



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CÓRDOBA

POSTGRADO EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

**RESPUESTA AL ESTRÉS HÍDRICO *in vitro* DE VAINILLA
(*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) INDUCIDO CON POLIETILENGLICOL**

SAMUEL EDUARDO MARTÍNEZ SANTOS

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO

2021

RESPUESTA AL ESTRÉS HÍDRICO *in vitro* DE VAINILLA
(*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) INDUCIDO CON POLIETILENGLICOL

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE
LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe: **Samuel Eduardo Martínez Santos**, alumno de esta institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del profesor: **Dr. Jericó Jabín Bello Bello**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **RESPUESTA AL ESTRÉS HÍDRICO *in vitro* DE VAINILLA (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) INDUCIDO CON POLIETILENGLICOL** y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el profesor consejero o director de tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello, me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta institución.

Amatlán de los Reyes, Veracruz a **23** de **febrero** del **2021**.


Firma del que suscribe


Vo. Bo. del profesor consejero

La presente tesis, titulada: **RESPUESTA AL ESTRÉS HÍDRICO *in vitro* DE VAINILLA (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) INDUCIDO CON POLIETILENGLICOL**, realizada por el alumno: **SAMUEL EDUARDO MARTÍNEZ SANTOS**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. JERICÓ JABIN BELLO BELLO

ASESOR:



DR. FERNANDO CARLOS GÓMEZ MERINO

ASESOR:



DR. SERAFIN CRUZ IZQUIERDO

Amatlán de los Reyes, Veracruz, México, a **23 de febrero de 2021**

RESPUESTA AL ESTRÉS HÍDRICO *in vitro* DE VAINILLA

(*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) INDUCIDO CON POLIETILENGLICOL

Samuel Eduardo Martínez Santos, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2021

El estrés hídrico ocasionado por la sequía afecta la productividad del cultivo de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. El cultivo *in vitro* es una herramienta para el estudio de los mecanismos de tolerancia ante el estrés hídrico. El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta morfológica, fisiológica y bioquímica de *V. planifolia* bajo condiciones de estrés hídrico *in vitro* inducido con polietilenglicol (PEG). Brotes fueron sometidos a diferentes concentraciones de PEG 6000 (0, 1, 2 y 3 % p/v) utilizando medio de cultivo semisólido Murashige y Skoog (MS). A los 60 d de cultivo, se evaluaron diferentes variables de crecimiento, contenido de materia seca (MS), clorofila (Chl), proteínas solubles (PS), prolina (Pro), glicina betaína (GB), índice estomático (IE) y estomas abiertos (%). Los resultados mostraron una reducción en el crecimiento, contenido de Chl, PS, IE y estomas abiertos (%) al aumentar la concentración de PEG; mientras que, el contenido de MS, Pro y GB aumentó al incrementar la concentración de PEG. En conclusión, el estrés inducido con PEG permitió describir mecanismos fisiológicos y bioquímicos de respuesta al estrés hídrico. Además, la determinación de osmolitos compatibles Pro y GB pueden ser utilizadas como marcadores bioquímicos en futuros programas de mejoramiento genético para la selección temprana de genotipos tolerantes a estrés hídrico.

Palabras clave: *Vanilla planifolia*, tolerancia a sequía, potencial osmótico, PEG 6000, osmolitos.

IN VITRO RESPONSE OF VANILLA (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews)
TO OSMOTIC STRESS INDUCED BY PEG

Samuel Eduardo Martínez Santos, M. Sc.

Colegio de Postgraduados, 2021

Water stress caused by drought affects the productivity of the *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews crop. *In vitro* culture is a tool for the study of water stress tolerance mechanisms. This study aimed to evaluate the morphological, physiological and biochemical response of *V. planifolia* under *in vitro* water stress conditions induced with polyethylene glycol (PEG). Shoots were subjected to different concentrations of PEG 6000 (0, 1, 2 and 3 % w/v) using Murashige and Skoog semi-solid culture medium. At 60 d of culture, different growth variables, dry matter (DM) content, chlorophyll (Chl), soluble proteins (SP), proline (Pro), glycine betaine (GB), stomatal index (SI) and open stomata (%) were evaluated. Results showed a reduction in growth, Chl content, SP, SI and open stomata (%) with increasing PEG concentration, whereas DM, Pro and GB contents rose with increasing PEG concentration. In conclusion, PEG-induced stress allowed describing physiological and biochemical mechanisms of response to water stress. Furthermore, the determination of compatible Pro and GB osmolytes can be used as biochemical markers in future breeding programs for the early selection of water stress tolerant genotypes.

Keywords: *Vanilla planifolia*, drought tolerance, osmotic potential, PEG 6000, osmolytes.

AGRADECIMIENTOS

Esta obra es la culminación del gran viaje que comenzó hace un par de años, y es testimonio del esfuerzo y compromiso de todos los personajes que directa o indirectamente fueron partícipes de ella.

A esas maravillosas personas quienes han sido la principal fuente de motivación para continuar con mi formación profesional. Mamá y papá, mi negrito José Iván, ¡LOS AMO!

Dicen que solo llegas más rápido, pero acompañado llegas más lejos. Dr. Jericó, chicos del lab, sin ustedes no habrían sido igual de divertidos estos años, ¡Gracias, amigos!

A Crispy, Lore, Chei, Eucaman, Tavito, Lou y Ruths, más allá del colegio encontré en ustedes grandes amigos; no hubiera querido a otras personas más que ustedes en los días de fiesta, ni para aquellos días en que me superó el estrés. Gracias por su apoyo durante mi falta de ánimo y por soportar a veces mi cambio de humor. ¡Son los mejores!

Gracias por la entrega y dedicación de todos los maestros y doctores quienes sin dudarlo compartieron su tiempo y conocimientos. Ustedes son mi inspiración para superarme y ser un mejor profesionista cada día.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante todo este tiempo.

Y a quienes hoy no están, sepan que el camino fue duro, sin embargo, la satisfacción es mayor.

Con mucho orgullo puedo decirles a todos:

¡LO LOGRAMOS!

CONTENIDO

1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 La vainilla	3
2.1.1 Clasificación taxonómica	3
2.1.2 Origen y distribución	3
2.1.3 Descripción botánica.....	4
2.1.4 Biología reproductiva	5
2.1.5 Problemáticas del cultivo	6
2.2 Estrés abiótico	7
2.2.1 Estrés hídrico.....	7
2.2.2 Mecanismos de tolerancia al estrés hídrico	8
2.2.3 Respuestas fotosintéticas ante el estrés hídrico	9
2.2.4 Síntesis de proteínas ante el estrés hídrico	9
2.2.5 Síntesis de prolina ante el estrés hídrico	10
2.2.6 Síntesis de glicina betaína en el estrés hídrico	11
2.3 Herramientas de cultivo de tejidos en el fitomejoramiento	12
2.3.1 Selección <i>in vitro</i> y uso de PEG como agente osmótico.....	13
3 OBJETIVOS.....	15
4 HIPÓTESIS	15
5 MATERIALES Y METODOS.....	16
5.1 Establecimiento y multiplicación del material vegetal	17
5.2 Inducción de estrés hídrico con PEG	18
5.3 Medidas de potencial osmótico del medio de cultivo	18
5.4 Determinación del contenido total de clorofila.....	18
5.5 Determinación del contenido de proteínas solubles.....	19
5.6 Determinación del contenido de prolina	19
5.7 Determinación del contenido de glicina betaína.....	20
5.8 Índice estomático y porcentaje de estomas abiertos	20
5.9 Diseño experimental y análisis estadístico.....	20
6 RESULTADOS.....	21
6.1 Estrés osmótico inducido por PEG	21

6.2 Contenido de clorofila	23
6.3 Contenido de proteínas solubles.....	23
6.4 Contenido de prolina.....	23
6.5 Contenido de glicina betaína.....	23
6.6 Índice estomático y porcentaje de estomas abiertos	24
7 DISCUSIÓN	27
7.1 Efecto de PEG sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>V. planifolia</i>	27
7.2 Contenido de clorofila	28
7.3 Contenido de proteínas solubles.....	28
7.4 Contenido de prolina.....	29
7.5 Contenido de glicina betaína.....	30
7.6 Índice estomático y porcentaje de estomas abiertos	31
8 CONCLUSIONES	32
9 REFERENCIAS.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrategia experimental	16
Figura 2. Efecto de PEG en el crecimiento de <i>Vanilla planifolia</i>	22
Figura 3. Efecto de PEG en respuestas bioquímicas	24
Figura 4. Efecto de PEG en el contenido de estomático	25
Figura 5. Efecto de PEG en el porcentaje de estomas abiertos	26

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Vanilla planifolia</i>	3
Cuadro 2. Concentraciones de PEG 6000 utilizadas en la inducción de estrés hídrico <i>in vitro</i>	14
Cuadro 3. Efecto de diferentes concentraciones de PEG 6000 en el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Vanilla planifolia</i>	21

1 INTRODUCCIÓN

La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) es una orquídea de origen mexicano utilizada para la extracción de vainillina, uno de los compuestos aromáticos de mayor importancia económica a nivel mundial (Arya *et al.*, 2021). Esta especie de hábito hemiepífita, demanda agua y abundante humedad para un adecuado desarrollo (Castro-Bobadilla *et al.*, 2011). Se estima que uno de los principales factores que afectan la producción de vainilla es la alta susceptibilidad a plagas, enfermedades y baja tolerancia a condiciones de estrés hídrico, producto de su escasa variabilidad genética (Li *et al.*, 2020). Aunado a ello, diversos escenarios de cambio climático indican sequías prolongadas ocasionando estrés hídrico en plantas (Monterroso-Rivas y Gómez-Díaz, 2021).

En plantas, los principales mecanismos de tolerancia al estrés hídrico son la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO), síntesis de enzimas antioxidantes, síntesis de proteínas específicas (hidrofilinas, dehidrinas, chaperoninas) y ajuste osmótico mediado por osmolitos compatibles (Vinocur y Altman, 2005). La respuesta ante estrés hídrico se caracteriza por cambios de tipo morfológico, fisiológico, bioquímicos y moleculares que se activan en relación al tiempo y grado de estrés al cual las plantas se encuentran expuestas (Ahanger *et al.*, 2018).

La simulación de estrés hídrico *in vitro* mediante agentes osmóticos es una técnica eficiente que proporciona un entorno controlado y uniforme para el estudio de diferentes mecanismos de respuesta al estrés hídrico (Nikam *et al.*, 2015). El polietilenglicol (PEG), de alto peso molecular, es altamente soluble en agua, no penetrable en células y produce un potencial osmótico (Ψ_s) negativo en el medio de cultivo sin generar toxicidad y es uno de los agentes osmóticos más utilizados para estudiar los efectos del estrés hídrico *in vitro* en plantas (Zivcak *et al.*, 2016). El uso de PEG como agente estresante *in vitro* ha sido evaluado en cultivos como betabel (*Beta vulgaris* L.) (Sen y Alikamanoglu, 2012), nopal (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) (Mengesha *et al.*, 2016), trigo (*Triticum durum* Desf.) (Kacem *et al.*, 2017), estevia (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni) (Pradhan *et al.*, 2020; Thakur *et al.*, 2021), y

banano (*Musa acuminata* Colla) (El-Mahdy *et al.*, 2021) entre otros. En la familia Orquidácea ha sido utilizado en *Acianthera teres* (Lindl.) Borbas, *Octomeria crassifolia* Lindl., *Octomeria gracilis* Barb. Rodr. (Barbero *et al.*, 2011) *Prosthechea vitellina* (Lindl.) W. E. Higgins (Jácome-Blásquez *et al.*, 2016) y *Dendrobium officinale* Kimura & Migo (Gao *et al.*, 2020). En *V. planifolia* es escasa la información sobre la respuesta al estrés hídrico bajo condiciones *in vitro* y los mecanismos de respuesta a estrés hídrico en esta especie no han sido del todo estudiados. El objetivo de este estudio fue evaluar las respuestas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas en brotes *in vitro* de *V. planifolia* bajo condiciones de estrés hídrico inducido con PEG.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 La vainilla

2.1.1 Clasificación taxonómica

El género *Vanilla* perteneciente a la familia Orchidaceae, se encuentra presente en las regiones tropicales de América, Asia y África y cuenta con más de 100 especies; investigaciones basadas en secuenciación de ADN demuestran la siguiente clasificación taxonómica de *V. planifolia* (Cuadro 1) (Cameron, 2009; Soto-Arenas y Dressler, 2010; Hu *et al.*, 2019).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Vanilla planifolia*.

