (Figura 6). Esta respuesta ha sido también observada por Deyanira (2012), pero en plantas modificadas en la

biosíntesis de trehalosa, aunque los hallazgos encontrados no fueron significativos.

En el reino vegetal la mayoría de las especies vegetales no acumulan cantidades considerables de trehalosa, a excepción de las plantas de resurrección como *Selaginella lepidophila*, por ser altamente tolerables a sequía por periodos prolongados, (Zentella *et al.*, 1999). La trehalosa se encuentra en algunas plantas en concentraciones milimolares, sin embargo en los tratamientos con déficit hídrico, sobre todo en VS-22 la proporción fue de 3:1 con respecto a las plantas en condiciones de riego, el aumento de trehalosa fue significativo en ambas variedades estudiadas.

Otros estudios realizados han mostrado que la aplicación exógena de trehalosa juega un papel importante en la fotosíntesis, ya que su función es proteger el aparato fotosintético (Zeid, 2009).

Los resultados de este trabajo sugieren que la acumulación de los diferentes solutos cuantificados en plantas de maíz sometidas a déficit de agua, puede estar involucrada en el mecanismo de ajuste osmótico, y en mayor grado y con mejor respuesta a esta condición abiótica en la variedad VS-22. Estos mecanismos de adaptación también se han observado en organismos unicelulares y pluricelulares (Serraj y Sanclair, 2002); se ha visto que la acumulación de dichos solutos en su mayoría en el citoplasma pueden proteger a las membranas celulares, proteínas y procesos metabólicos, así como también preserva la estructura subcelular de los daños que puede causar en determinado momento la deshidratación de las células (Rodes, 1995 y Rathinasabapathi, 2000).

Se encontró una diferencia clara en el mantenimiento del CRA, disminución del potencial osmótico y acumulación de solutos entre las dos variedades de maíz. La variedad VS-22 fue la que mejor respuesta tuvo cuando se expuso a condiciones de déficit hídrico

LITERATURA CITADA

- Araus, J.L., Slafer, G.A., Reynolds, M.P., Royo, M.A.J., 2002. Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for? *Annals of Botany*, 89, 925-940.
- Azevedo, N.A.D., Tarquinio, P.J., Enéas-Filho, J., Feitosa, C., Lacerda, Vieira S.J., Alves C.P.A., Gomes-Filho. E., 2004. Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. *Braz. J. Plant Physiol.*, 16,31-38.
- Bradford, MM., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254
- Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J.P., Rodríguez, M.L., Ricardo, C.P.P., Osorio, M.L.,Faria, I.T., Pinheiro, C., 2002. How plants cope with water stress in the field:photosynthesis and growth. *Ann. Bot.* 89, 907–916.
- Dekánková, K., Luxová, M., Gašparíková, O., Kolarovič, L., 2004. Response of maize plants to water stress. *Biologia*, 59/Suppl. 13,151–155.
- Delanauney, A.J., Verma, D.P.S., 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4, 215–223.

- Demiral, T. and İ. Türkan. 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environ. Exp. Bot.*, 53: 247-257.
- Farrar, J.F., Jones, D.L., 2000. The control of carbon acquisition by roots. *New Phytol.* 147,43-53.
- Jhonstan, M, Kim J.H., 2005. Glucose as a hormone receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Sacharomyces cerevisiae*. *Bioche Soc. Trans.* 33,247-52
- Koca, H., M. Bor, F. Özdemir and İ. Türkan. 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environ. Exp. Bot.*, 60: 344-351.
- Konstantinova T, Parvanova D, Atanassov A, Djilianov D: Freezing 2002. Tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectants. *Plant Sci* , 163,157-164
- Kumar, S.G., A.M. Reddy and C. Sudhakar. 2003. NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. *Plant Sci.*, 165: 1245-1251.
- Lacerda, C.F, Cambraia, J., Cano, M.A.O., Ruiz, H.A., 2001. Plant growth and solute accumulation and distribution in two sorghum genotypes, under NaCl stress. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 13,270-284.
- Lacerda, C.F., Cambraia, J., Oliva, M.A., Ruiz H.A., Prisco, J.T., 2003. Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. *Environ. Exp. Bot.* 49, 107-120.

- Lacerda, C.F., Cambraia, J., Oliva, M.A., Ruiz, H.A., 2005. Changes in growth and in solute concentrations in sorghum leaves and roots during salt stress recovery. *Environ. Exp. Bot.*, 54, 69-76.
- Mahajan, S., Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of biochemistry and Biophysics*. 444,139-159.
- Mansour, M.M.F., K.H.A. Salama, F.Z.M. Ali, and A.F.A. Hadid. 2005. Cell and plant responses to NaCl in *Zea mays* L. cultivars differing in salt tolerance. *Gen. Appl. Plant Physiol.*, 31: 29-41.
- Misra, N. and A.K. Gupta. 2005. Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram. *Plant Sci.*, 169: 331-339.
- Mundree, S.G., Baker, B., Mowla, S., Peters, S., Marais, S., Wilingen, C.V., Govender, K., Maredza, A., Muyanga, S., Farrant, J.M., Thomson, J.A. 2002. Physiological and molecular insights into drought tolerance. *Afr. J. Biotechnol.* 1,28–38.
- Putseys, J.A., Lamberts, L., Delcour, J.A., 2010. Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties. *Journal of Cereal Science* 51, 238-247.
- Rathinasabapathi B.,2000. Metabolic engineering for stress tolerance: installing osmoprotectant synthesis pathways. *Annals of Botany* 86,709–716.
- Rhodes, D., Samaras, Y., 1994. Genetic control of osmoregulation in plants. In *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation* (ed. K. Strange), pp. 347–361. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Saneoka, H., Nagasaka, C., Hahn, D.T., Yang, W.J., Premachandra, G.S., Joly, R.J., Rhodes, D., 1995. Salt tolerance of glycinebetaine-deficient and -containing maize lines. *Plant Physiol.* 107,631-638.

- Serraj, R., Sincalir, T.R., 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant Cell and Environment*. 25, 333-41.
- Smith, A., Zeeman S., Smith, S., 2005. Starch Degradation. *Annual Review in Plant Biology* 56, 73-98.
- Smith, S.M., Fulton,D.C., Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Dunstan, H., Hylton, C., Zeeman, S.C., Smith A.M., 2004. Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* 136, 2687–2699
- Suchuller, H.J., 2003. Transcriptional control of no fermentative metabolism in yeast *Sachoromyces cereviceae*. *Current Genetic* 43,139-60
- Trovato, M., Mattioli, R., Costantino, P., 2008. Multiple Roles of Proline in Plant Stress Tolerance and Development. *Rendiconti Lincei* 19,325-346.
- Turner, N. C ., Jones, M. M. 1980. Turgor maintenance by osmotic adjustment: A review and evaluation. See Ref. S, pp. 1 55-72.
- Ullah, S.M., Soja, G., Gerzabek M.H., 1993. Ion uptake, osmoregulation and plant-water relations in faba beans (*Vicia faba*, L.) under salt stress. *Die Bodenkultur* 44,291-301.
- Umezawa, T., Fujita, M. Fujita Y, Yamaguchi, S. K. 2006. Engineering drought tolerance in plants:discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr Opin Biotechnol* 17,113-122.
- Umezawa, T., Yoshida, R., Maruyama, K. Yamaguchi, S.K. 2004. SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene

- Valentovič, P., Luxová, M., Kolarovič, L., Gašparíková, O., 2006. Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relations in two maize cultivars. *Plant Soil Environ.* 52,186–191.
- Veeranagamallaiah, G., Chandraobulreddy, P., Jyothsnakumari, G., Sudhakar, C., 2007. Glutamine synthetase expression and pyrroline-5-carboxylate reductase activity influence proline accumulation in two cultivars of foxtail millet (*Setaria italica* L.) with differential salt
- Woodson, W.R. and Wang, H. 1987 Invertases of carnation petals. Partial purification, characterization and changes in activity during petal growth, *Physiol. Plant.* 71, 224–228.
- Yancey, P.H., M.E. Clark, S.C. Hand, R.D. Bowlus and G.N. Somero, 1982. Living with water stress: Evolution of osmolyte system. *Science*, 217: 1214-122.
- Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 1997. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiol.* 38, 1095–1102.
- Zeid, I. M., 2009: Trehalose as osmoprotectant for maize under salinity-induced stress. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 5,613–622.
- Zentella, R., Mascorro J.O., Dijck, P.V., Folch J.M., Bonini, B., Van, C., A., 1999. *Selaginella lepidophylla* Trehalose-6-Phosphate Synthase Complements Growth and Stress-Tolerance Defects in a Yeast *tps1* Mutant. *Plant Physiology.* 1473-1482.
- Zhang, J., Nguyen, H.T., Blum, A., 1999. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *Journal of Experimental Botany* 50,291–302.

Zhang, J., Primavesi, L.F., Jhurrea, D., Andralojc, P.J., Mitchell, R.E., Powers, S.J., Schluemann, H., Delatte, T., Wingler, A., Paul, M.J., 2009. Inhibition of SNF1-related protein kinase 1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiology* 149, 1860-71.

CAPÍTULO 5

CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS EN ÁPICE DE RADÍCULA Y HOJA DE MAÍZ (*Zea mays* L.) E INMUNODETECCIÓN DE RUBISCO.