Reino	Plantae
Clase	Liliopsida
Orden	Asparagales
Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Vanilloideae
Tribu	Vanilleae
Subtribu	Vanillinae
Género	<i>Vanilla</i>
Especie	<i>Vanilla planifolia</i>

2.1.2 Origen y distribución

Soto-Arenas y Cribb (2010) enlistaron un total de 106 especies integrantes del género *Vanilla* y propusieron una clasificación infragenérica del mismo; por su parte Cameron (2019) concentra en un listado a 118 miembros que integran al género, organizándolos en cuatro principales regiones de distribución: África, Asia, Norte América (incluyendo México y el caribe) y Centro y Sudamérica. En ambas publicaciones se mencionan 15 principales especies nativas de México siendo las más destacadas en orden de importancia las especies *V. planifolia*, *V. pompona* Schiede y el híbrido *V. tahitiensis* J. W. Moore. De acuerdo con la evidencia antropológica encontrada y las aseveraciones plasmadas en obras literarias (Kourí,

2004), las especies productoras de frutos del género *Vanilla* se originaron en la región mesoamericana y del Caribe.

La evidencia molecular presentada por Lubinsky *et al.* (2008) brinda una base sólida para afirmar que el centro de origen de *V. planifolia* es la región totonaca de Papantla (además sugiere que los habitantes de aquella región fueron los primeros en establecer cultivos para uso gastronómico); por su parte, Soto-Arenas y Dressler (2010) presentan una visión más clara de la distribución de *V. planifolia* en México, exponiendo a Veracruz, Oaxaca y Chiapas, como los estados con mayor presencia de ejemplares silvestres y proponen una clave taxonómica para diferenciarla de entre las 15 especies presentes en México.

2.1.3 Descripción botánica

Vanilla planifolia presenta características únicas a lo largo de su ciclo de vida; su hábito hemiepífito es destacable, pues en un inicio las plantas son terrestres, arraigadas a su sustrato y eventualmente comienzan a trepar fijándose a algún tutor cercano con la ayuda de raíces adventicias (Lepers-Andrzejewski *et al.*, 2010).

Sus inflorescencias racimosas poseen de 10 a 20 flores dispuestas en espiral que abren una cada día, pero únicamente por unas cuantas horas después del amanecer, estas sueltan granos de polen individuales en lugar de grandes cantidades, que posteriormente se convertirán en frutos alargados y esbeltos (Lapeyre-Montes *et al.*, 2010).

Las flores son vistosas, de perianto deciduo, de sépalos libres y ondulados al igual que los pétalos que frecuentemente presentan quilla dorsal (Sasikumar, 2010); labelo completamente libre y sencillo, aunque en ocasiones puede presentarse ondulado y con alguna ornamentación como verrugas o tricomas. Sus órganos reproductivos tanto masculinos como femeninos se encuentran fusionados en una estructura llamada ginostemo adyacentes al lóbulo el cual está fusionado al margen por una estrecha banda pegajosa (rostelo) (Retheesh y Bhat, 2010). El tallo de *V. planifolia* es suculento, flexible y totalmente constituido por entrenudos en los cuales, cada uno presenta hojas subsésiles y carnosas dispuestas en forma elíptica

y desarrolla raíces adventicias que brindan soporte a la planta completa (Tan y Chin, 2015).

2.1.4 Biología reproductiva

La biología reproductiva del género *Vanilla* parece ser un tema complicado, pues ciertos factores dificultan la reproducción sexual de estas orquídeas, por ejemplo, la anatomía floral de *V. planifolia* disminuye la tasa de autopolinización debido a la presencia del ya mencionado rostelo que evita el contacto estigma-estambre, sin embargo, se ha demostrado que bajo circunstancias favorables (en sistemas de cultivo) la tasa de autopolinización varía desde el 6 hasta al 20 % de éxito (Lubinsky *et al.*, 2006).

Bajo este contexto, en un estudio se propuso la hipótesis de que la alogamia es probablemente el proceso más observado en la naturaleza, pero lo cierto es que este método reproductivo es muy poco frecuente (Bory *et al.*, 2008); se estima que este fenómeno es el resultado de la baja densidad de las poblaciones silvestres, aunado a la presencia de variedades autoincompatibles en una proporción desconocida (Gamboa, 2014).

Cabe mencionar que las interacciones biológicas han representado un amplio campo de interés en la diversificación de orquídeas, sin embargo, se ha evidenciado en algunas especies de *Vanilla* que, a pesar de existir polinizadores, los eventos de polinización exitosa son muy poco frecuentes, debido al tamaño del diámetro interno del labelo (Macedo, 2000).

Actualmente, la reproducción de *V. planifolia* es predominantemente vegetativa, lo cual contribuye a la disminución de la variabilidad genética (especialmente en cultivares) y en consecuencia ha caído en una depresión genética importante (Borbolla-Pérez *et al.*, 2016), motivo por lo cual se encuentra sujeta a protección especial por la Norma Oficial Mexicana 059-2010 de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).

2.1.5 Problemáticas del cultivo

En lo referente a *V. planifolia* se estima que, de sus frutos se obtiene cerca del 95 % del total de vainillina natural producida a nivel mundial (Azofeifa-Bolaños *et al.*, 2014), lo que la posiciona como la especie de mayor importancia económica del género.

Los frutos de esta especie fueron utilizados probablemente desde la era prehispánica con una amplia variedad de fines: medicinales, alimentarios y culturales. En sus inicios, el cultivo de vainilla consistía en la recolección de frutos resultantes de la polinización natural; posteriormente surgieron sistemas de cultivo que derivaron en el manejo de agro-bosques (Villanueva-Viramontes *et al.*, 2017).

En la actualidad, el cultivo de vainilla se realiza mediante la propagación vegetal de esquejes, provenientes de otras plantaciones previamente establecidas (INIFAP, 2014). El establecimiento de este tipo de plantaciones repercute negativamente en el acervo genético de *V. planifolia*, pues la constante reproducción clonal deriva en la erosión genética de la especie como resultado de la ausencia de variabilidad genética (Hernández-Ruíz *et al.*, 2016).

Aunado a ello, la escasa resistencia ante microorganismos fitopatógenos (Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2015) disminuye la presencia de ejemplares de esta especie en estado silvestre; por lo cual, el acervo genético está compuesto por el limitado número de ejemplares silvestres y principalmente por las plantaciones comerciales establecidas.

Los factores de estrés abiótico, tales como el aumento de temperatura y los periodos largos de sequía son coadyuvantes en la disminución de poblaciones de *V. planifolia*. Hernández-Hernández (2011) describe las condiciones en que la exposición directa al sol puede dañar el follaje en sistemas de cultivo intensivos; por su parte, Borbolla-Pérez *et al.* (2016) demostraron a través de marcadores moleculares que *V. planifolia* presenta un bajo nivel de adaptabilidad a temperaturas ambientales elevadas, derivado de una baja diversidad genética.

Experiencias empíricas de pequeños productores mexicanos afirman que, la combinación de altas temperaturas, bajo nivel de precipitación durante la etapa de fructificación y falta de áreas sombreadas para cultivo, resultan en la caída prematura de los frutos lo cual disminuye el rendimiento en biomasa de vainilla (Borbolla-Pérez *et al.*, 2017).

Los periodos largos de sequía en combinación con exposición a alta irradiación solar alteran la capacidad fotosintética y el metabolismo general de la planta (acumulación de ácidos, absorción masiva de CO₂, disminución de clorofila (Chl) y carotenoides, entre otros) sometiéndola a un estado de inanición que puede derivar en la debilitación gradual de la planta y aumentar la susceptibilidad al ataque de patógenos (Nogués *et al.*, 2006). Los factores de estrés abiótico antes mencionados, han llevado a esta especie a tener pérdidas de hasta un 80 % en biomasa (Borbolla-Pérez *et al.*, 2017) y bajos niveles de supervivencia.

2.2 Estrés abiótico

Se conoce como estrés medioambiental a toda aquella condición desfavorable para el correcto desarrollo y funcionamiento de las plantas (Levitt, 1980); estas condiciones están esencialmente constituidas por factores externos de origen biótico (por la interacción con microorganismos) y/o abiótico (de tipo fisicoquímicos). Estos últimos son originados principalmente por alteraciones en la temperatura, disponibilidad de agua y exposición a sustancias químicas (entre otros), y se estima que pueden causar pérdidas de más del 50 % del rendimiento de los cultivos alrededor del mundo (Gray y Brady, 2016).

2.2.1 Estrés hídrico

El concepto de estrés hídrico incluye dos posibles escenarios contrapuestos: estrés por exceso, o estrés por déficit de agua en el suelo, y habitualmente interactúa sinérgicamente con uno o más factores medioambientales (Hodson y White, 2009).

De este modo, la sequía agrícola es un fenómeno que, debido a su naturaleza está estrechamente relacionado al estrés (por déficit) hídrico (Velasco *et al.*, 2005), y se puede catalogar como un fenómeno transitorio durante el cual, la escasa

disponibilidad del agua (derivada de disminución de la precipitación, pérdidas por evaporación y disminución de reservas de agua en el suelo) en un espacio geográfico se ve considerablemente disminuida respecto del nivel habitual y que en consecuencia afecta negativamente el rendimiento de los cultivos agrícolas (Mishra y Singh, 2010; Batista, 2016).

El monitoreo y predicción oportuna del comportamiento de las sequías en el país son acciones de vital importancia para mitigar sus efectos negativos. En el año 2002 surgió el programa *North American Drought Monitor* (NADM), encargado de monitorear los eventos climáticos y posteriormente analizar su evolución con el paso del tiempo (Lobato-Sánchez, 2016), con ayuda de este sistema, fue posible determinar que el 70 % del territorio mexicano se encuentra atravesando un periodo de sequía prolongado que, si bien tuvo mayor impacto en el año 2012, más del 30 % se ha mantenido en el rango D1 “sequia moderada” según la clasificación de la sequía del NADM (CONAGUA, 2020).

2.2.2 Mecanismos de tolerancia al estrés hídrico

La constante exposición a los factores de estrés abiótico ha llevado a las plantas a desarrollar mecanismos de aclimatación, así como adaptaciones evolutivas de tipo morfológicas, a nivel celular y de tipo moleculares como respuesta inmediata que le permiten tolerar y sobrevivir ante el estrés (Witcombe *et al.*, 2008; Atkinson y Urwin, 2012). La forma en cómo se activan estos mecanismos de respuesta depende directamente del genotipo y las condiciones generales de desarrollo de las plantas al momento de ser expuestas, así como la duración en el tiempo y la intensidad de las condiciones medioambientales que provocan dicho estrés (Peleg *et al.*, 2011).

Levitt (1980) clasificó los mecanismos de respuesta al estrés por déficit hídrico en dos categorías principales, por una parte, los mecanismos de prevención de la deshidratación (modificaciones morfo-fisiológicas como aumento del desarrollo radicular, producción de ceras y ajustes osmóticos, entre otros) y por otra, los de tolerancia de la deshidratación (reubicación de carbohidratos solubles, acumulación de protectores moleculares, etc.).

2.2.3 Respuestas fotosintéticas ante el estrés hídrico

Las condiciones de estrés abiótico presentes en el ambiente influyen negativamente en el proceso de fotosíntesis (Taiz y Zeiger, 2010); la exposición continua a estos ambientes puede generar daños en las plantas al alterar estructuras celulares, reducir la concentración de pigmentos fotosintéticos y las enzimas involucradas en su metabolismo, así como la regulación estomática (De Tafur *et al.*, 2014); al respecto, Niechayev *et al.* (2019) mencionan que las plantas CAM pueden ahorrar energía metabólica y hacer un uso más eficiente del agua durante condiciones de estrés mediante la apertura-cierre de estomas como medida preventiva.

Ashraf y Harris (2013) mencionan que el cierre estomático reduce eficientemente la transpiración, sin embargo, bajo condiciones severas de estrés hídrico, la deshidratación celular puede llevar a la inhibición de la fotosíntesis debido a daños generados en las membranas de los tilacoides y la degradación de pigmentos fotosintéticos (Chl *a* y *b*).

Los pigmentos fotosintéticos (Chl *a* y *b*), son las moléculas encargadas de recolectar la energía solar en los sistemas fotosintéticos; su regulación dentro de las células es un proceso de suma importancia que involucra una serie de reacciones mediadas por enzimas (Beale, 1999). Salehi-Lisar y Bakhshayeshan-Agdam (2016) mencionan que la reducción en el contenido de Chl es una respuesta común durante el estrés hídrico que puede inhibir el crecimiento de las plantas; además, la consecuente reducción de la tasa fotosintética y acumulación de ERO son un factor importante para la activación de mecanismos de tolerancia al estrés como la acumulación de proteínas solubles (PS) y osmolitos compatibles.