RESUMEN

Se caracterizaron proteínas solubles del ápice de la radícula y de la 6a hoja de dos variedades de maíz con fenotipo contrastante. Las radículas con 24 h de germinación se sometieron a estrés hídrico durante 24, 48 y 72 h, y para hoja de plantas de maíz se estableció un experimento en condiciones de invernadero, sometido a estrés hídrico y en condiciones de riego. Los resultados indicaron una mayor acumulación de proteínas solubles en las plantas bien irrigadas (testigo) para ambas variedades evaluadas. Mientras que las plantas sometidas a déficit hídrico mostraron menor acumulación. Por otra parte, la cuantificación de proteínas del ápice de la radícula de maíz sujeta a un potencial de agua del sustrato de -1.5 MPa mostró diferencias significativas ($P \geq 0.05$) al comparar VS-22 (4 mg.g^{-1}) y AMCCG-2 (5.7 mg.g^{-1}). En los análisis electroforéticos se detectaron 28 bandas del ápice de radículas de maíz en ambas variedades, con variación en la intensidad de bandas entre tratamientos a -1.5 MPa y a los 72 h, mientras que en hoja se encontraron 14 bandas tanto en riego como en sequía, la variación se reflejó en la intensidad de las bandas, los gels mostraron bandas de 55 KDa y de 33 KDa que han sido reportadas por otros autores en plantas de *Phaseolus vulgaris*, *Zea mays*.

Se inmunodetectó la Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO, 55 KDa), que es una proteína crucial para las funciones biológicas de las plantas, sin embargo cuando las plantas de maíz se sometieron en condiciones de déficit hídrico la proteína disminuyó 20% en VS-22 y 35% en AMCCG-2,

comparado con las plantas bien irrigadas (100%), y se evidenció que la variedad susceptible fue la más afectada por el déficit de agua.

5.1. INTRODUCCIÓN

La sequía es un factor importante de estrés ambiental que afecta al crecimiento y desarrollo de las plantas y este repercute en la pérdida del rendimiento de los cultivos en todo el mundo (Waraich *et al.*, 2011). Las bases fisiológicas y moleculares de respuesta de las plantas a la sequía han sido objeto de intensas investigaciones (Bartels y Sunca, 2005).

Una de las estrategias para contrarrestar los efectos del déficit hídrico en las plantas refiere a sujetarse a un proceso de aclimatación. Este proceso puede requerir cambios en el gen (Harb *et al.*, 2010,) y en los perfiles de expresión de proteínas, ya que pueden aumentar o disminuir según el tipo de estrés y genotipo de la planta (Bhushan *et al.*, 2007). Las proteínas solubles en las plantas juegan un papel importante en diversos mecanismos celulares, tales como metabolitos, iones de transporte y las respuestas a estreses abióticos y bióticos (Marmagne *et al.*, 2004).

Por lo tanto el análisis de expresión de proteínas solubles es relevante para nuestra comprensión de varias funciones en la vida incluyendo mecanismos de tolerancia al estrés. Sin embargo a pesar de décadas de extensa investigación el análisis a gran escala de proteínas solubles sigue siendo una tarea difícil (Rabilloud, 2004).

En este trabajo se utilizó SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes, para el análisis de proteínas solubles aunque solo puede analizar un número limitado de proteínas en comparación con otros métodos (Towbin, 1979; Wagner, 2008), se utilizó este método para la identificación de proteínas en radículas y plantas de maíz (*Zea mays* L.), con diferentes condiciones de estrés hídrico.

Las proteínas son moléculas compuestas por cadenas de aminoácidos algunas de sus propiedades es que son solubles en agua, se encuentran distribuidas en toda la célula (Taiz y Zeiger, 2010). Las proteínas se han agrupado en varias clasificaciones de acuerdo a su función y estructura.

La PEPCasa, es una enzima que se encuentra distribuida en las células vegetales, bacterias fotosintéticas (Matsumura *et al.*, 1999), algas y cianobacterias. Esta enzima se encarga de fijar las moléculas de carbono. En plantas de maíz, se encarga de la descarboxilación del aspartato y malato en las células de haz vascular (Wingler, 1999; Wang *et al.*, 2014).

Rubisco es la principal proteína de estroma en la mayoría de las plantas, es oligomérica y se compone de ocho subunidades grandes y ocho pequeñas. Durante la fotosíntesis su sitio catalítico situado en la subunidad grande se combina con CO₂ con la ribulosa 1,5 bifosfato para formar glicerato 3 fosfatos, esta se reduce a triosa fosfato con NADPH y ATP generado por la cadena transportadora de electrones. Con el fin de catalizar la fijación de CO₂ a tasa elevadas, se necesitan grandes cantidades de RUBISCO para compensar la velocidad catalítica (Bai *et al.*, 2011).

En la actualidad los estudios se han centrado en la respuesta del maíz al déficit de agua (Hu *et al.*, 2010; 2011). Aunque el efecto de la sequía sobre la expresión de la proteína en las plantas ha sido estudiado, aún se sabe poco acerca de los cambios de las proteínas en plantas en condiciones de déficit hídrico (Komatsu, 2008). El objetivo de este estudio fue determinar los cambios diferenciales de las proteínas en radícula y hoja en respuesta al déficit hídrico de dos variedades de maíz con fenotipo contrastante

5.2. MATERIALES Y METODOS

5.2.1. Ápice de la Radícula de maíz

Se utilizó como sustrato vermiculita grado 1, lavada con abundante agua y se secó en una estufa a 115 °C por 72 h. Posteriormente se pesaron 100 g de vermiculita y se colocaron en bolsas de plástico y se les agregó 10, 12.5 y 100 mL de agua destilada, se sellaron y se incubaron por 48 h para homogenizar el contenido de humedad. Transcurrido este tiempo se determinó el potencial de agua (Ψ_A) de la vermiculita para cada uno de los volúmenes de agua adicionado, incubando una muestra de éstas en cámaras psicométricas (Wescor C-52 Inc, Utha, USA) por 4 h, y conectadas a un microvoltímetro de punto de rocío (Wescon HR-33T Inc, Utha, USA). Los valores de Ψ_A obtenidos fueron -1.5, -1.0 y -0.03 MPa, respectivamente.

Se seleccionaron semillas de forma y tamaño homogéneo y se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial (Clorox®) al 10 %, durante 15 min. Las semillas fueron germinadas en charolas con una cama de algodón y con una inclinación de 35° por 48 h, a una temperatura de 25±1 °C y en condiciones de oscuridad (Ellis *et al.*, 1985), este fue un tiempo suficiente para que la radícula principal alcanzará una longitud de 35 a 40 mm en promedio. En ese momento, la radícula de cada plántula se marcó con tinta china a 2.0 mm desde el ápice. Posteriormente las plántulas fueron trasplantadas en tubos de cloruro de polivinilo (PVC) de 40 mm de diámetro interno y 100 mm de longitud, contenían vermiculita grado 1, las plántulas fueron sometidas a tres potenciales de agua (Ψ_A); -0.03 (testigo), -1.0 (déficit de agua intermedio) y -1.5 MPa (déficit de agua severo). Cada tubo fue sellado en sus extremos con polietileno negro y

ajustado con una banda elástica, con el fin de mantener constante (en lo posible) el Ψ_A de la vermiculita, y se mantuvieron en crecimiento por 24, 48 y 72 h en la oscuridad a una temperatura de 25 ± 1 °C.

Transcurrido el tiempo correspondiente se desarmó el sistema de tubos PVC y las radículas fueron recolectadas, y se cuantificó el desplazamiento de los segmentos de 2 mm marcados previamente. Los segmentos se colectaron y se almacenaron a -36 °C para estudios posteriores.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial de tratamientos, en el que los factores y los niveles fueron: las variedades (AMCCG-2 y VS-22), los potenciales (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa), y el tiempo de crecimiento (24, 48, 72 h). Las unidades experimentales fueron grupos de 6 plántulas con 10 repeticiones de dos experimentos independientes. Se realizaron análisis estadísticos en SAS (versión 9.0) y una comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

5.2.2 Plantas de maíz

Las semillas de maíz fueron germinadas en charolas de plástico por 48h a una temperatura de 25 ± 1 °C con una inclinación de 35° en condiciones de oscuridad. Después de la germinación las semillas fueron transferidas a macetas de plástico de 4 litros de capacidad, el sustrato fue una mezcla de suelo de hojarasca y peat moss, en una proporción (2:1) esterilizado.

El experimento se realizó en condiciones de invernadero. Se aplicaron dos tratamientos de humedad: riego (humedad constante en el sustrato) y sequía (estrés gradual de riego); seis días después de la emergencia el tratamiento de sequía se aplicó durante siete semanas mediante la adición del 50% de agua

utilizada por la planta basados en el peso total de la maceta, este régimen fue aplicado tres veces por semana durante siete semanas, y después del tratamiento se recolectaron muestras de la 6^a hoja ligulada y totalmente expandida.

Los segmentos de la parte media de cada hoja fueron colectadas, congeladas en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

5.2.3 Extracción de proteínas

Se pesaron 300 mg de ápice de radícula y de hojas de las variedades de maíz AMCCG-2 y VS-22. Las muestras se trituraron en un mortero con buffer de extracción (40 mM Tris H-Cl 40, pH=8.5, 1 mM Fluoruro de fenil sulfonil y 15 mM de β -mercaptoetanol), los extractos se colocaron en tubos eppendorf y se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C por 10 min, después se desechó la pastilla y se colectó el sobrenadante, y de ahí se realizó la determinación de proteínas solubles usando el método de Bradford (1976).

5.2.4. Separación de proteínas en condiciones desnaturizantes

Las proteínas solubles extraídas de plantas de maíz fueron separadas en geles discontinuos en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), se utilizó una unidad de electroforesis PROTEAN II (Diagnocell), usando gel concentrador al 4% y el gel separador para proteínas al 12% (Laemli.1970). La separación de proteínas se realizó a 95 V por 3.5 h en un buffer de electroforesis. Los geles fueron teñidos con azul de coomasie Blue R-250 para visualizar la intensidad relativa de las bandas. Se incluyó un kit de proteínas marcadoras (preteñidas)

de peso molecular (PM) conocido (Protein estándar Bio-rad), para conocer el PM de las proteínas separadas en las muestras en experimentación.