2.2.4 Síntesis de proteínas ante el estrés hídrico

Bajo un escenario de exposición crónica las plantas pueden presentar respuestas de tipo morfológicas como la disminución de la expansión foliar y subsecuente expansión radicular; por otra parte, el cierre de estomas es también un mecanismo de resistencia ante la pérdida de agua (Moreno, 2009). Sin embargo, también

pueden activar respuestas a nivel molecular a través de modificaciones en la expresión genética.

En relación con el tipo de estrés y la intensidad de la exposición de las plantas ante dicho estrés, la activación de genes lleva a la planta a la acumulación de proteínas a nivel celular, lo que modifica su patrón proteico (Farooq *et al.*, 2009; Hussain *et al.*, 2011).

Dentro de los principales compuestos de prevención del estrés hídrico, se destacan la prolina (Pro) y glicina betaína (GB), entre otros, por su parte, las proteínas “Late Embryogenesis Abundant” (LEA) y “Heat Shock” (HSP) actúan como un “reemplazo” de la molécula de agua por su capacidad para formar puentes de hidrógeno confiriendo a la célula tolerancia al déficit hídrico (Cardozo y Quiriban, 2018).

La acumulación de PS ha sido documentada como un mecanismo de respuesta rápida ante la exposición a diferentes niveles de estrés hídrico en cultivos como algodón (*Gossypium* L.) (Li *et al.*, 2010); yuca (*Manihot esculenta* Crantz) (Fu *et al.*, 2016) y caña de azúcar (*Saccharum* spp. L.) (Zhang *et al.*, 2020). Gao *et al.* (2020), reportan que la naturaleza de los agentes osmóticos utilizados en el medio de cultivo durante la inducción de estrés puede modificar la cantidad de PS acumuladas y otros compuestos osmoprotectores.

La acumulación de enzimas antioxidantes y aminoácidos libres es también un mecanismo de respuesta ligado al aumento de estrés hídrico que juega un papel importante en la aminoración de los daños producidos por estrés oxidativo (Darvishani *et al.*, 2020).

2.2.5 Síntesis de prolina ante el estrés hídrico

La prolina es un aminoácido multifuncional presente de manera natural en las plantas reconocido por su capacidad de contrarrestar estrés tanto biótico como abiótico; puede actuar de diferentes maneras dentro de la célula: como un osmolito compatible y reductor de radicales libres, estabilizador de membranas, estabilizador del pH del citoplasma, además de que al ser degradado puede proveer energía para

el crecimiento de la planta después de ser sometida a estrés (Szepesi y Szöllősi, 2018).

La síntesis de Pro comienza con la degradación del glutamato a glutamato-semialdehído (GSA) por la enzima pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS1) y su espontánea conversión en pirrolina-5-carboxilato (P5C). La P5C reductasa (P5CR) convierte al PC5 en Pro; de manera alternativa, Pro puede ser sintetizada a partir de la ornitina, la cual es transaminada por la ornitina- δ -aminotransferasa (δ OAT), esta es convertida en GSA, PC5 y consecuentemente en Pro (Verbruggen y Hermans, 2008).

El catabolismo de Pro ocurre en la mitocondria en presencia de Pro-deshidrogenasa (PDH) o Pro-oxidasa (POX) la cual produce PC5 a partir de Pro y posteriormente la PC5 deshidrogenasa (PC5DH) convierte al GSA en glutamato (Hayat *et al.*, 2012).

Moléculas como Pro, GB, ascorbato y azúcares con alto poder reductor, son considerados antioxidantes no enzimáticos, y se ha demostrado que su acumulación tiene un efecto positivo sobre el mantenimiento de la homeostasis celular y la prevención del daño al ADN por la interacción con ERO (Matysik *et al.*, 2002; De Carvalho *et al.*, 2013; Moreno-Galván *et al.*, 2020).

2.2.6 Síntesis de glicina betaína en el estrés hídrico

Glicina betaína es un compuesto cuaternario de amonio derivado de la glicina presente en bacterias, animales y plantas de manera natural, y forma parte de un grupo de compuestos conocidos como “solutos compatibles”. La acumulación de GB en plantas superiores está relacionada con la tolerancia a estrés abiótico debido a que en condiciones de alta salinidad y temperatura actúa como un estabilizador de la estructura cuaternaria de enzimas y proteínas y ayuda a mantener la estabilidad de las membranas celulares (Chen y Murata, 2011).

En la mayoría de los sistemas biológicos, GB puede ser sintetizada mediante dos vías, específicamente en plantas, la primera parte de colina, la cual es oxidada por colina monooxigenasa (CMO) a betaína aldehído y posteriormente oxidada a GB por NAD⁺-dependiente de betaína aldehído deshidrogenasa (BADH). La segunda

vía comienza con la fosfoetanolamina: N-metiltransferasa, una enzima citosólica que cataliza los tres pasos de las reacciones de metilación en la conversión de fosfoetanolamina a fosfocolina (McNeil *et al.*, 2000; Chen y Murata, 2011).

Se ha demostrado que el incremento de GB ya sea por inducción exógena con microorganismos, o mediante la transformación genética de plantas influye en una amplia variedad de mecanismos de tolerancia al estrés hídrico. Los principales factores que participan en dichas respuestas son la concentración y la ubicación de GB dentro de la célula (Giri, 2011; Ahmad *et al.*, 2013).

Park *et al.* (2007) demostraron que la acumulación de GB en cloroplastos de plantas transgénicas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) fue más efectiva que su acumulación en el citosol; por su parte, Carrillo (2018) sugiere que GB funge como un protector de la maquinaria fotosintética ante la reducción de la fijación de CO₂ por RuBisCO en hojas jóvenes de Amarantáceas. Por su parte, Pei *et al.* (2020) mencionan que la presencia de azúcares solubles incrementa el efecto osmoprotector de GB incrementando la absorción de agua, asimilación de CO₂ y protección de los órganos reproductivos durante diferentes etapas de desarrollo de maíz (*Zea mays* L.) Para evaluar la inducción de estrés osmótico *in vitro* y la acumulación de osmolitos compatibles se ha implementado el uso de diversas herramientas biotecnológicas.

2.3 Herramientas de cultivo de tejidos en el fitomejoramiento

El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas utilizadas para desarrollar células, tejidos u órganos vegetales bajo condiciones completamente asépticas *in vitro* y está basado en el principio de totipotencialidad de las células vegetales (Pérez-Molphe *et al.*, 1999). Las principales áreas de interés que utilizan el cultivo de tejidos son la micropropagación, sanidad vegetal, conservación de germoplasma e investigación aplicada en genética, fisiología y bioquímica de cultivos de interés agronómico (Ramírez *et al.*, 2012; Morales, 2015).

La obtención de nuevas plantas se origina de las tres vías de regeneración *in vitro* existentes (brotación y proliferación de yemas, embriogénesis somática y

organogénesis) en función de las necesidades de cada área de interés, lo cual ha llevado al desarrollo de diferentes técnicas de cultivo *in vitro* como el uso de medios de cultivo semisólidos, medios líquidos y la adaptación de estos en sistemas de inmersión temporal (Pérez-Molphe *et al.*, 1999; Muñiz, 2018).

La micropropogación de especies de interés agronómico trae consigo el uso de herramientas biotecnológicas que facilitan significativamente su manejo, conservación y especialmente mejora genética; tres de las herramientas más utilizadas son la selección inducida, el uso de marcadores moleculares e ingeniería genética (Wawrosch, 2010).

Bajo este contexto, el cultivo *in vitro* ha demostrado ser una herramienta eficiente para la selección de plantas con caracteres genotípicos importantes como producción de metabolitos secundarios, alto rendimiento y tolerancias a factores de estrés entre otros, además, ofrece como ventajas la disminución del tiempo y costos para la multiplicación y monitoreo del material vegetal y la posibilidad de aumentar la frecuencia de aparición de mutaciones génicas y puntuales derivadas de la variación somaclonal generada durante el cultivo *in vitro* (Penna *et al.*, 2012; Nikam *et al.*, 2015; Martínez-Estrada *et al.*, 2017; Masoabi, *et al.* 2018; Kunene y Masarirambi, 2018; Naheed *et al.*, 2020).

2.3.1 Selección *in vitro* y uso de PEG como agente osmótico

El uso de agentes osmóticos añadidos en medio de cultivo *in vitro* ha sido ampliamente utilizado como un método para inducir tolerancia a estrés hídrico; esto permite aislar y multiplicar masivamente plantas que presenten posible tolerancia ante factores de estrés (Gutiérrez *et al.*, 2003).

El PEG es un poliéter ramificado lineal disponible en una amplia variedad de pesos moleculares; y es uno de los agentes osmóticos más utilizados para la selección *in vitro* de plantas tolerantes al estrés hídrico, debido a su eficiencia en la interacción con otras moléculas, lo cual le permite generar distintos potenciales osmóticos en los medios de cultivo (Michel y Kaufmann, 1973; Harris, 2013).

A diferencia de otros agentes osmóticos como el manitol o el sorbitol, el PEG rechaza eficientemente otros polímeros cuando se encuentra en medios acuosos, lo cual le confiere una baja interacción con proteínas y la capacidad de separación de fases acuosas, por lo cual, no puede ser metabolizado por la célula y mantiene un potencial osmótico (Ψ s) uniforme en el medio de cultivo (Money, 1989).

Algunos autores sugieren que el uso de PEG 6000 en la inducción de estrés hídrico *in vitro* es un método muy útil para evaluar las respuestas generadas por la interacción estrés-planta, sin la influencia de los daños potenciales que otros agentes osmóticos pueden causar a nivel celular; en el Cuadro 2 se muestran algunas concentraciones de PEG 6000 utilizadas en la inducción de estrés hídrico de diferentes cultivos.

Cuadro 2. Concentraciones de PEG 6000 utilizadas en la inducción de estrés hídrico *in vitro*.

Cultivo	Concentración de PEG (% p/v)	Referencia
<i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni) Bertoni	2, 4 y 6	Hajihashemi y Ehsanpour (2014)
<i>Beta vulgaris</i> L.	1, 2, 4, 6 y 8	Sen y Alikamanoglu (2012)
<i>Ricinus communis</i> L.	2.5, 5, 7.5 y 10	De Araujo <i>et al.</i> (2016)
<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.	1, 2 y 4	Mengesha, <i>et al.</i> (2016)
<i>Saccharum</i> spp. L.	0.5, 1, 1.5, 2 y 20	Masoabi <i>et al.</i> (2017)
<i>Arachis hypogaea</i> L.	2, 4 y 6	Abdulmalik <i>et al.</i> (2018)
<i>Populus alba</i> L.	1, 2, 4 y 5	Vuksanović, <i>et al.</i> (2019)

3 OBJETIVOS

General

- Evaluar la respuesta al estrés hídrico *in vitro* de *V. planifolia* inducido con diferentes concentraciones de polietilenglicol (PEG 6000).

Específicos

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de PEG 6000 sobre el crecimiento *in vitro* de *V. planifolia*.
- Determinar el contenido de clorofila, proteínas solubles, prolina y glicina betaína como respuesta bioquímica al estrés hídrico inducido por PEG 6000.
- Determinar el índice estomático y porcentaje de estomas abiertos de las plantas regeneradas.

4 HIPÓTESIS

Si polietilenglicol es un agente osmótico que induce estrés hídrico *in vitro*, entonces al ser adicionado al medio de cultivo a diferentes concentraciones tendrá efecto en el crecimiento de brotes y contenido endógeno de clorofila, proteínas solubles, prolina y glicina betaína.

5 MATERIALES Y METODOS

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Colegio de Postgraduados (COLPOS) Campus Córdoba, ubicado en el km. 348 de la carretera federal Córdoba-Veracruz, congregación Manuel León, Amatlán de los Reyes, Ver. En la Figura 1 se muestra la estrategia experimental llevada a cabo.