5.2.5 Inmunodetección

Para el inmunoblot, los geles de las proteínas separadas sin teñir fueron electrotransferidas a membranas de nylon cargadas positivamente de 0.2 μm (Mini Trans-Blots), se utilizó una fuente de poder a 250 mA por 2h en un buffer de transferencia (25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina y 20% de metanol V/V) (Towbin *et al.*, 1979).

Para la inmunodetección primero se bloqueó la membrana embebida en una solución de bloqueo (5 % de leche desengrasada “Sveltis” en 248 mM de Tris pH 7.4; 150 mM de NaCl y 0.5% de Tween 20) por dos horas en agitación suave constante. Posteriormente, a la membrana se le realizaron tres lavados de 8 minutos con TBS-T y NaCl al 5%, después se incubó la membrana por dos horas con el primer anticuerpo (anti-Rubisco, Anticonejo subunidad grande, marca Abcam) diluido 1/4500 en TBS-T a temperatura ambiente y agitación suave y constante, después se realizaron tres minilavados de 8 minutos con TBS-T, la membrana fue incubada con el segundo anticuerpo policlonal acoplado a peroxidasa (Anticonejo diluido 1/10,000, marca Abcam) se incubó por dos horas a temperatura ambiente en agitación suave. Después se realizaron los lavados correspondientes. El procedimiento para la detección del antígeno en la membrana de nylon se realizó por Diaminobencidina (DAM Sigma) 1mg/10mL de PBS 20mM en presencia de peróxido de hidrógeno al 30%, por 7 minutos. Una vez reveladas las bandas se precipitaron y se lavaron con agua destilada por 5 minutos en agitación suave y en oscuridad.

5.2.6 Análisis estadístico

Para el caso de los ápices de las radículas se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos, en los que los factores y los niveles fueron: las variedades (AMCCG-2 y VS-22) y el Ψ_A del sustrato (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa). Las unidades experimentales fueron grupos de 40 a 60 radículas y se realizaron 10 repeticiones. Para el caso de las hojas fue el mismo diseño solo con dos tratamientos riego y sequía, las unidades experimentales fueron grupos de 6 plantas de maíz y se realizaron 10 réplicas. Se realizaron análisis estadísticos en SAS (versión 9.0) y una comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Para el análisis de la bandas, las membranas de nylon se escanearon y se guardaron como archivos electrónicos. El patrón de la masa molecular, así como la RUBISCO y el estándar de RUBISCO (Sigma) se determinaron utilizando la herramienta de medición de densidad en Imagen J (Imagine 1.34s; <http://rsbni.gov/ij>). La masa molecular del estándar de RUBISCO se estimó por análisis gráfico a través de distancias de migración de las proteínas marcadores de PM conocidos. Los efectos de los tratamientos de sequía y de riego fueron analizados comparando las respuestas con su respectivo control. Los geles y análisis de inmunoblots se repitieron tres veces. Se realizó un análisis estadístico de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$)

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteínas solubles en los ápices de las radículas y hojas de maíz de VS-22 y AMCCG-2 indicó diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos (Figura 1 y Figura 2) de riego vs sequía. En la Figura 1 se observa una respuesta diferencial en el contenido de proteína soluble en los ápices de las radículas de AMCCG-2 y VS-22, para los tres Ψ_A del sustrato (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa), a medida que el tiempo de tratamiento de sequía fue más largo el contenido de proteína resultó ser más afectado (24, 48 y 72 h). En condiciones de riego el Ψ_A de -0.03 MPa AMCCG-2 registro valores de 11.7 mg g⁻¹ PF, mientras que VS-22 registro un valor de 10.4 mg g⁻¹ PF, que indica una diferencia del 5 % menor en la variedad tolerante (VS-22).

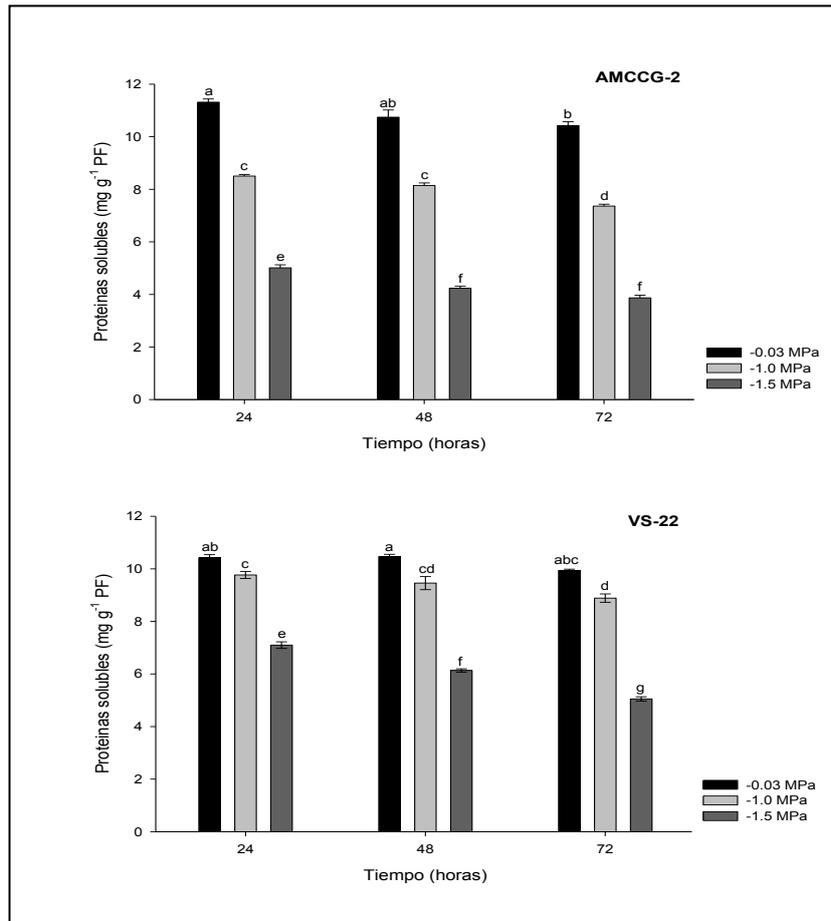


Figura 1. Efecto del déficit hídrico en el contenido de proteínas solubles ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PF) en el ápice de la radícula de dos variedades de maíz, crecidas en tres potenciales de agua del sustrato (-0.03, -1.0 y -1.5 MPa), y con diferentes periodos de incubación (24, 48 y 72 h). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$). Cada barra es el promedio de 10 repeticiones \pm E.E ($n = 10$).

Cuando se aplicó déficit de agua en el sustrato (Ψ_A -1.0 MPa) los ápices de las radículas de maíz de VS-22 con 72 h de incubación redujeron un 11% el contenido de proteína, mientras que AMCCG-2 disminuyó 30%. Cuando el potencial de agua del sustrato fue más severo de -1.5 MPa, el contenido de proteína disminuyó 2.6 veces en AMCCG-2, y solo 1.3 veces en VS-22 comparados con los testigos (-0.03 MPa). Los resultados indicaron que el

contenido de proteína soluble en ápices de radículas de VS-22 fue menos afectado por los diferentes niveles de déficit de agua

En lo que respecta al contenido de proteínas solubles en hojas de maíz (Figura 2) en condiciones óptimas de riego, al igual que en el caso de ápices de radícula se obtuvo mayor acumulación en la variedad AMCCG-2 (18.9 mg.g⁻¹ PF) versus VS-22 (16.4 mg.g⁻¹ PF)

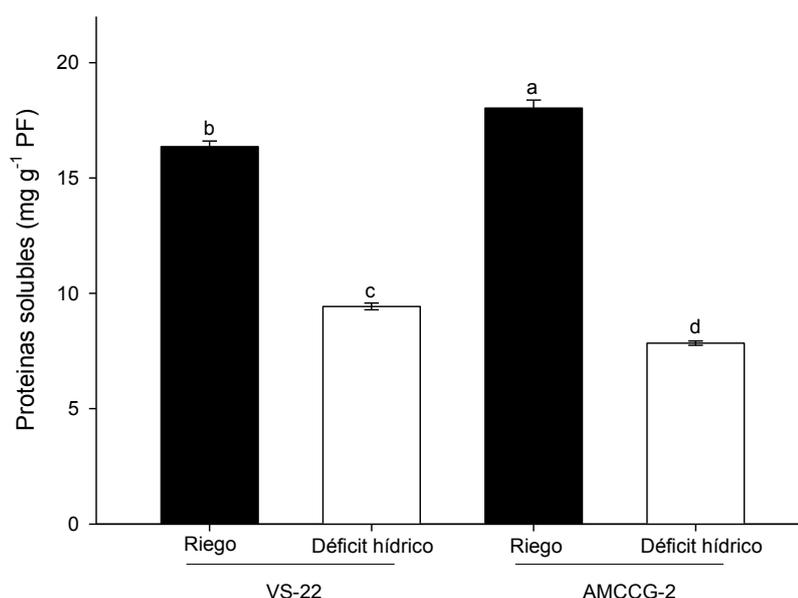


Figura 2. Efecto del déficit hídrico en el contenido de proteínas solubles (mg.g⁻¹ PF) en hojas de dos variedades de maíz, crecidas en riego y déficit hídrico. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$). Cada barra es el promedio de 10 repeticiones \pm E.E ($n = 10$).

En condiciones de déficit de agua el contenido de proteína disminuyó 48.2% en VS-22, mientras que AMCCG-2 disminuyó hasta 59.1%, en ambos casos con respecto al testigo (Figura 2) de la misma manera que en el ápice de la radícula, la variedad VS-22 fue la que presentó un mayor contenido de proteína soluble, comparado con AMCCG-2.