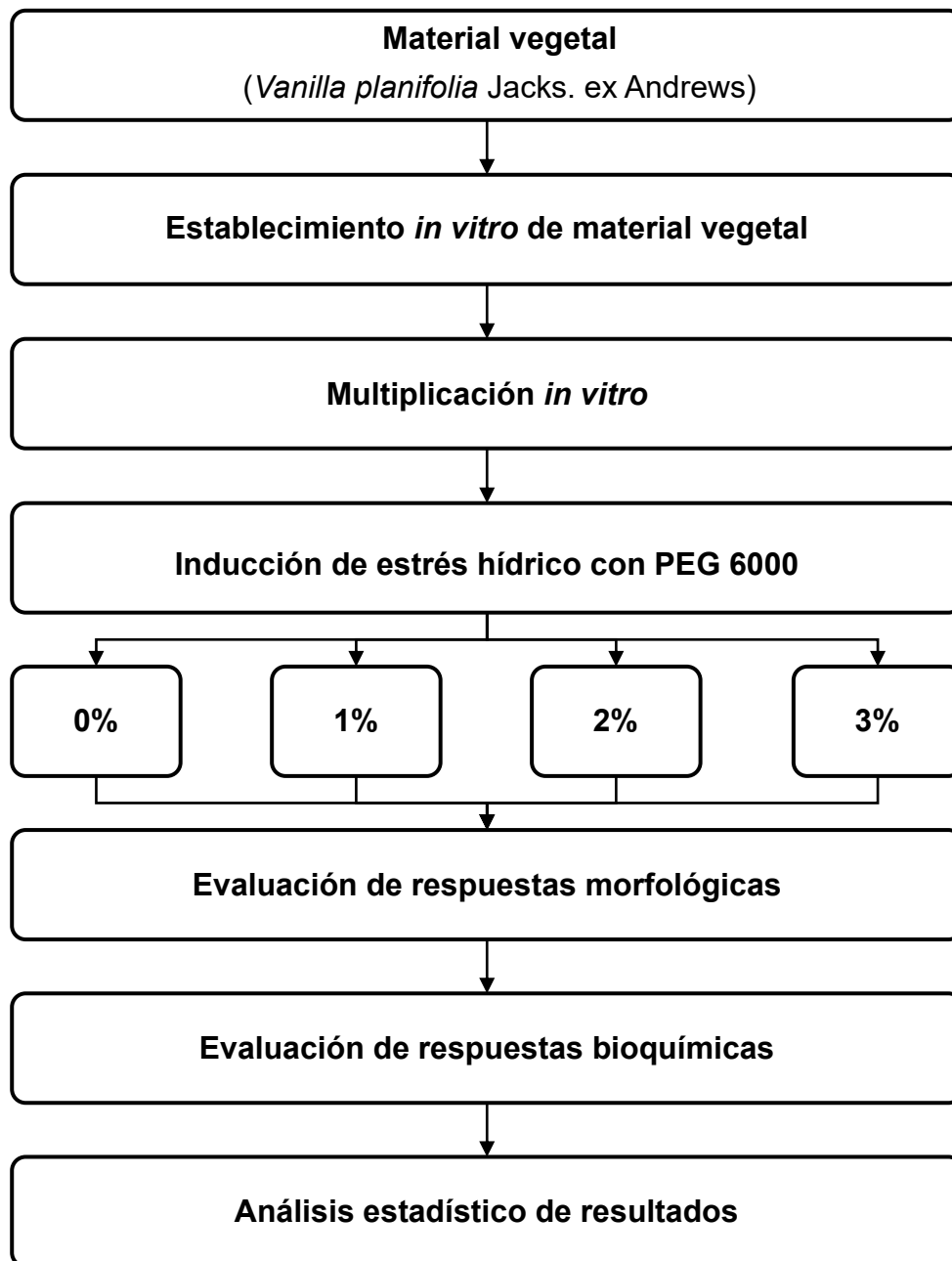


Figura 1. Estrategia experimental.

5.1 Establecimiento y multiplicación del material vegetal

Se colectaron estacas jóvenes con ocho yemas de *V. planifolia* provenientes de una plantación comercial ubicada en la localidad de El Palmar, Emiliano Zapata, Veracruz, México. Las estacas se mantuvieron en cuarentena bajo condiciones de invernadero a una irradiancia de $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, y $60 \pm 5 \%$ de humedad relativa, con aplicaciones una vez por semana de solución fungicida al 0.1 % (p/v) (Cupravit[®], Bayer AG, Leverkusen, Nordrhein-Westfalen, Germany) y solución bactericida al 0.1 % (p/v) (Agri-mycin, Pfizer, New York, New York, USA).

Después de 40 d se colectaron entrenudos de tres a cinco cm de largo. Los entrenudos fueron transferidos al laboratorio en donde se lavaron con detergente comercial Axion[®] (Mission Hills, S.A. de C.V., San José de Iturbide, Guanajuato, México) y agua corriente; posteriormente, se redujeron a dos cm de longitud y fueron inmersos en una solución de jabón con dos gotas de Tween 20[®] (Sigma-Aldrich[®] Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA) por cada 100 mL por 5 min seguido de cinco enjuagues con agua destilada.

En campana de flujo laminar, los explantes fueron sumergidos en una solución al 15 % (v/v) de NaClO comercial (5 % IA, Clorox[®], Monterrey, Nuevo León, México) durante 5 min y se realizaron dos enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente, los explantes se sumergieron en una solución de HgCl₂ al 0.1 % (p/v) y se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Finalmente, los explantes desinfectados se transfirieron individualmente a frascos de 500 mL que contenían 30 mL de medio de multiplicación MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 2 mg L⁻¹ de 6-Bencilaminopurina (BAP) (Sigma-Aldrich[®]) y 2.3 g L⁻¹ de Phytigel[®] (Sigma-Aldrich[®]) como agente gelificante.

El pH del medio se ajustó a 5.8 con NaOH 1N y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C y 117.7 kPa. Todos los cultivos fueron incubados a $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 h con lámparas fluorescentes a una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

1.

5.2 Inducción de estrés hídrico con PEG

Para la presión de selección *in vitro* con PEG, se utilizaron brotes de dos cm de longitud obtenidos después de cuatro subcultivos en medio de multiplicación. Los brotes fueron cultivados en tubos de ensaye de 22 x 150 mm conteniendo 20 mL de medio semisólido MS sin reguladores de crecimiento y diferentes concentraciones de PEG 6000 PM (Sigma-Aldrich®) (0, 1, 2 y 3 % p/v). El pH del medio de cultivo, las condiciones de esterilización e incubación fueron las mismas descritas anteriormente.

Cada tratamiento consistió en 10 tubos de ensaye con un explante cada uno. A los 45 d de cultivo, se evaluaron las diferentes variables morfológicas y porcentaje de materia seca (MS). El contenido de materia seca se calculó utilizando la fórmula peso seco (PS) / peso fresco (PF) × 100. Se determinó el contenido de Chl, PS, Pro, GB y se evaluó el índice estomático (IE) y el porcentaje de estomas abiertos.

5.3 Medidas de potencial osmótico del medio de cultivo

El potencial osmótico (Ψ_s) de los medios de cultivo semisólido con diferentes concentraciones de PEG se determinó utilizando un osmómetro de presión de vapor (5520 Vapro, Wescor Inc., Logan, Utah, USA).

5.4 Determinación del contenido total de clorofila

El contenido total de Chl fue determinado de acuerdo a la metodología propuesta por Harborne (1973) modificada por Martínez-Estrada *et al.* (2019). Las absorbancias fueron medidas en un espectrofotómetro (Genesys 10S, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) a 663 nm y 645 para Chl a y b, respectivamente. El contenido total de Chl fue calculado utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Chl total (C)} = \left[(8.20 * A_{663}) - (20.2 * A_{645}) \right] (V) / (1000 * W)$$

Donde:

A_{663} y A_{645} : son las absorbancias

C: Concentración (mg g^{-1} PF)

V: graduación de volumen en mL^{-1}

W: peso de la muestra en g

1000: factor de conversión

5.5 Determinación del contenido de proteínas solubles

La estimación de PS se llevó a cabo por el método propuesto por Bradford (1976). Se pesaron 100 mg del material vegetal fresco y se maceró en un mortero en 25 mL de acetona fría por 5 s. El tejido macerado fue filtrado al vacío y se agregaron 12.5 mL de acetona. Al extracto obtenido se agregaron 5 mL de Buffer TRIS-HCl 0.1M (pH 7.1) y fue colocado en baño con hielo. Posteriormente, se centrifugaron a 3100 g por 20 min a 4 °C. Se tomó una alícuota de 100 μL del sobrenadante y fueron agregados a 4.9 mL de reactivo Bradford. Al cabo de 12 min de reacción, el cromóforo se leyó a una absorbancia de 595 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S). La cuantificación se hizo mediante una curva de calibración con albúmina de bovino (Hoffmann-La Roche Ltd., Grenzacherstrasse, Basel, Switzerland).

5.6 Determinación del contenido de prolina

La determinación de Pro se realizó por el método descrito por Bates *et al.*, (1973). Se maceraron 125 mg de tejido foliar fresco en un mortero y se homogeneizó con 5 mL de ácido sulfosalicílico 3 % (p/v). La solución resultante se filtró (Whatman #2) y se tomó una alícuota de 1 mL y se le agregaron 1 mL de ácido acético glacial y 1 mL de ninhidrina. Se realizó la incubación de 1 mL del extracto en baño termostático durante una hora a 100 °C. Se retiraron los tubos y la reacción se terminó con un baño de hielo. Se añadieron 2 mL de tolueno y se agitó por 30 s para la separación de fases. El cromóforo resultante se leyó a una absorbancia de 520 nm en el espectrofotómetro (Genesys 10S) utilizando tolueno como blanco. La cuantificación se hizo mediante una curva de calibración con estándar de L-prolina (Sigma-Aldrich®).

5.7 Determinación del contenido de glicina betaína

La determinación de GB se llevó a cabo por el método propuesto por Grieve y Grattan (1983). Para ello se pesaron 100 mg de tejido foliar seco y se hicieron reaccionar con agua y H₂SO₄ 2N al terminar la adición de 0.2 mL de KI-I₂. La extracción se realizó mediante centrifugado a 3100 g por 20 min a 4 °C y la posterior adición de 9 mL de 1,2-Dicloroetano. Se midió la absorbancia a 365 nm en espectrofotómetro (Genesys 10S) utilizando 1,2-Dicloroetano como blanco. La cuantificación se hizo mediante una curva de calibración con estándar de betaína (Sigma-Aldrich®).

5.8 Índice estomático y porcentaje de estomas abiertos

El IE y el porcentaje de estomas abiertos se midieron en el envés de la tercera hoja en relación con el ápice caulinar de los brotes. El IE se determinó mediante la fórmula: $IE = [\text{número de estomas} / (\text{número de células epidérmicas} + \text{número de estomas})] \times 100$. Para visualizar los estomas y células epidérmicas por mm², las muestras de hojas se examinaron bajo un microscopio (Axio Lab.A1, Carl Zeiss AG, Jena, Thuringia, Germany). El porcentaje de estomas abiertos se calculó mediante número total de estomas y el número de estomas abiertos.

5.9 Diseño experimental y análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados con un diseño completamente al azar y fueron replicados tres veces. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) seguido de una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) mediante el software estadístico SPSS (versión 22 de Windows). Previo al análisis estadístico, los valores reportados en porcentaje fueron transformados mediante la fórmula: $Y = \arcsen(\sqrt{(x/100)})$, donde x es el valor del porcentaje.

6 RESULTADOS

6.1 Estrés osmótico inducido por PEG

El potencial osmótico (Ψ_s) del medio de cultivo aumentó conforme incrementaron las concentraciones de PEG, obteniendo valores de $\Psi_s = -0.14, -0.23, -0.32$ y -0.43 MPa para 0, 1, 2 y 3 % PEG respectivamente. Al evaluar el efecto de diferentes concentraciones de PEG sobre el crecimiento *in vitro* de *V. planifolia*, se observaron diferencias significativas en la longitud de brotes, número de hojas, número y longitud de raíces y porcentaje de materia seca (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de diferentes concentraciones de PEG 6000 en el crecimiento *in vitro* de *Vanilla planifolia*.

PEG (%)	Longitud (mm)	No. de hojas	No. de raíces	Long. de raíz (mm)	Materia seca (%)
0	67.60±3.05 ^a	5.70±0.30 ^a	5.80±0.20 ^a	31.00±1.59 ^a	7.15±0.22 ^b
1	37.40±2.07 ^b	3.10±0.23 ^b	4.20±0.33 ^b	24.20±2.55 ^b	10.60±0.61 ^a
2	41.00±3.07 ^b	3.00±0.26 ^b	4.70±0.37 ^b	18.90±1.21 ^b	11.03±0.69 ^a
3	26.60±0.81 ^c	2.00±0.21 ^c	2.60±0.22 ^c	11.10±0.64 ^c	13.21±0.97 ^a

Los valores representan la media \pm ES (error estándar) a los 60 d de cultivo. Medias con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

De manera general, el crecimiento *in vitro* de *V. planifolia* redujo al incrementar las concentraciones de PEG. Los brotes de mayor longitud se obtuvieron en 0 % PEG, con 67.6 mm de altura; mientras que, los brotes de menor longitud se obtuvieron en 3 % PEG, con 26.6 mm de altura. Para la variable número de hojas por brote, el mayor número de hojas se observó en 0 % PEG con 5.7 hojas por brote; mientras que, la menor cantidad de hojas se observó en 3 % PEG, con 2 hojas por brote. Para las variables número y longitud de raíz, los brotes de mayor cantidad y longitud de raíz se observó en 0 % PEG, con 5.8 raíces por brote y 31 mm de longitud en promedio; mientras que, el menor número y tamaño de raíces se encontró en el

tratamiento con 3 % PEG, con 2.6 raíces por brote y 11.1 mm de longitud promedio (Figura 2).

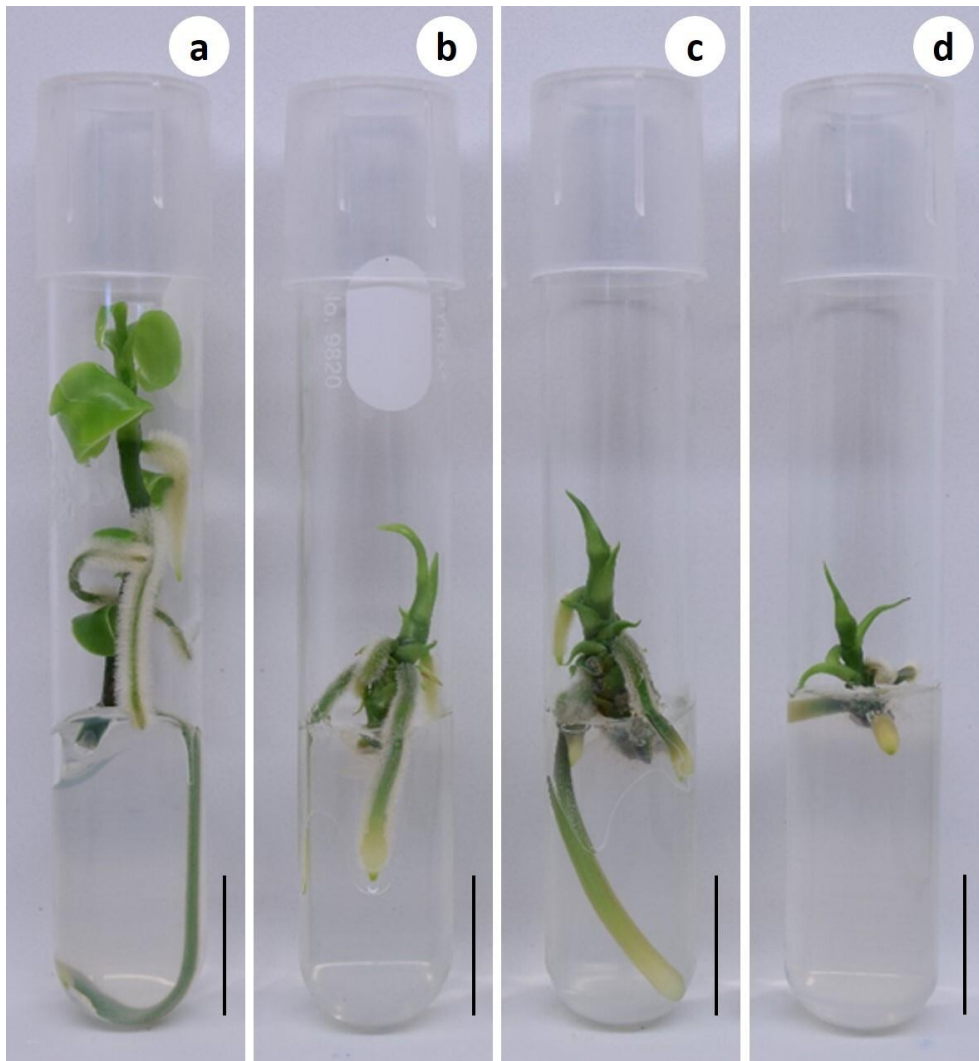


Figura 2. Efecto de diferentes concentraciones de PEG 6000 en el crecimiento de *Vanilla planifolia* a los 60 d de cultivo. a - d) 0, 1, 2 y 3 % PEG 6000 respectivamente. Barra= 2 cm.

Respecto al contenido de materia seca, los mayores porcentajes se observaron en los tratamientos con PEG, con porcentajes de entre 10.6 - 13.21 % mientras que en el tratamiento control se observó el menor porcentaje, con 7.15 %.

6.2 Contenido de clorofila

Se observaron diferencias significativas en el contenido total de Chl en hojas de plántulas de *V. planifolia* expuestas a distintas concentraciones de PEG 6000. El mayor contenido de Chl se observó en el tratamiento con 0 % PEG con 0.45 mg g^{-1} PF, seguido de los tratamientos 1, 2 y 3 % PEG con 0.38 , 0.29 y 0.24 mg g^{-1} PF respectivamente (Figura 3a).

6.3 Contenido de proteínas solubles

Se observaron diferencias en el contenido de PS en las todas las concentraciones de PEG. El mayor contenido de PS se observó en el tratamiento con 1 % PEG, con 22.76 mg g^{-1} PF; mientras que, los contenidos menores de PS se observaron en los tratamientos con 2, 3 y 0 % PEG, con 16.52 , 13.20 y 2.94 mg g^{-1} PF respectivamente (Figura 3b).

6.4 Contenido de prolina

Se observó un incremento gradual del contenido de Pro al aumentar la concentración de PEG. El mayor contenido de Pro se observó en 3 % PEG, con $2.72 \text{ } \mu\text{M g}^{-1}$ PF, mientras que los menores contenido se observaron en los tratamientos con 2, 1 y 0 % PEG, con 1.22 , 0.96 y $0.81 \text{ } \mu\text{M g}^{-1}$ PF respectivamente (Figura 3c).

6.5 Contenido de glicina betaína

Se observó un incremento gradual en el contenido de GB al aumentar la concentración de PEG. El mayor contenido de GB se observó en 3 % PEG, con $28.28 \text{ } \mu\text{M g}^{-1}$ PF, mientras que, los contenidos menores se observaron en los tratamientos con 2, 1 y 0 % PEG, con 14.89 , 11.08 y $4.08 \text{ } \mu\text{M g}^{-1}$ PF respectivamente (Figura 3d).

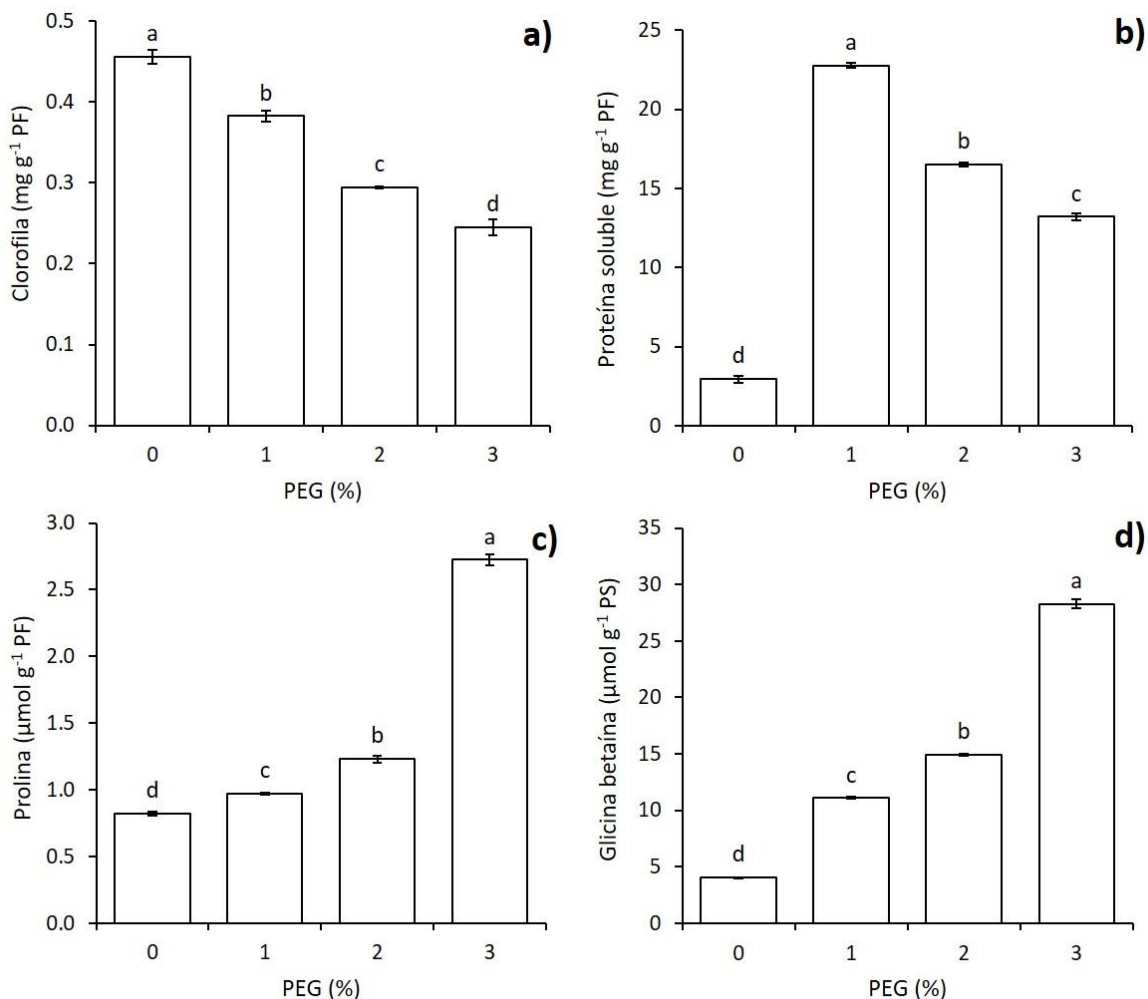


Figura 3. Efecto de PEG 6000 en respuestas bioquímicas de brotes *in vitro* de *Vanilla planifolia* a los 60 d de cultivo. a) clorofila total, b) prolina, c) glicina betaína y d) proteínas solubles. Los valores representan la media \pm ES (error estándar) Medias con diferente letra, son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

6.6 Índice estomático y porcentaje de estomas abiertos

Se observaron diferencias significativas en el IE y porcentaje de estomas abiertos de *V. planifolia* expuestas a diferentes concentraciones de PEG. El mayor IE se observó en el tratamiento control con 4.44, seguido por los tratamientos con 1, 2 y 3 % PEG con 3.79, 3.67 y 3.52 IE respectivamente (Figura 4). El mayor porcentaje de estomas abiertos se observó en el tratamiento control con 93.33 %, seguido por los tratamientos con PEG, con porcentajes entre 82 - 76 % de estomas abiertos (Figura 5).