5.3.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturizantes (SDS). En ápices de radículas de maíz se detectaron alrededor de 29 bandas que están en un rango de 15 a 104 KDa, algunas de las proteínas detectadas y separadas en los geles (Figura 3.1) mostraron diferencias en la intensidad de bandas entre variedades y tratamientos, sin embargo, la banda de 36 KDa mostró diferencia significativa en su intensidad (Figura 3.2).

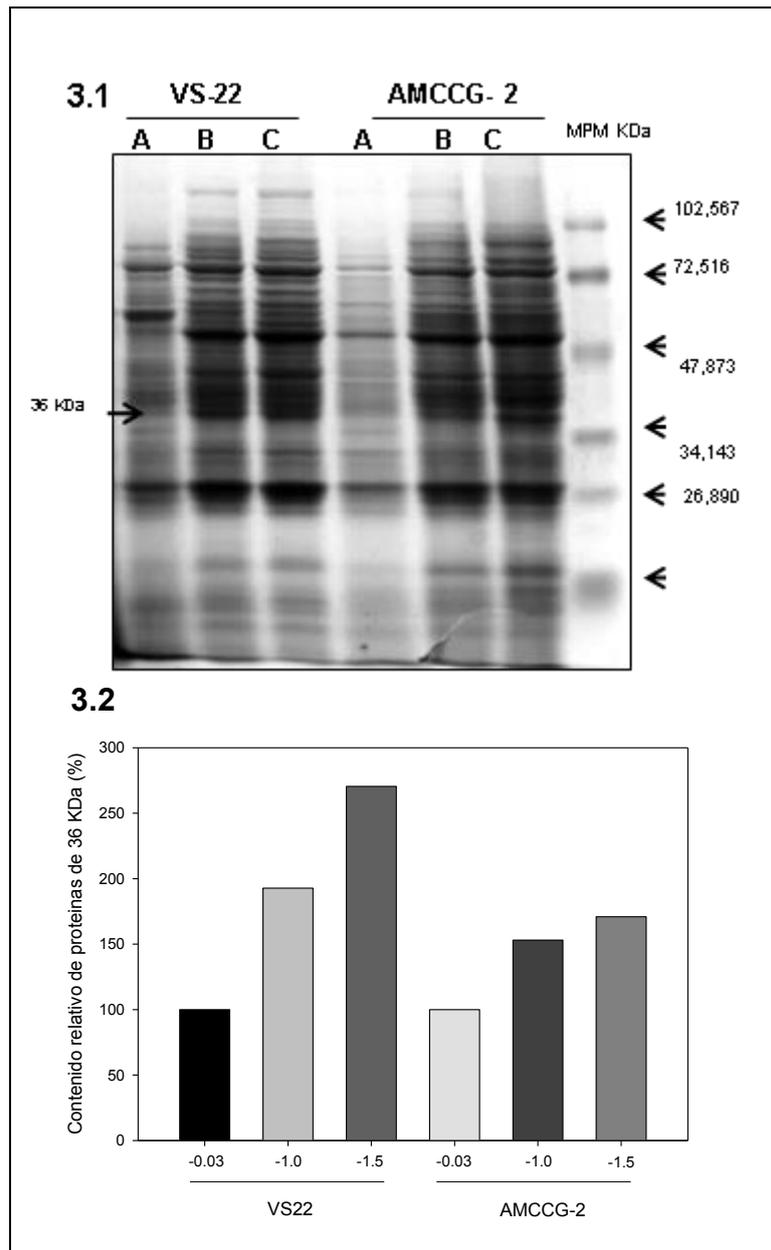


Figura 3.1. Patrón de proteínas de los ápices de las radículas en dos variedades de maíz, crecidas en diferentes potenciales de agua (Ψ_A) del sustrato (A,-0.03, B, -1.0 y C, -1.5 MPa) a 72h de incubación Las proteínas fueron separadas en geles de PAGE- SDS al 12 %, en todos los casos la concentración de proteína fue de 60 μ g por pozo. Figura 3.2.contenido relativo de proteínas con peso molecular de 36 KDa expresado en porcentaje de densidad óptica.

La proteína de peso molecular de 36 KDa detectada en las diferentes muestras de ápice de radícula se detectó con una mayor intensidad a medida que el estrés por sequía y tiempo de incubación se incrementaron, a las proteínas con

este PM se les ha identificado como dehidrinas (Colmenero-Flores, 1999), estas proteínas se han encontrado en plantas de frijol y están asociadas con un mayor grado de respuesta al estrés hídrico. VS-22 evidenció mayor grado de intensidad en estas bandas, con respecto a AMCCG-2 y después de 72 h de incubación.

En general, los patrones de proteínas observados en VS-22 vs AMCCG-2 fueron similares en las condiciones de humedad evaluadas. Sin embargo la cuantificación de la banda con PM de 36 KDa indicó mayor acumulación porcentual en la variedad VS-22, con potenciales de agua de -1.0 y -1.5 MPa (200 y 285 %, respectivamente), mientras que AMCCG-2 mostró una disminución de 150 y 177 %, respectivamente, fue evidente que AMCCG-2 fue más afectada por el déficit hídrico que VS-22 (Figura 3.2).

En la Figura 4.1 se muestra la separación de proteínas en el tejido de hoja de las variedades de maíz (VS-22 y AMCCG-2), después de siete semanas de déficit hídrico. Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en las proteínas de hoja entre variedades y tratamientos así como entre las proteínas con PM de 33 KDa que corresponden a las dehidrinas.

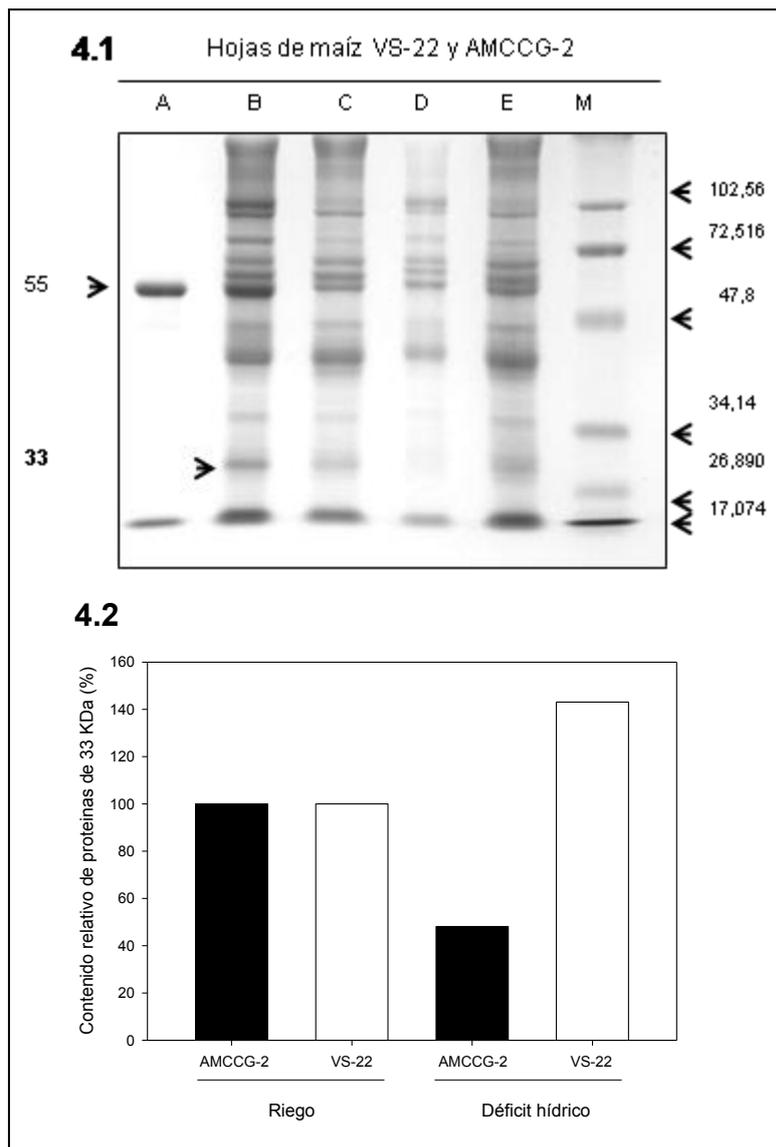


Figura 4.1 Separación de proteínas en gel de poliacrilamida SDS de hojas de dos variedades de maíz, con 7 semanas de déficit hídrico. A) Estándar de RUBISCO; B) Riego AMCCG-2; C) Riego VS-22; D) Sequía AMCCG-2; E) Sequía VS-22. En 4.2 contenido relativo de proteínas con peso molecular de 36 KDa expresado en porcentaje de densidad óptica

La Figura 4. 2 se observa que son claros los cambios en la intensidad relativa de la banda con PM de 33 KDa, y que posiblemente corresponda a una dehidrina, esta variación en la intensidad relativa se presenta cuando las

plantas estuvieron sujetas a déficit hídrico, en comparación con el testigo (riego, columnas B y C).

Se observó que los testigos de ambas variedades no mostraron diferencias significativas. Además se observó mayor acumulación de proteína en VS-22 con 150% vs (50%) de AMCCG-2.

Otra de las proteínas con alto grado de expresión en el tejido de hoja de las variedades de VS-22 y AMCCG-2, corresponde a la ribulosa bisfosfato carboxilasa oxigenasa (RUBISCO), la cual es una proteína que a nivel de geles desnaturizantes se separa en dos subunidades; la subunidad grande con un PM de 55 KDa y la subunidad menor con un PM de 13.5 KDa. Ambas subunidades fueron evidenciadas en la Figura 4. 1, su presencia se observa con diferencias en la intensidad relativa, y que está en función del tratamiento de déficit de agua al que fueron sometidas ambas variedades de maíz. Para determinar si el estrés inducido o la tolerancia a la sequía se encuentra relacionado con la acumulación de la RUBISCO, así como de su identificación con alto grado de confiabilidad, se procedió al uso de la técnica de inmunodetección tipo "Western blot", utilizando los geles de proteínas de las hojas de maíz sometidas a diferentes niveles de déficit de agua. En la Figura. 5.1 se observa la presencia de la RUBISCO detectada con el anticuerpo específico de la misma proteína de origen vegetal (espinaca), su grado de expresión es variable en mayor o menor grado, y esto está influenciado por el grado de déficit de agua en las plantas de VS-22 y AMCCG-2. El contenido de RUBISCO disminuyó significativamente en hojas de plantas estresadas de la variedad AMCCG-2, comparada con las hojas de las plantas con riego de la misma variedad.

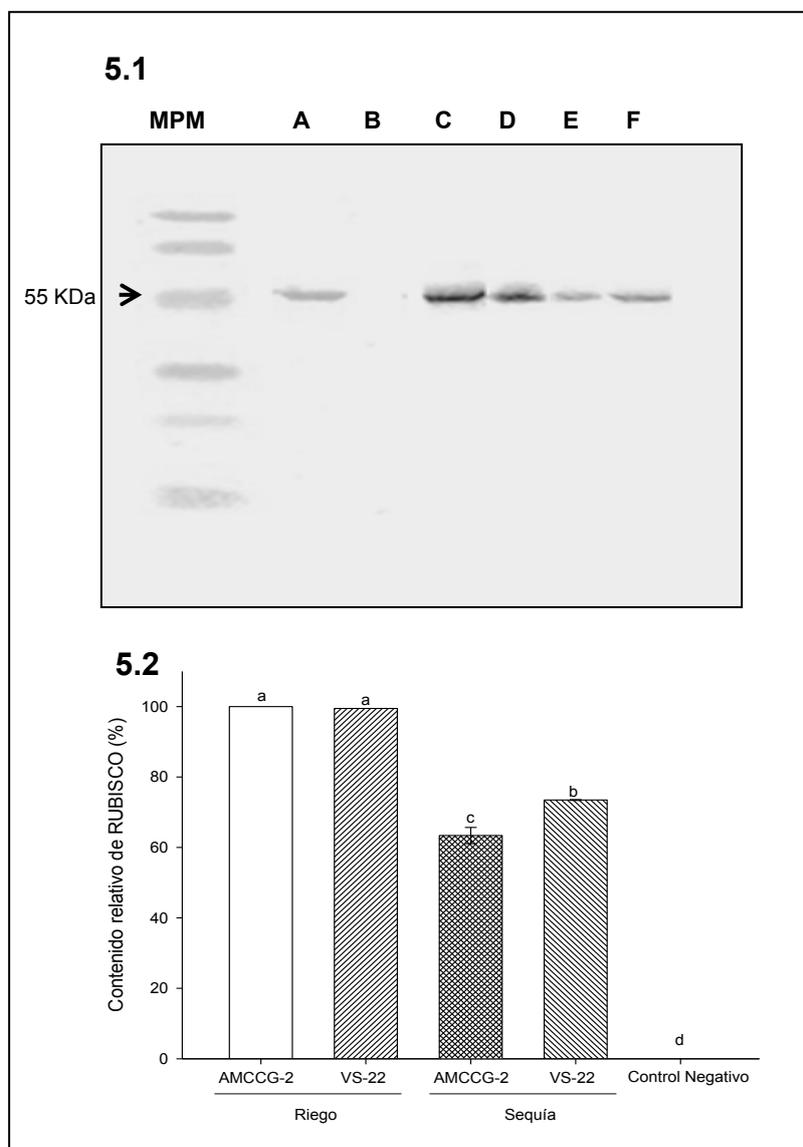


Figura 5. 1 Inmunodetección de la subunidad mayor de la RUBISCO (Western Blot) en hojas de maíz VS-22 y AMCCG-2 en condiciones de riego y sequía. 5.2. Porcentaje de la subunidad mayor de Rubisco en las hojas de maíz de AMCCG-2 y VS-22. A) RUBISCO purificada, B) Testigo negativo, C) Riego susceptible, D) Riego tolerante, E) Sequía susceptible, F) Sequía tolerante. Los datos son el promedio de 3 repeticiones \pm E.E (n=3).

La inmunodetección indicó que la subunidad mayor de RUBISCO con un PM de 55 KDa se presentó en todos los tratamientos para ambas variedades, los niveles de expresión fueron más altos en las plantas bien irrigadas, en comparación con las condiciones de estrés y la expresión de esta proteína disminuyó en ambas variedades. La densidad de RUBISCO disminuyó 35 % para AMCCG-2, mientras que en VS-22 la densidad fue menos afectada y solo disminuyó un 18% (Figura 5.2)

5.4. DISCUSIÓN

5.4.1 Proteínas solubles

En nuestro estudio hemos observado que el déficit hídrico afectó sustancialmente al contenido de proteína soluble del ápice de la radícula y de hoja de las variedades de maíz VS-22 y AMCCG-2. Se mostró una reducción de hasta 11% para AMCCG-2 y 15% para VS-22, por lo que se infiere que la síntesis de proteínas se altera y/o se reduce o incluso se detiene. Zhu *et al.* (2007) encontró que el estrés por déficit de agua indujo cambios en las proteínas de la pared celular del ápice de la radícula de maíz, esta disminución permitió que muchos procesos celulares se activaran para regular el crecimiento celular.

También se ha encontrado que la reducción de proteínas está relacionado con la intensidad y la duración de la sequía; como lo observado Nayer y Heidari (2008) en dos cultivares de maíz sometidos a estrés de -1.76 MPa, y también demostraron un descenso del 30% en el contenido de proteína soluble. Xu *et al.* (2006) también obtuvieron un efecto significativamente negativo de la sequía moderada a severa sobre el contenido proteico soluble de *Leymus chinenses* y trigo. El desequilibrio metabólico provocado por el estrés hídrico desencadena una acumulación de aminoácidos, en menor síntesis de ATP y RuBP y una alteración en la síntesis de proteínas (Lawlor y Cornic, 2002).

Sin embargo Zhou *et al.* (2004) encontraron que en tratamientos de estrés por sequía se presentó mayor cantidad de proteínas solubles, y este incremento se debió a una mayor expresión de proteínas por lo que la cantidad de proteínas se mantuvo elevada en plantas de pepino. Mientras que en los materiales VS-22 y AMCCG-2 estudiados en este trabajo la acumulación de proteína se

redujo drásticamente, como también ha sido reportado en otros trabajos de investigación (Nayer, 2008).

La disminución en las proteínas solubles y el incremento de proteínas de un peso molecular (PM) similar a las dehidrinas en condiciones de sequía fue consistente con lo reportado por Riccardi *et al.* (2004) en plantas de maíz, y Bensen (2010) en soja. Dichos autores encontraron que el estrés por sequía incrementó la expresión de proteínas como las dehidrinas de 33 y 36 KDa.

5.4.2. Análisis de proteínas de maíz

Algunas de las proteínas del perfil electroforético en PAGE-SDS de AMCCG-2 y VS-22 fueron identificadas como posibles dehidrinas, éstas mostraron PMs de 33 y 36 KDa, las cuales en otros estudios se han relacionado con la deshidratación (Nayer, 2008). Adicionalmente se puede decir que la presencia de dehidrinas acumuladas en ápices de radículas y hojas de maíz de VS-22 y AMCCG-2 se asocia directamente con la disminución del Ψ_A . Por su parte, Covarrubias *et al.* (1995) reportaron por primera vez las bandas con PM de 33 y 36 KDa y fueron asignadas como dehidrinas, Battaglia (2007) reportó que estas proteínas son ricas en prolina, y simultáneamente se acumulan en respuesta al déficit hídrico, protegiendo las paredes celulares y evitando la pérdida de agua. Las dehidrinas bajo condiciones de estrés hídrico se expresan, la presencia de algunas de estas proteínas con PM de 33 y 36 KDa se observaron en AMCCG-2 y VS-22, y en este último las bandas fueron más intensas tanto en ápice de radícula y hojas de maíz. Se sabe que las dehidrinas también se producen en respuesta a varios estreses ambientales tales como salinidad y frío (García *et*

al., 2000) y se han caracterizado como hidrofílicas y estables a altas temperaturas.

En VS-22, se encontró que bajo condiciones de sequía se aumentó la expresión de estas dos proteínas, Riccardi *et al.*, 1998 examinaron las proteínas sensibles a la sequía de 2 líneas de maíz en geles unidimensionales SDS-PAGE y no hubo variación cuantitativa significativa en 78 de 413 proteínas de las hojas, y 38 de estas exhibieron expresión diferencial

Otra de las proteínas que fueron separadas en los PAGE-SDS de una manera muy evidente, sobre todo por su alto grado de intensidad fue la subunidad mayor de la RUBISCO, que presentó un PM de 55 KDa (López *et al.*, 2011). Esta proteína es característica de plantas con metabolismo tipo C3, pero que también está presente en plantas C4, apoyando o interviniendo en el proceso de fotosíntesis. La RUBISCO es una de las enzimas más importantes en la fotosíntesis y también es la más abundante en el tejido vegetal. En plantas C4, la RUBISCO interviene posterior a la absorción del CO₂, donde descarboxila la molécula de cuatro carbonos, con lo que la fotorrespiración desaparece (Osakabe *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

La identificación de la RUBISCO y su alteración en su expresión fue confirmada en VS-22 y AMCCG-2, sometidas a diferentes niveles de estrés hídrico por su inmunodetección con anticuerpos específicos. En la inmunodetección se observó que el grado de expresión alcanzado de esta proteína en las plantas de maíz de VS-22 y AMCCG-2 mostró patrones diferenciales en su densidad. El estrés por agua ocasionó reducción de la proteína en ambas variedades de maíz, pero fue más afectada en la variedad AMCCG-2 comparada con VS-22. Se infiere que la reducción puede estar relacionada con la eficiencia de la

fotosíntesis, la cual disminuye cuando las plantas de maíz enfrentan esta condición hídrica, así de esta manera se observó que cuando las plantas de VS-22 alcanzaron un CRA de 70, la subunidad mayor de la RUBISCO disminuyó en un 20%, mientras que AMCCG-2 con un CRA de 68%, la RUBISCO se redujo hasta un 35%. Las plantas de maíz mantenidas en condiciones cercanas a capacidad de campo (riego) y con un CRA del 90 % mostraron una alta densidad de Rubisco (55 KDa), por lo que le fue asignado el valor máximo de densidad del 100%.