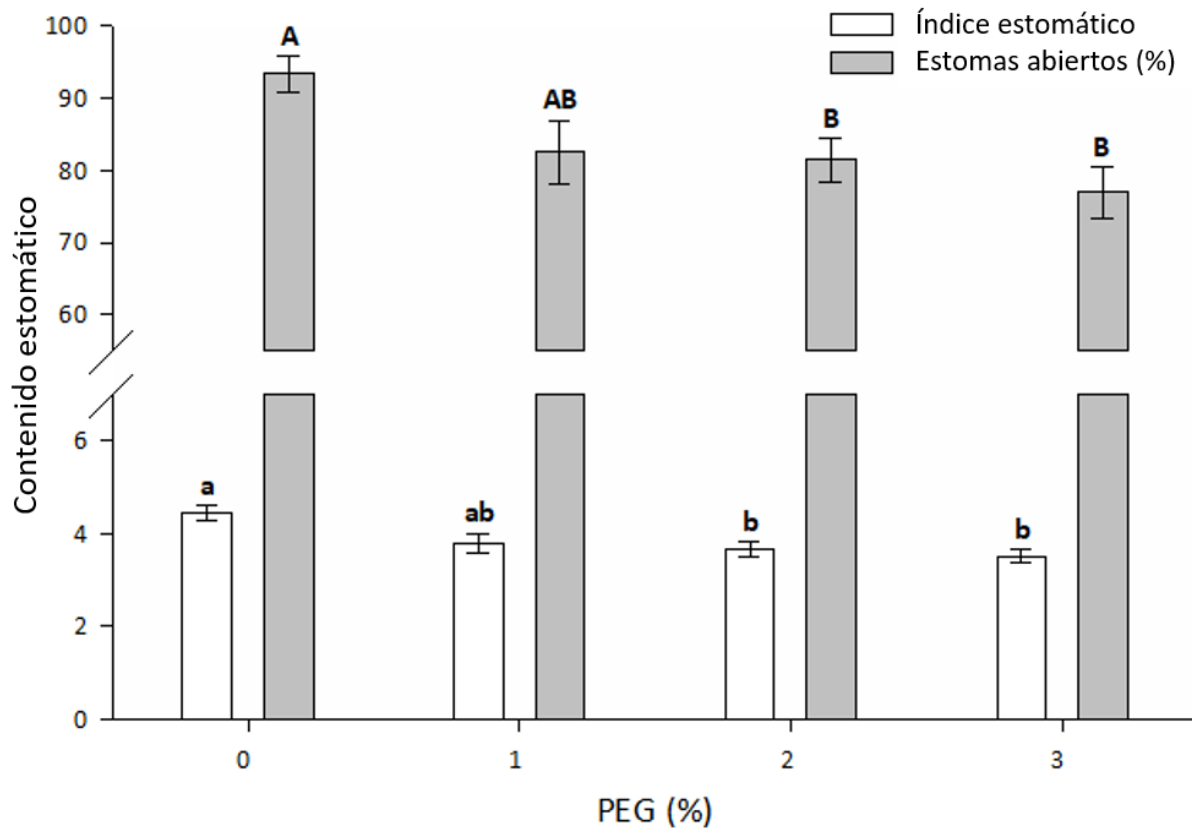


Figura 4. Efecto de PEG 6000 en el contenido estomático de brotes *in vitro* de *Vanilla planifolia* a los 60 días de cultivo. Los valores representan la media \pm ES (error estándar). Medias con diferente letra, son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

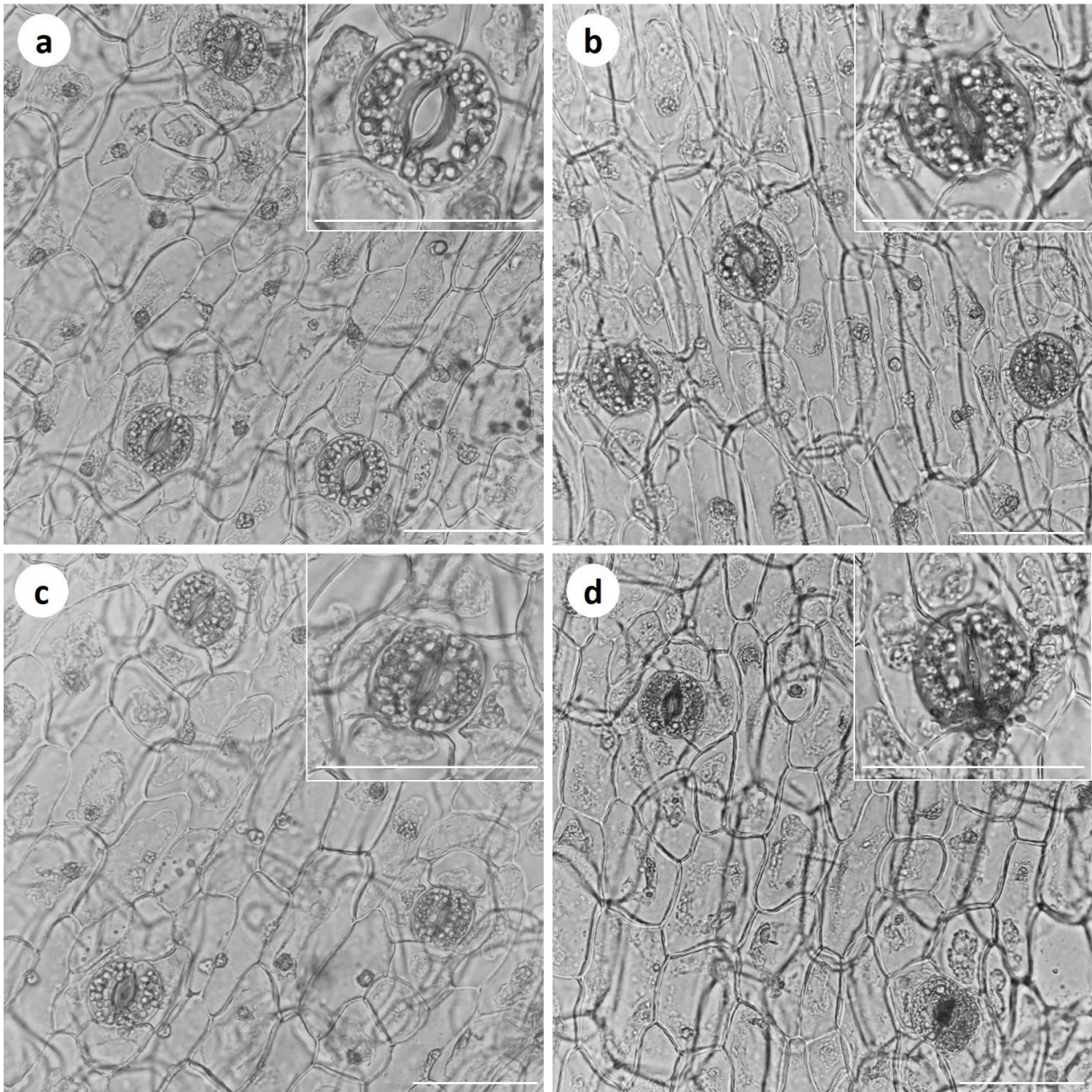


Figura 5. Efecto de diferentes concentraciones de PEG en el índice estomático y estomas abiertos de *Vanilla planifolia*. a - d) 0, 1, 2 y 3 % PEG 6000 respectivamente. Barra = 2.5 μm .

7 DISCUSIÓN

7.1 Efecto de PEG sobre el crecimiento *in vitro* de *V. planifolia*

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el crecimiento *in vitro* de *V. planifolia* es afectado bajo condiciones de estrés osmótico inducido por diferentes concentraciones de PEG. Las diferentes concentraciones de PEG tuvieron un efecto sobre el potencial osmótico del medio de cultivo ($\Psi_s = -0.14, -0.23, -0.32$ y -0.43 MPa para 0, 1, 2 y 3 % PEG). El estrés osmótico inducido por el PEG 6000 afecta el crecimiento *in vitro* de *V. planifolia*. Una de las estrategias más importantes que las plantas han adoptado frente al estrés osmótico es detener o disminuir su crecimiento (Queirós *et al.*, 2007; Darvishani *et al.*, 2020). De hecho, el crecimiento lento es una respuesta adaptativa para la supervivencia de las plantas ante condiciones de estrés (Rao *et al.*, 2006).

Bello-Bello *et al.*, (2015) reportaron que, durante la conservación *in vitro* de *V. planifolia* utilizando 3 % PEG 6000, este agente osmótico actúa como un inhibidor de crecimiento. Resultados similares fueron descritos por Gao *et al.* (2020), reportaron diferencias significativas en el crecimiento de brotes de *D. officinale* en 1, 3 y 5 % PEG 6000. Jácome-Blásquez *et al.* (2016) en *P. vitellina* reportaron una reducción en la germinación al aumentar la concentración de PEG 8000. Ramírez-Mosqueda *et al.* (2019) obtuvieron en *Laelia anceps* Lindl., el menor número de hojas y raíces por explante en 3 % PEG 8000. Piwowarczyk *et al.* (2014) reportaron un aumento del contenido de materia seca en brotes de ocho genotipos de almorta (*Lathyrus sativus* L.) en 5, 10 y 15 % PEG 6000. De acuerdo a Rai *et al.* (2011), la inhibición del crecimiento bajo estrés hídrico está asociada con una reducción en la capacidad de las plantas para absorber agua y nutrientes ocasionada por la disminución del potencial hídrico del medio cultivo.

En este estudio, la inhibición del crecimiento de brotes de *V. planifolia in vitro* en presencia de PEG, podría explicarse por la síntesis de ABA (ácido abscísico) causando una reducción en la transpiración debido al cierre de estomas. Por otro lado, el incremento de materia seca en presencia de PEG podría explicarse por la síntesis de proteínas específicas, aminoácidos, osmolitos compatibles, y

metabolitos de respuesta al estrés hídrico y probablemente debido a la acumulación de iones.

7.2 Contenido de clorofila

En este estudio se observó una disminución del contenido total de Chl en brotes de *V. planifolia* en relación con el incremento de la concentración de PEG. En Orquidáceas *in vitro*, Gao *et al.* (2020) reportaron una disminución de Chl en brotes de *D. officinale* expuestos a 0, 1, 3 y 5 % PEG 6000. Suis *et al.* (2015) en protocormos de *Aranda Broga Blue Bell* observaron una reducción de Chl con 15 % PEG 400. La reducción del contenido de Chl en *V. planifolia* bajo estrés hídrico (-0.9 MPa) ha sido reportada bajo condiciones *ex vitro* (Chandran y Puthur, 2009). La reducción en el contenido de Chl bajo estrés hídrico es ocasionada por una disminución de la actividad fotosintética debido al cierre de estomas (Hussain *et al.*, 2018). La baja actividad fotosintética está relacionada con la acumulación de materia seca como resultado al estrés osmótico afectando el transporte de carbohidratos (Tokarz *et al.*, 2020). Además, de una baja actividad fotosintética, la degradación de Chl es un mecanismo de respuesta para evitar desgaste energético (Hu *et al.*, 2020; Razavizadeh *et al.*, 2019; Miglani *et al.*, 2020).

7.3 Contenido de proteínas solubles

Los resultados de los análisis bioquímicos mostraron diferencias significativas sobre los contenidos de PS, Pro y GB (Figura 4). El contenido de PS disminuyó al incrementar la concentración de PEG en los brotes de *V. planifolia*; sin embargo, las PS fueron significativamente superiores en todos los tratamientos con PEG respecto al tratamiento control. La variación en el contenido de PS es una respuesta de tolerancia al estrés hídrico (Ilyas *et al.*, 2020) relacionada con la síntesis, acumulación o degradación. El incremento en el contenido de proteínas está relacionada a la síntesis de hidrofílicas (Battaglia, *et al.*, 2008), acuaporinas (Hussain *et al.*, 2011), dehidrinas (Chiappeta *et al.*, 2015) enzimas antioxidantes (Sewelam *et al.*, 2016), chaperoninas (Zia *et al.*, 2020), entre otras. Las plantas pueden sintetizar este tipo de proteínas para neutralizar el estrés oxidativo y estrés osmótico (Li *et al.*, 2020; Zia *et al.*, 2020).

Qayyum *et al.* (2018) reportaron un incremento en el contenido de proteínas en plántulas de cinco cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.) expuestas a distintos potenciales osmóticos (-0.2, -0.4 y -0.6 MPa) generados con PEG 6000. En contraste, Razavizadeh *et al.* (2019) observaron una disminución del contenido de proteínas en plántulas de tomillo (*Thymus vulgaris* L.) cultivadas bajo 2, 4, 6 y 8 % PEG 6000. De manera similar, Gao *et al.*, (2020), observaron una disminución del contenido de proteínas en brotes de *D. officinale* cultivados bajo estrés hídrico inducido con 1, 3 y 5 % PEG 6000. Suis *et al.* (2015) observaron una reducción de PS utilizando PEG 400 (0, 5, 10 y 15 %) en protocormos de *Aranda*. Chandran y Puthur (2009) mencionan que la disminución del contenido de PS en el somaclon V₄ de *V. planifolia* bajo estrés hídrico (-0.9 MPa) puede deberse a su degradación.

Los resultados de este estudio sugieren que bajo las condiciones *in vitro* evaluadas, la acumulación de proteínas en los tratamientos con PEG podría estar relacionada por dos hipótesis: 1) el aumento en la acumulación PS en 1 % PEG es ocasionada por la biosíntesis de proteínas específicas como mecanismo de tolerancia al estrés osmótico; mientras que, 2) la disminución en el contenido PS a dosis de 2 y 3 % PEG podría deberse a una reducción en la biosíntesis y/o su degradación. Razavizadeh *et al.* (2019) mencionan que la degradación de proteínas bajo estrés osmótico provee fuentes de nitrógeno utilizado en diferentes procesos metabólicos.

7.4 Contenido de prolina

La acumulación de Pro en plantas es una respuesta fisiológica ante el estrés salino e hídrico mediante la reducción del tejido vegetal (Forlani *et al.*, 2019). En condiciones de estrés hídrico, Pro actúa como estabilizador de proteínas estructurales, osmolito compatible y catalizador de actividad de enzimas antioxidantes (Kaur y Asthir, 2015). En nuestro estudio se observó un incremento significativo del contenido de Pro en los brotes expuestos a PEG; sin embargo, el tratamiento con 3 % PEG mostró dos veces su contenido respecto al tratamiento control. Este resultado demuestra que la Pro tiene un rol en los mecanismos de tolerancia al estrés hídrico en *V. planifolia*.

Otros estudios demuestran que Pro es un indicador bioquímico que contribuye a los mecanismos de tolerancia al estrés hídrico. Piwowarczyk *et al.* (2014) en brotes de *L. sativus*, reportaron un aumento en el contenido de Pro en 5, 10 y 15 % PEG 6000. Razavizadeh *et al.* (2019) en brotes de *T. vulgaris* observaron un incremento en la acumulación de Pro en 2, 4, 6 y 8 % PEG. En Orquidáceas, Jácome-Blásquez *et al.* (2016) en *P. vitellina* observaron que el contenido de Pro aumentó dos veces más que el tratamiento control al incrementar la concentración de PEG 8000. En contraste, Gao *et al.* (2020) reportaron en brotes de *D. officinale* que el contenido de Pro disminuyó en los tratamientos con 1, 3 y 5 % PEG 6000. Además de Pro, existen otros osmolitos como azúcares y GB que se acumulan en respuesta al estrés hídrico (Seleiman *et al.*, 2021).

7.5 Contenido de glicina betaína

El contenido de GB mostró un aumento significativo al exponer los brotes de *V. planifolia* a PEG. A la fecha, no se ha reportado la acumulación de GB en *V. planifolia* bajo estrés hídrico *in vitro*. Sin embargo, se han reportado acumulación de GB en otras especies. Hajihashemi y Ehsanpour (2013) en *S. rebaudiana* reportaron acumulación de GB en brotes expuestos a 2, 4 y 6 % PEG 6000. Datir e Inamdar (2019) observaron que la acumulación de GB aumentó en todos los cultivares de *T. aestivum* en respuesta al estrés hídrico inducido por 15 % PEG 6000. Jácome-Blásquez *et al.* (2016) en *P. vitellina* observaron aumento en el contenido de GB en 5 - 15 % PEG 8000. La GB es un osmolito compatible que actúa como osmoprotector, mantiene la actividad fotosintética protegiendo la membrana de las tilacoides y neutraliza a las ERO mediante la regulación de la expresión de genes de respuesta a estrés oxidativo durante estrés osmótico (Yang *et al.*, 2008; Chen y Murata, 2011; Zhang *et al.*, 2017; Ilyas *et al.*, 2020). La ausencia de GB en células podría ocasionar daño a la membrana celular, degradación de proteínas, daño en el ADN y pérdida de capacidad fotosintética (Giri, 2011, Kumar *et al.*, 2017; Ilyas *et al.*, 2020).

7.6 Índice estomático y porcentaje de estomas abiertos

El estrés osmótico inducido por el PEG tuvo efecto en la reducción del IE y porcentaje de estomas abiertos en *V. planifolia*. Nuestro estudio muestra una reducción del IE y el aumento del porcentaje de estomas abiertos al incrementar la concentración de PEG. Paletti *et al.* (2019) en *Cattleya* sp. Lindl. *in vitro* reportan una disminución en el IE con 25 % PEG 6000. Chandran y Puthur (2009) en somaclones *ex vitro* de *V. planifolia* reportan un reducido IE (1.65) a estrés hídrico generado por déficit hídrico (-0.9 MPa). De acuerdo a Pirasteh-Anosheh *et al.* (2016) la variación del IE bajo estrés hídrico es diferente para cada especie. En *V. planifolia* bajo condiciones normales tiene un IE de 2.81 ± 0.27 (Chandran y Puthur, 2009). Por otro lado, el de cierre de estomas como resultado de la utilización de PEG para la evaluación del estrés hídrico *in vitro* ha sido reportado. Aliniaiefard *et al.* (2020) en nogal persa (*Juglans regia* L.) observaron una reducción en la apertura de estomas de 43 y 58 % a 3 y 5 % PEG 6000 respecto al control. La funcionalidad estomática, mediante la apertura y cierre de estomas, es un mecanismo que regula la transpiración y mantiene el balance hídrico ante el estrés osmótico (Farooq *et al.*, 2009). Al respecto, De Souza *et al.* (2013) mencionan que una adecuada funcionalidad estomática regula el balance hídrico en plantas. El cierre de estomas y bajo IE bajo generan una baja tasa de transpiración para evitar la deshidratación por pérdida de agua.

El estrés hídrico reduce la disponibilidad de agua en el citoplasma de las células afectando su homeostasis. La falta de agua en células ocasiona estrés osmótico y oxidativo, ocasionando afectaciones en procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares (Vinocur y Altman, 2005). Diferentes escenarios de cambio climático pronostican sequías prolongadas, esto sugiere estudiar diferentes mecanismos de tolerancia en respuesta ante el déficit hídrico para realizar estrategias de mejoramiento genético en cultivos de importancia agroalimentaria.

8 CONCLUSIONES

- Al incrementar las concentraciones de PEG se observó una reducción en el crecimiento *in vitro* de *V. planifolia*.
- El incremento en las concentraciones de PEG disminuyó la acumulación de Chl y PS; mientras que, la acumulación de Pro y GB aumentó.
- El IE y porcentaje de estomas abiertos se redujo al aumentar las concentraciones de PEG.
- En nuestro estudio, el estrés osmótico inducido por PEG bajo condiciones *in vitro* tuvo efectos sobre el crecimiento, fisiología y determinaciones bioquímicas evaluadas en *V. planifolia*. La determinación de osmolitos compatibles Pro y GB pueden ser utilizadas como marcadores bioquímicos en futuros programas mejoramiento genético para la selección temprana de genotipos tolerantes a estrés hídrico.

9 REFERENCIAS

- Abdulmalik, M. M., Usman, I. S., Usman, A., Mohammed, M. S. and Sani, A. L. 2018. *In vitro* screening of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) varieties for drought tolerance using polyethylene glycol (PEG 6000). FUDMA J. Sci. 2(2): 251-255.
- Ahanger, M. A., Gul, F., Ahmad, P. and A. Akram, N. 2018. Environmental stresses and metabolomics. Deciphering the role of stress responsive metabolites. *In*: Ahmad, P., Ahanger, M. A., Singh, V. P., Tripathi, D. K., Alam, P. and Alyemeni, M. N. (eds). Plant metabolites and regulation under environmental stress. Elsevier. London, Great Britain. pp: 53-67.
- Ahmad, R., Lim, C. J. and Kwon, S. Y. 2013. Glycine betaine: a versatile compound with great potential for gene pyramiding to improve crop plant performance against environmental stresses. Plant Biotechnol. (1): 49-57.
- Aliniaiefard, S., Asayesh, Z. M., Driver, J. and Vahdati, K. 2020. Stomatal features and desiccation responses of Persian walnut leaf as caused by *in vitro* stimuli aimed at stomatal closure. Trees. 34: 1219-1232.
- Arya, S. S., Rookes, J. E., Cahill, D. M. and Lenka, S. K. 2021. Vanillin: a review on the therapeutic prospects of a popular flavouring molecule. Adv. Tradit. Med. 1-17.
- Ashraf, M. and Harris, P. J. 2013. Photosynthesis under stressful environments: an overview. Photosynthetica. 51(2): 163-190.
- Atkinson, N. J. and Urwin, P. E. 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. J. Exp. Bot. 63(10): 3523-3543.
- Azofeifa-Bolaños, J. B., Paniagua-Vásquez, A. y García-García, J. A. 2014. Importancia y desafíos de la conservación de *Vanilla* spp. (orquidaceae) en Costa Rica. Agron. Mesoam. 25: 189-202.
- Barbero, A. P. P., Barros, F. D., Silva, E. A. D. e Suzuki, R. M. 2011. Influência do déficit hídrico na germinação de sementes e no desenvolvimento inicial de três espécies de Pleurothallidinae (Orchidaceae). Braz. J. Bot. 34(4): 593-601.

- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*. 39(1): 205-207.
- Batista, P. D. D. R. 2016. Algunas consideraciones sobre el comportamiento de la sequía agrícola en la agricultura de Cuba y el uso de imágenes por satélites en su evaluación. *Cult. Trop*. 37(3): 22-41.
- Battaglia M., Olvera-Carrillo Y., Garcarrubio A., Campos F. and Covarrubias A. A. 2008. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol*. 148: 6-24.
- Beale, S. I. 1999. Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynt. Res*. 60(1): 43-73.
- Bello-Bello, J. J., García-García, G. G. e Iglesias-Andreu, L. 2015. Conservación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) bajo condiciones de lento crecimiento *in vitro*. *Rev. Fitotec. Mex*. 38(2): 165-171.
- Borbolla-Pérez, V., Iglesias-Andreu, L. G., Escalante-Manzano, E. A., Martínez-Castillo, J., Ortiz-García, M. M. and Octavio-Aguilar, P. 2016. Molecular and microclimatic characterization of two plantations of *Vanilla planifolia* (Jacks. ex Andrews) with divergent backgrounds of premature fruit abortion. *Sci. Hortic*. 212: 240-250.
- Borbolla-Pérez, V., Iglesias-Andreu, L. G., Luna-Rodríguez, M. and Octavio-Aguilar, P. 2017. Perceptions regarding the challenges and constraints faced by smallholder farmers of vanilla in Mexico. *Environ. Dev. Sustain*. 19: 2421-2441.
- Bory, S., Grisoni, M., Duval, M. F. and Besse, P. 2008. Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genet. Resour. Crop Ev*. 55(4): 551-571.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72(1-2): 248-254.
- Cameron, K. M. 2009. On the value of nuclear and mitochondrial gene sequences for reconstructing the phylogeny of vanilloid orchids (Vanilloideae, Orchidaceae). *Ann. Bot*. 104: 377–385.

- Cameron, K. M. 2019. *Vanilla* phylogeny and classification. *In*: Havkin-Frenkel, D. and Belanger, F. C. (eds). Handbook of vanilla science and technology. Rutgers University. New Jersey, USA. pp: 377-381.
- Cardozo, M. C. P. y Quiriban, A. E. 2018. Las proteínas en la tolerancia al estrés hídrico en plantas. *Semiárida*. 24(1): 55-67.
- Castro-Bobadilla, G., Martínez, A. J., Martínez, M. L. y García-Franco, J. G. 2011. Aplicación de riego localizado para aumentar la retención de frutos de *Vanilla planifolia* en el Totonacapan, Veracruz, México. *Agrociencia*. 45(3): 281–291.
- Chandran, S. and Puthur, J. T. 2009. Assorted response of mutated variants of *Vanilla planifolia* Andr. towards drought. *Acta Physiol. Plant*. 31(5): 1023-1029.
- Chen, T. H. and Murata, N. 2011. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. *Plant Cell Environ*. 34(1): 1-20.
- Chiappetta, A., Muto, A., Bruno, L., Woloszynska, M., Van Lijsebettens, M. and Bitonti, M. B. A. 2015. Dehydrin gene isolated from feral olive enhances drought tolerance in *Arabidopsis* transgenic plants. *Front. Plant Sci*. 6: 1-15.
- CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). 2020. Monitor de sequía en México. Consultado el 20 de enero del 2020. Disponible en: <https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/monitor-de-sequia/monitor-de-sequia-en-mexico>
- Darvishani, S. N. H., Chamani, E., Omran, V. O. G., Esmailpour, B. and Yaghoubian, Y. 2020. *In-vitro* physiochemical responses of *Viola odorata* plant to combined salt and drought stress. *Acta Sci. Pol. Hortoru*. 19(4): 53-62.
- Datir, S. S. and Inamdar, A. 2019. Biochemical Responses of Wheat Cultivars to PEG-Induced Drought Stress. *Russ. Agr. Sci*. 45(1): 5-12.
- De Araujo Silva, M. M., Willadino, L., dos Santos, D. Y. A. C., Oliveira, A. F. M. and Camara, T. R. 2016. Response of *Ricinus communis* L. to *in vitro* water stress induced by polyethylene glycol. *Plant Growth Regul*. 78(2): 195-204.