La identificación y cuantificación de Rubisco a través de inmunogénicos es una evidencia clara de cómo la falta de agua reduce el metabolismo relacionado con la fotosíntesis. Las diferencias observadas entre las dos variedades de maíz se debe a que los efectos del estrés hídrico sobre la actividad de RUBISCO varía con especies de plantas, y el nivel de estrés de sequía puede variar desde la disminución de actividad de Rubisco (Parry *et al.*, 2002) hasta la inhibición total de la actividad de la enzima (Pankovic' *et al.*, 1999; Pelloux *et al.*, 2002). Otros estudios han demostrado que Rubisco no limita la fotosíntesis hasta que el estrés por déficit hídrico fue grave o por períodos prolongados (Flexas, 2006).

La enzima Ribulosa 1-5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa juega un papel importante en la fotosíntesis de la planta, la cantidad de esta enzima en hojas es controlada por la tasa de síntesis y degradación. Incluso bajo condiciones de estrés por déficit hídrico en etapas tempranas, esta proteína se mantiene relativamente estable en forma de holoenzima y tiene una vida media de varios días (Webber *et al.*, 1994). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo bajo condiciones de déficit hídrico se detectó una disminución de la

subunidad mayor de RUBISCO en maíz, este comportamiento es similar a lo reportado por Cohen *et al.* (2006), quienes reportaron que en plantas de jitomate bajo estrés oxidativo existe una disminución de la síntesis de la subunidad grande de RUBISCO sin que se afecten los niveles de ARNm (Osakabe *et al.*, 2014).

Se puede inferir que la disminución de Rubisco puede afectar directamente a la fotosíntesis, ya que se ha reportado como uno de los procesos fisiológicos sensitivos al déficit hídrico (Chaves, 1991; López *et al.*, 2011). Se conoce que en plantas superiores se inhibe por el cierre estomático y trae como consecuencia disminución de la regulación del metabolismo fotosintético, y esto puede representar una limitación en la disponibilidad del CO₂ hacia el cloroplasto, causando una reducción en la concentración interna del CO₂ (Chavés *et al.*, 2003), y eventualmente afectar la actividad de las enzimas, como es Rubisco (Flexas *et al.*, 2004, Hu *et al.*, 2010).

En general, la cantidad de proteína sufre pocas modificaciones con el estrés hídrico sugiriendo que la disminución de la actividad puede estar relacionada a cambios en el nivel de activación de enzimas. Flexas y Medrano (2002) y Parry *et al.* (2002), han consignado que la disminución de la actividad total de la Rubisco podría estar vinculada a la caída de la actividad de la enzima Rubisco-activasa. Por su parte, Tezara, (1999); Chaves, (2002) y Parry, (2002) reportaron una disminución de la actividad de la enzima Rubisco activasa in vitro en plantas sometidas a estrés.

Las proteínas son importantes macromoléculas que participan en todos los aspectos de crecimiento y desarrollo de las plantas. Entre otros procesos las proteínas están involucradas en las catálisis de reacciones químicas del

transporte a través de membranas, la generación de energía y el transporte de electrones solo por mencionar algunos ejemplos.

LITERATURA CITADA

- Bai, A., Xiao, L., Tan, H., Wei-Hong, L., Sunli-Wen., 2011. Comparative profile rubisco interacting proteins from Arabidopsis photosynthesis under cold conditions. *Progres in Bioche.and Biophy.* 38,455-463.
- Battglia, M. Solorzona, M. Hernández, S. Cuellar-Ortiz. Garcia-Gomez, J.Bradford, M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Blum, A., 1988. Plant breeding for stress enviroments. CRC Press. Florida, Pp.223.
- Brown, P. S., D. P. Knievel and E. J. Pell. 1995. Effects of moderate drought on ascorbate peroxidase and glutathione reductase activities in mesophyll and bundle sheath cells of maize. *Physiologia Plantarum.* 95, 274-280.
- Cohen, I., Sapir, Y., Shapira, M., 2006. A conserved mechanism controls translation of Rubisco large subunidad in different photosynthetic organism. *Plant Physiology.* 141, 1089-1097.
- Colmenero-Flores, Moreno, L.P., Smith, C.E., Covarrubias, A.A., 1999. Pvlea-18, a member of a new late-embryogenesis abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well irrigated bean seedlings. *Plant Physiology.* 120, 93-104.

- Covarrubias, A.A., Ayala, J., Reyes, J., Hernandez, M., Carciarrubio, A., 1995. Cell-Wall Proteins Induced by Water Deficit in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seedlings. *Plant Physiol.* 11, 19-1 128.
- Chaves, M.M. y Maroco, J.P. y Pereira, J.S. 2003. Understanding plant response to drought-from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30, 239-264.
- Chaves, M.M., 2002. Water stress in the regulation of photosynthesis in the field. *Annals of Botany*, 89,907-916.
- Chaves, M.M., 1991. Effects of water deficits on carbon assimilation. *J. Exp. Bot.* 42, 1-16.
- Flexas, J., Bota, J., Escalona, J.M., Sampol, B., Medrano, H., 2002. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: and evaluation on stomatal and mesophyll limitations. *Funct. Plant Biol.* 29,461-471.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G. y Sharkey, T.D. 2004. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology* 6,269-279.
- Flexas, J., Bota, J., Escalona, J.M., Sampol, B., Medrano, H., 2006. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum.* 127, 343-352.
- García-Gomez. Campos F. Hernández, M. Covarrubias A. 2000. Two bean cell Wall proteins more abundant during water deficit are high in proline and interact with a plasma membrane protein. *Plant Journal.* 22,277-288.

- Hogbom, M., Person, J.O., 2008. Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. Current Issue. 105, 14371-14376.
- Hu, L., Wang, Z. y Huang, B. 2010. Diffusions limitations and metabolic factors associated with inhibition and recovery of photosynthesis from drought stress in a C3 perennial grass species. Physiologia Plantarum 139, 93-106.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
- Lawlor, D.W., Cornic, G., 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to wáter déficits in higher plants. Plant Cell and Enviroment. 25,274-294.
- Lopés, M., Araus, J.L., van Heerden, P.D.R., Foyer, C., 2011. Enhancing drought tolerance in C₄ crops. J. Exp. Bot. 62, 3135-3153.
- Marmagene, A., Favery, B., Chelysheva, L.A., Lebris, M., Jammes. F., Vaury, C., Pierre, A., 2004. Arabidopsis formin AtFH6ls a plasma membrane-associated protein upregulated in giant cells induced by parasitic nematodes. The plant cell. 16, 2529-2540.
- Márquez J. Covarrubias A. 2007. Proline-rich cell Wall proteins accumulate in growing regions and phloem tissue in response to wáter déficit in common vean seedling. Planta 225, 1121-1133.
- Nayer, M. Reza, H., 2008. Effects of drought stress on soluble proteins in two Maize Varieties. Turk J Biol. 32, 23-30.
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Lam-Son, P.T., 2014. Response of plants to water stress. Frontiers in plant science. 5, 1-8.

- Pankovic', D., Sacak, Z., Kevresan, S., Plasnicar, M., 1999. Acclimation to long-term water deficit in the leaves of two sunflower hybrids: photosynthesis, electron transport and carbon metabolism. *J. Experim. Bot.* 50, 127-138.
- Parry, M.A.J., Griffiths, H., 2002. Plant responses to water stress. *Annals of Botany.* 89,801-802.
- Pelloux, J., Sanders, D., Brownlee, C., Harper, J., 2002. Calcium at the crossroad of signaling. *The plant Cell.* 14, 401-414.
- Rabilloud, T., Santoni, V., Molloy, M., 2000. Membrane proteins and proteomics un amour imposible. *Electrophoresis.* 21, 1054-1070.
- Riccardi F, Gazeau P, Vienne D et al, 1998. Protein changes in response to progressive water deficit in maize, quantitative variation and polypeptide identification. *Plant Physiol* 117, 1253-1263.
- Riccardi, F., Gazeau, Pascale, G., Marie Pierre, J., Delphine, V., Zivy, M., 2004. Deciphering genetic variations of proteome responses to water deficit in maize leaves. *Plant Physiol. And Biochem,* 42, 1003-1011.
- Tezara, W., Mitchell, V.J., Driscoll, S.P., Lawlor, D.W., 1999. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature.* 401, 9149-917.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications (ribosomal proteins/radioimmunoassay/fluorescent antibody assay/peroxidase-conjugated antibody/autoradiography). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4350-4354.

- Wang, Y., Bräutigama, Weber, A. P.M., Zhu, X. G. 2014. Three distinct biochemical subtypes of C4 photosynthesis? A modelling analysis. *Journal Experimental Botany*. 1-12.
- Wagner, S., Klepsch, M.M., Schelegel, S., Appel, A., Draheim, R., Tarry, M., Webber, A.N., Nie, G.Y., Long, P.S. 1994. Acclimation of photosynthetic proteins to rising atmospheric CO₂. *Photosynthesis research*. 39,413-4
- Waraich, E.A., Ahmad, R., 2011. Role mineral nutrition in alleviation of drought stress in plant. *Austral. J. of Crop*. 17, 76-85.25.
- Wingler, A., Walker, P. R., Zhi-Hui, C., y Leegood, R.C., 1999 Phosphoenolpyruvate carboxykinase Is Involved in the decarboxylation of Aspartate in the bundle sheath of Maize. *Plant Phisiology*. 120, 539-545.
- Xu, B., Li, F., Shan, L., Ichizen, N., Huang, J., 2006. Gas Exchange, biomass partition and water relationships of three grass seedlings under water stress. *Weed Biol. And management*. 6, 79-88.
- Zhou, Y., Yuj, H., 2004. The relations ship betwee CO₂ assimilation, photosynthetic electron transportand wáter-water cycle in chill-exposed cucumber leaves under low light tand subsequentre covery. *Plant Cell and Enviromental*. 27, 1503-1514.
- Zhu, J.S., Alvarez, E., Marsh, M.L., Nguyen, Y., Wu, D.P., Sharp, R.E, 2007. Cell Wall proteome in the maize primary root elongation zone II. Region.specific changes in wáter soluble and lightly ionically-bound proteins under wáter déficit. *Plant Physiol*. 145, 1533-1548.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN GENERAL

Las sequías e inundaciones son fenómenos climáticos que tienen mayor variación, debido a que cada año se encuentran fluctuaciones en la duración e intensidad de los periodos de lluvias (Lake, 2003). Esas variaciones a menudo tienen gran influencia en la producción de alimentos, limitando la productividad de los cultivos y generando costos económicos a los agricultores (Wilhite, 2000).

La sequía provoca cambios metabólicos que van desde la síntesis de cantidades limitadas de metabolitos especializados hasta grandes cambios en la composición de metabolitos primarios, así como muchas otras respuestas fisiológicas. Durante la sequía es necesario que el potencial osmótico provoque acumulación de solutos en el interior de la célula vegetal, para retener el agua y mantener la presión de turgencia positiva.

Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron que el ápice de la radícula de maíz mantuvo una elongación por 72 h, aún en Ψ_A del sustrato de hasta -1.5 MPa. La reducción del Ψ_A en el sustrato provocó una disminución diferencial en el crecimiento longitudinal de la radícula entre las dos variedades de maíz VS-22 (variedad tolerante a sequía) y AMCCG-2 (variedad susceptible). En el tratamiento de menor Ψ_A , la variedad VS-22 redujo su crecimiento hasta un 70 % mientras que AMCCG-2 la inhibición fue del 90% comparado con el tratamiento testigo. Sin embargo, el crecimiento se mantuvo y en ninguna de las dos variedades se presentó la inhibición total del crecimiento del ápice de la radícula. En consecuencia la elongación de la radícula es muy activa, por lo que la absorción de nutrientes es más eficiente,

ya que son transportados a las células de la endodermis de la radícula, y así se evita la desecación de la planta (Tanaka *et al.*, 2014).

Esto quizás se deba a que las plántulas están realizando ajuste osmótico, que permite la turgencia de la célula, a través de la acumulación de solutos compatibles, como azúcares específicos (Glucosa, Fructosa y Sacarosa) que se determinaron en esta investigación, entre otros también están la trehalosa y prolina, que se acumulan en niveles elevados en radículas sometidas a bajos Ψ_A . Estas respuestas se han reportado en *Zea mays* y *Arabidopsis thaliana* y se les ha relacionado con funciones de protección celular. (Cooper *et al.*, 2002).

Los azúcares también son señales importantes en la regulación del metabolismo del carbono y de la fotosíntesis de la planta (Sheen *et al.*, 2006; Rolland, 2008). Nuestros resultados evidenciaron una mayor acumulación de glucosa y sacarosa en el ápice de la radícula. La concentración más alta de sacarosa correspondió con una menor acumulación de almidón, cuando los potenciales fueron de -1.0 y -1.5 MPa en la variedad VS-22, y con respecto a AMCCG-2. Estos resultados concuerdan con otras investigaciones donde se ha observado que la concentración alta de sacarosa está relacionada con la disminución del almidón (Ramírez *et al.*, 2005), ya que el estrés afecta directamente el metabolismo primario, por lo tanto la acumulación de estos compuestos quizás se deba a la degradación de almidón a moléculas más sencillas.

Se ha documentado que para la sacarosa hay muchos tipos de interacciones abióticas que implican la inducción de la invertasa extracelular, como una enzima clave de una vía de descarga del floema, dando como resultado una

transición fuente/demanda y una mayor relación de hexosa/sacarosa (Liu *et al.*, 2012; Lemoine *et al.*, 2013).

La trehalosa fue otro de los solutos que se detectó en radícula con Ψ_A de -1.0 y -1.5 MPa, así como también fue detectada en hojas de maíz, cuando se desarrollaron en el sustrato con déficit de agua. Este disacárido se incrementó notablemente en la radícula, en donde estuvo en función de los tiempos de tratamiento a las 24, 48 y 72 h, los valores registrados para VS-22 fueron hasta de 3.2 veces más con respecto a AMCCG-2.

Es importante resaltar la detección de este soluto en etapas muy tempranas del desarrollo de la raíz y en las condiciones metodológicas de esta investigación, ya que a la fecha no había sido reportada, por lo que su función aquí no está bien definida, pero es probable que su presencia contribuya al crecimiento del ápice radicular, así como de un osmoprotector que contribuye al mantenimiento de la elongación.

En esta investigación se observó que la acumulación de trehalosa en hojas de maíz, estuvo en mayor concentración en VS-22, así como en el tratamiento de déficit de agua, con respecto a AMCCG-2. La acumulación de este disacárido posiblemente tiene funciones, para la protección de la planta ante situaciones limitantes de agua como: osmoprotector para proteger las membranas celulares, mientras que el intermediario trehalosa-6-fosfato (T-6-P) parece estar involucrado en la regulación, percepción del estrés, fotosíntesis y como fuente de carbono (Paul *et al.*, 2008; Iturriaga *et al.*, 2009)

En adición, la T-6-P al estar involucrada en la regulación del carbono y fotosíntesis, entonces puede afectar directamente la acumulación de sacarosa y almidón, nuestros resultados concuerdan con los reportados por Kolve

(2005), quien interpretó que cuando hay un incremento en la expresión del intermediario T-6-P trehalosa inducida por APL3, involucrado en fosforilación de (ADP-Glc.PPasa) primera enzima que participa en la biosíntesis del almidón. Por lo tanto hay una alteración en la concentración de almidón en los tejido de origen de las plantas estresadas de *Arabidopsis thaliana*; trayendo como consecuencia la disminución de asignación de esta molécula en radículas y hojas de desarrollo (Schluepmann *et al.*, 2002).

Por otro lado las interacciones entre el azúcar y la señalización de la hormona ácido abscísico (ABA), juegan un papel de señalización en la respuesta al estrés abiótico. Por ejemplo, las interacciones entre azúcar y ABA de señalización pueden ser responsables de la inducción de la senescencia durante el estrés por sequía o por tratamiento de frío (Tuteja, 2007). Sin embargo, la regulación de senescencia por azúcares, en respuesta al estrés, por sequía, se deba a la variación natural que se puede encontrar en las estrategias, que permiten sobrevivir a las plantas por ejemplo; el escape y evitación a la deshidratación son estrategias que se han descrito en diferentes organismos como, *Soya*, *Arabidopsis thaliana* (Cooper *et al.*, 2002; Lakshmi *et al.*, 2009).

Se ha documentado que el aumento de acumulación de prolina en el ápice de la radícula de maíz a potenciales hídricos más bajos, como en el caso de VS-22, se debe a que en gran parte al aumento de la tasa neta de deposición y transportación de prolina (Verslues y Sharp 1999, Voetgert 2010).

Se considera que la acumulación de prolina en la región basal de la radícula es esencial para mantener el crecimiento de la raíz bajo condiciones limitantes de humedad (Ueda *et al.*, 2001). En nuestros resultados encontramos que la

distribución de prolina está en diferentes órganos de las plantas, como es el caso de hoja y radícula de maíz, alcanzando niveles altos cuando las plantas son sometidas a estrés hídrico. Debido a que la hoja es un tejido bien desarrollado y con un sistema complejo de eventos fisiológicos y bioquímicos, provocó una mayor acumulación de este osmolito, comparado con la radícula de maíz de apenas 72 horas de elongación longitudinal y con déficit de agua de -0.03, -1.0 y -1.5 MPa. Lo anterior quizás se deba a una mejor regulación del transporte de este aminoácido (Kavi-Kishor *et al.*, 2005) que se regula por varias señales ambientales y el déficit de agua afecta, el transporte a larga distancia trayendo como consecuencia una alteración en la asignación de carbono y de nitrógeno. Sin embargo, el ápice de la radícula de maíz al ser una zona de diferenciación celular, a menudo importan mayor cantidad de aminoácidos para ayudar al crecimiento y desarrollo (Ueda *et al.*, 2008).

De los fotosintatos de las variedades VS-22 y AMCCG-2 que se acumularon transitoriamente en hojas, el monosacárido que se concentró en mayor cantidad fue la glucosa. Posiblemente se debió, a la acumulación del almidón y sacarosa y su consecutiva hidrólisis a moléculas más sencillas. Otra explicación es que la sacarosa es uno de los principales productos de la fotosíntesis que se trasloca a través de toda la planta vía floema, la movilización de estas reservas y su producción continúa y sin tanta demanda por la planta, ocasiona que se desdoble a las hexosas glucosa y fructosa (Oliver *et al.*, 1997, Santacruz *et al.*, 2002). El transporte de estos compuestos hacia los demanda se efectúa en forma de sacarosa (Lemoine *et al.*, 2013).

En maíz se encontró que durante la sequía la actividad de la ADP-glucosa pirofosforilasa (enzima encargada de la hidrólisis del almidón) y de la invertasa

ácida aumentan de manera notable, lo que conduce a un incremento en las hexosas pero no en la sacarosa (Pelleschi, 1997).

Otro de los procesos metabólicos más afectados debido el déficit hídrico es la fotosíntesis. A nivel de hoja de maíz, se observó una reducción progresiva del CRA y del potencial hídrico del tejido, esto es debido al cierre de los estomas inducido por el estrés hídrico y reflejado como una disminución de la conductancia estomática (g_s), que tiene una función central en esta respuesta (Lawlor 2002). Además no debe olvidarse el efecto del estrés hídrico en el desarrollo, el cual conduce a una disminución del área foliar del dosel vegetal (Passioura 1994) y por ende, de la capacidad total de asimilación por parte del cultivo.

Entre las causas asociadas a la posible existencia de limitantes metabólicas de la fotosíntesis con el estrés podemos citar: (a) limitación por actividad de la RUBISCO; (b) regeneración de Ribulosa 1,5 bisfosfato (*RuBP*) (c) y limitación por la disponibilidad de ATP y NADPH (Revisado en Lopes et al., 2011).

La disminución de la expresión de la RUBISCO, en ambas variedades (VS-22 y AMCCG-2) se afectó por las condiciones limitantes de agua, probablemente por la disminución de la conductancia estomática y disminución en la asimilación neta de CO₂ en los cloroplastos, en lugar de disminuir en relación del contenido de agua, estos efectos traen como consecuencia principal la disminución de la RUBISCO, causada por la difusión restringida a través de los estomas y mesófilo (Flexas *et al.*, 2006; Chavés *et al.*, 2009). Otra de efectos de la disminución de la expresión de RUBISCO es el decremento de la fotosíntesis, que puede ser debido a las alteraciones en el metabolismo fotosintético (Lawlor *et al.*, 20002), causado por la limitación de la generación

de poder reductor o la actividad metabólica, lo que afecta directamente a la maquinaria fotosintética, habiendo una reducción en los órganos fuentes, y como consecuencia se afectan a los órganos en formación (frutos, llenado de grano).

Otra posible explicación de la disminución de la RUBISCO en plantas estresadas, se puede deber a la actividad de la RUBISCO, regulada por la enzima Rubisco activasa, una chaperona molecular cuya actividad es dependiente del cociente ATP/ADP que da los cambios de las proteínas (Cho *et al.*, 2007; Balasubramanian *et al.*, 2007). Estudios reciente indican que la enzima Rubisco activasa desempeña un papel vital en la respuesta a la fotosíntesis a estrés hídrico (Chen *et al.*, 2007; Gancedo *et al.*, 2008). Sin embargo, los estudios sobre la regulación de Rubisco activasa durante la deshidratación son muy limitadas para la plantas. Es evidente que un sinnúmero significativo de genes relacionados con el metabolismo fotosintético se ven afectados por la desecación (Balasubramanian *et al.*, 2007).

LITERATURA CITADA

- Balasubramanian, R., Karve, A., Kandasamy, M., Meagher, R.B., Moore, B.D., 2007. A role for F-Actin in hexokinase-mediated glucose signaling. *Plant Physiol* 145, 1423–1434.
- Chaves, M. M., Flexas, J., and Pinheiro, C., 2009 . Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann.Bot.* 103, 551–560.
- Chen, J.G., 2007. Sweet sensor, surprising partners. *Sci STKE* 207, 1–4.

- Cho, Y.H., Yoo, S.D., Sheen, J., 2007. Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell* 127, 579–585.
- Cooper, K., Farrant, J.M., 2002. Recovery of the resurrection plant *Craterostigma wilmsii* from desiccation: protection versus repair, *J. Exp. Bot.* 53,1805–1813.
- Flexas, J., Bota, J., Galmés, J., Medrano, H., and Ribas-Carbó, M.2006. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiol. Plant* 127,343–352.
- Gancedo, J.M., 2008. Early steps of glucose signaling in yeast. *FEMS Microbiol Rev.* 32,673–704.
- Iturriaga, G., Suarez R., Nova, B.F., 2009.Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 3793-3810.
- Kavi-Kishori, P.B., Sangami, S., Amrutha, R.N., Laxmil, P.S., Naidu, K.R., Rao, S., Reddys, P., Theriaappan., Sreenivasalu, N., 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation,uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance.
- Lake, P.S., 2003. Ecological effects of perturbation by drought in flowing waters. *Freshwater Biology.* 48,1161–1172
- Lakshmi, P., Manavalan, S., Guttikonda, K., Lam-Son, P. T., y Nguyen, H.T.,2009.Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean.*Plant Cell Physiology.* 7,1260-1276.
- Lawlor, D.W., Cornic, G., 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants, *Plant Cell Environ.* 25,275–294.

- Lemeoni, R., Camera, S., Atanassava, R., Dedaldechamp, F., Allario, T., Pourtau, N., Bonnemain, J.L. Laloi, M., Cautos-Thevenot, P., Maurousset, L., Faucher, M., Girouse, C., Lemonnier, P., Parrilla, J y Durand, M. 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Plant Science*. 4, 272.
- Liu, D.D., Chao, W.M., y Turgeon, R., 2102. Transport of sucrose, not hexose in the phloem. *J. Exp. Bot.* 63,4315-4320.
- Lopés, M., Araus, J.L., van Heerden, P.D.R., Foyer, C., 2011. Enhancing drought tolerance in C₄ crops. *J. Exp. Bot.* 62, 3135-3153.
- Oliver, M.J., Bewley, D.J., 1997. Desiccation tolerance of plant tissues: a mechanistic overview, *Hortic. Rev.* 18 171–214.
- Paul, M.J., Primavesi, L.F., Jhurrea . D., Zhang, Y.,2008. Trehalose metabolism and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59,417-41.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J., 2006. Sugars sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanism. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 57: 675-709.
- Sheen, J., Matthew, R., Rolland, F., 2008. Sugar sensing and signaling. *The Arabidopsis Books*. 1-22.
- Tanaka, N., Kato, M., Tomjoka, R., Kurata, Rie., Fukao, Y., Aoyama, T., Maeshima, M., 2014. Characteristics of a root hair-less line of *Arabidopsis thaliana* under physiological stresses. *Journ. Exp. Botany*, 65, 1497–1512.
- Tuteja, N., 2007. Abscisic Acid and Abiotic Stress Signaling. *Plant Signaling and Behavior* 2:135-138.

- Ueda A, Shi W., Sanmiya, K., Shono, M., Takabe, T., 2001. Functional analysis of salt-inducible proline transporter of barley roots. *Plant Cell Physiol* 42:1282–1289.
- Ueda, K., Weiming, S., Shimada, T., Miyake, H., Takabe, T., 2008. Altered expression of barley proline transporter causes different growth responses in *Arabidopsis*. *Plants*, 227,277-286.
- Yancey PH: Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses 2005. *J Exp Biol.* 208:2819-2830.
- Schuepmann, H., Pellny, T., Dijken, V.A., Smeekens, S., Mattew, P., 2003. Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*. 100, 6849-6854.

CONCLUSIONES

- Las variedades de maíz VS-22 (tolerante a la sequía) y AMCCG-2 (susceptible a la sequía) sujetas a diferentes niveles de déficit hídrico, presentaron una reducción significativa en la elongación del ápice de la radícula, sin alcanzar la inhibición completa. VS-22 mostro una mejor respuesta a la sequía, manteniendo la elongación de la radícula hasta las 72 h de crecimiento, comparada con AMCCG-2.
- El déficit de agua en la hoja de maíz de ambas variedades provoco reducciones significativas en los valores del CRA, potencial hídrico, potencial osmótico y una obtención de valores positivos en el potencial de turgencia. VS-22 resultó menos afectada que AMCCG-2 ante esta condición hídrica.
- En condiciones de estrés hídrico el ápice de la radícula y las hojas de VS-22 acumularon al menos cinco veces más prolina que AMCCG-2, con diferencias significativas, comparadas con sus respectivas plantas testigo (riego).
- Se demostró que el ápice de la radícula de hasta 72h de crecimiento en VS-22 presentó la capacidad de sintetizar y acumular solutos compatibles; como la glucosa, fructosa, sacarosa y trehalosa, a medida que déficit hídrico fue más severo (-1.5 MPa). En hoja de la planta y bajo las mismas condiciones hidricas, estos solutos se mantuvieron e incluso se incrementaron. AMCCG-2 mostró menor acumulación de estos solutos.

- El déficit hídrico evidenció la acumulación de almidón en radícula y hoja, estos valores fueron variables en los genotipos evaluados, aunque en AMCCG-2 el polisacárido se acumuló en mayor cantidad, con respecto a VS-22.
- La concentración de proteínas en radícula y hoja disminuyó conforme el déficit hídrico fue más severo para ambas variedades, comparadas con las variedades mantenidas en condiciones de riego. También se observaron diferencias en el perfil de proteínas de ambas variedades sometidas a sequía.
- Se identificó y confirmó la presencia de la RUBISCO en ambas variedades de maíz, utilizando la técnica de inmunodetección tipo “Western blot”. El tratamiento de sequía suministrado a las plantas afectó su densidad, en mayor grado para AMCCG-2 que para VS-22, con alta diferencia estadística. RUBISCO estuvo ausente en el perfil del ápice de la radícula.