- De Carvalho, K., de Campos, M. K. F., Domingues, D. S., Pereira, L. F. P. and Vieira, L. G. E. 2013. The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrumelo. *Mol. Biol. Rep.* 40(4): 3269-3279.
- De Souza, T. C., de Castro, E. M., Magalhães, P. C., Lino, L. D. O., Alves, E. T. and de Albuquerque, P. E. P. 2013. Morphophysiology, morphoanatomy, and grain yield under field conditions for two maize hybrids with contrasting response to drought stress. *Acta Physiol. Plant.* 35(11): 3201-3211.
- De Tafur, M. S. M., Díaz, R. A. B., Davila, M. A. G. y García, D. B. 2014. Respuesta fotosintética de *Eucalyptus grandis* W. Hill a la disponibilidad de agua en el suelo ya la intensidad de luz. *Acta Agron.* 63(4): 311-317.
- El-Mahdy, M. T., Abdel-Wahab, D. A. and Youssef, M. 2021. *In vitro* morphophysiological performance and DNA stability of banana under cadmium and drought stresses. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 1-10.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. B. S. M. A. and Basra, S. M. A. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *In: Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, P., Véronique, S. and Alberola, C. (eds). Sustainable agriculture.* Springer. Dordrecht, Netherlands. pp. 153-188.
- Forlani, G., Trovato, M., Funck, D. and Signorelli, S. 2019. Regulation of proline accumulation and its molecular and physiological functions in stress defence. *In: Hossain, M. A., Kumar, V., Burritt, D., Fujita, M., Mäkelä, P. (eds). Osmoprotectant-mediated abiotic stress tolerance in plants, 1st ed.;* Springer International Publishing. Cham, Switzerland. Volume 1, pp. 73-97.
- Fu, L., Ding, Z., Han, B., Hu, W., Li, Y. and Zhang, J. 2016. Physiological investigation and transcriptome analysis of polyethylene glycol (PEG)-induced dehydration stress in cassava. *Int. J. Mol. Sci.* 17(3): 283.
- Gamboa-Gaitán, M. Á. 2014. Colombian Vanilla and its microbiota. II. Diversity, culture and endophytic microorganisms. *Univ. Sci.* 19(3): 287-300.

- Gao, H., Xu, D., Zhang, H., Cheng, X. and Yang, Q. 2020. Effects of culture medium composition and PEG on hyperhydricity in *Dendrobium officinale*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 1-7.
- Giri, J. 2011. Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. *Signal. Behav.* 6(11): 1746-1751.
- Grieve, C. M. and Grattan, S. R. 1983. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant Soil.* 70(2): 303-307.
- Gutiérrez, A., Santacruz, F., Cabrera, J. L. y Rodríguez, B. 2003. Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. *e-Gnosis.* (1): 1-19.
- Hajhashemi, S. and Ehsanpour, A. A. 2014. Antioxidant response of *Stevia rebaudiana* B. to polyethylene glycol and paclobutrazol treatments under *in vitro* culture. *Appl. Biochem. Biotec.* 172(8): 4038-4052.
- Harborne, J. B. 1973. Nitrogen Compounds. *In: Harborne, J. B. (ed). Phytochemical Methods.* Springer International Publishing. Cham, Switzerland. Volume 1, pp: 166-211.
- Harris, J. M. 2013. Poly(Ethylene Glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications. Springer Science & Business Media. Berlin, Germany. p. 385.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J. and Ahmad, A. 2012. Role of proline under changing environments: a review. *Signal. Behav.* 7(11): 1456-1466.
- Hernández-Hernández J. 2011. Vanilla Diseases. *In: Havkin-Frenkel, D. and Belange F. C. (eds). Handbook of Vanilla science and technology.* Wiley-Blackwell Publishing. London, Great Britain. pp. 27–39.
- Hernández-Ruíz, J., Herrera-Cabrera, B. E., Delgado-Alvarado, A., Salazar-Rojas, V. M., Bustamante-González, Á., Campos-Contreras, J. E. y Ramírez-Juárez, J. 2016. Distribución potencial y características geográficas de poblaciones silvestres de *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) en Oaxaca, México. *Rev. Biol. Trop.* 64(1): 235-246.

- Hodson, D. P. and White, J. W. 2009. Climate Change: What Future for Wheat? *In*: Dixon, J., Braun, H. J., Kosina, P., and Crouch, J. H. (eds). Wheat facts and futures. CIMMYT. Mexico City, México. pp: 51-61.
- Hu, S., Ding, Y. and Zhu, C. 2020. Sensitivity and responses of chloroplasts to heat stress in plants. *Front. Plant Sci.* 11: 1-11.
- Hu, Y., Resende Jr., M. F. R., Bombarely, A., Brym, M., Bassil, E. and Chambers, A. H. 2019. Genomics-based diversity analysis of *Vanilla* species using a *Vanilla planifolia* draft genome and genotyping-by-sequencing. *Sci. Rep.* 9: 1-16.
- Hussain, H. A., Hussain, S., Khaliq, A., Ashraf, U., Anjum, S. A., Men, S. and Wang, L. 2018. Chilling and drought stresses in crop plants: implications, cross talk, and potential management opportunities. *Front. Plant Sci.* 9: 1-21.
- Hussain, S. S., Iqbal, M. T., Arif, M. A. and Amjad, M. 2011. Beyond osmolytes and transcription factors: drought tolerance in plants via protective proteins and aquaporins. *Biol. Plant.* 55(3): 401-413.
- Ilyas, M., Nisar, M., Khan, N., Hazrat, A., Khan, A. H., Hayat, K., Fahad, S., Khan, A. and Ullah, A. 2020. Drought tolerance strategies in plants: A mechanistic approach. *J. Plant Growth Regul.* 1-19.
- INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias). 2014. Producción de vainilla en tres sistemas de producción en la sierra huasteca potosina. Centro de Investigación Regional Noreste, Campo Experimental San Luis. San Luis Potosí, México.
- Jácome-Blásquez, F., Morales-Ramos, V., Martínez-Hernández, M. D. J., Sanchez-Viveros, G. and Bello-Bello, J. J. 2016. Response to peg-induced hydric stress on *in vitro* germination of *Prosthechea vitellina* (Lindl.) W. E. Higgins (Orchidaceae). *Propag. Orn. Plants.* 16(3): 73-78.
- Kacem, N. S., Delporte, F., Muhovski, Y., Djekoun, A. and Watillon, B. 2017. *In vitro* screening of durum wheat against waterstress mediated through polyethylene glycol. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 15: 239-247.

- Kaur, G. and Asthir, B. 2015. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biol. Plant.* 59(4): 609-619.
- Kourí, E. 2004. A pueblo divided: Business, property, and community in Papantla, Mexico. Stanford university press. California, USA. p: 389.
- Kumar, V., Shriram, V., Hoque, T. S., Hasan, M. M., Burritt, D. J. and Hossain, M. A. 2017. Glycinebetaine-mediated abiotic oxidative-stress tolerance in plants: physiological and biochemical mechanisms. *In: Sarwat, M., Ahman, A., Abdin, M. Z., Ibrahim, M. M. (eds). Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective, 1st ed. Springer International Publishing. Cham, Switzerland. Volume 2. pp. 111-133.*
- Kunene, E. N., and Masarirambi, M. T. 2018. Role of biotechnology in the conservation of rare, threatened and endangered medicinal plant species in the Kingdom of Eswatini (Swaziland). *Adv. Med. Plant Res.* 6(3): 26-32.
- Lapeyre-Montes, F., Conejero, G., Verdeil, J. L. and Odoux, E. Anatomy and biochemistry of vanilla bean development (*Vanilla planifolia* G. Jackson). *In: Odoux, E. and Grisoni, M. (eds). Medicinal and aromatic plants - Industrial profiles. Vanilla. CRC press. Florida, USA. pp: 149-172.*
- Lepers-Andrzejewski, S., Brunschwig, C., Collard, F. X. and Dron, M. 2010. Morphological, chemical, sensory and genetic specificities of Tahitian vanilla. *In: Odoux, E. and Grisoni, M. Medicinal and aromatic plants- Industrial profiles. Vanilla. (eds). CRC press. Florida, USA. pp: 205-228.*
- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stress, volume 1: Chilling, freezing, and high temperature stresses. Academic press. New York, USA. p: 497.
- Li, D., Li, C., Sun, H., Wang, W., Liu, L. and Zhang, Y. 2010. Effects of drought on soluble protein content and protective enzyme system in cotton leaves. *Front. Agr. China.* 4(1): 56-62.

- Li, J., Demesyieux, L., Brym, M. and Chambers, A. H. 2020. Development of species-specific molecular markers in *Vanilla* for seedling selection of hybrids. *Mol. Biol. Rep.* 47(3): 1905-1920.
- Li, X., Tang, Q., Tang, H. and Chen, W. 2020. Identifying antioxidant proteins by combining multiple methods. *Front. Bioeng. Biotech.* 8: 1-7.
- Lobato-Sánchez, R. 2016. El monitor de la sequía en México. *Tecnología y ciencias del agua.* 7(5): 197-211.
- Lubinsky, P., Bory, S., Hernández, H. J., Seung-Chul, K. and Gómez-Pompa, A. 2008. Origins and dispersal of cultivated vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. [Orchidaceae]). *Econ. Bot.* 62: 127-138.
- Lubinsky, P., Van Dam, M. and Van Dam, A. 2006. Pollination of *Vanilla* and evolution in orchidaceae. *Lindleyana.* 75(12): 926-929.
- Macedo Reis, C. A. 2000. *Biologia reproductiva e propagacao vegetativa de Vanilla chamissonis* Klotzsch: subsidios para manejo sustentado. Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz, Sao Paulo, Brasil.
- Martínez-Estrada, E., Caamal-Velázquez, J. H., Salinas-Ruíz, J., and Bello-Bello, J. J. 2017. Assessment of somaclonal variation during sugarcane micropropagation in temporary immersion bioreactors by intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 53(6): 553-560.
- Martínez-Estrada, E., Islas-Luna, B., Pérez-Sato, J.A.; Bello-Bello, J.J. 2019. Temporary immersion improves *in vitro* multiplication and acclimatization of *Anthurium andreanum* Lind. *Sci. Hortic.* 249: 185-191.
- Masoabi, M., Lloyd, J., Kossmann, J., and van der Vyver, C. 2018. Ethyl methanesulfonate mutagenesis and *in vitro* polyethylene glycol selection for drought tolerance in sugarcane (*Saccharum* spp.). *Sugar Tech.* 20(1): 50-59.

- Matysik, J., Alia, Bhalu, B., and Mohanty, P. 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Curr. Sci.* 525-532.
- McNeil, S. D., Rhodes, D., Russell, B. L., Nuccio, M. L., Shachar-Hill, Y., and Hanson, A. D. 2000. Metabolic modeling identifies key constraints on an engineered glycine betaine synthesis pathway in tobacco. *Plant Physiol.* 124(1): 153-162.
- Mengesha, B., Mekbib, F. and Abraha, E. 2016. *In vitro* Screening of Cactus [Opuntia ficus-indicia (L.) Mill] Genotypes for Drought Tolerance. *Am. J Plant Sci.* 7(13). 1741.
- Michel, B. E., and Kaufmann, M. R. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol.* 51(5): 914-916.
- Miglani, G. S., Kaur, R., Sharma, P. and Gupta, N. 2020. Leveraging photosynthetic efficiency toward improving crop yields. *J. Crop Improv.* 1-42.
- Mishra, A. K. and Singh, V. P. 2010. A review of drought concepts. *J. Hydrol.* 391(1-2). 202-216.
- Money, N. P. 1989. Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols: relationship between molecular weight and vapor pressure deficit. *Plant Physiol.* 91(2): 766-769.
- Monterroso-Rivas, A. I. y Gómez-Díaz, J. D. 2021. Impacto del cambio climático en la evapotranspiración potencial y periodo de crecimiento en México. *Terra Latinoam.* 39, 1-19.
- Morales, M. M. B. 2015. Conservación *in vitro*: una perspectiva para el manejo de los recursos fitogenéticos. *Rev. Invest. Agr. Amb.* 6(1): 67-82.
- Moreno, L. P. 2009. Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agron. Colomb.* 27(2): 179-191.
- Moreno-Galván, A. E., Cortés-Patiño, S., Romero-Perdomo, F., Uribe-Vélez, D., Bashan, Y. and Bonilla, R. R. 2020. Proline accumulation and glutathione reductase

activity induced by drought-tolerant rhizobacteria as potential mechanisms to alleviate drought stress in Guinea grass. *Appl. Soil Ecol.* 147. pp: 103367.

Muñíz, R. 2018. La propagación *in vitro* de plantas con Sistemas de Inmersión Temporal. Una Tecnología Apropriada para la agricultura sustentable. *Tekhné.* 21(3): 43-50.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15(3): 473-497.

Naheed, R., Arfan, M., Farhat, F., Ijaz, S., and Khalid, H. 2020. Acclimatization of drought tolerance with Somaclonal variants of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Adv. Life Sc.* 8(1): 57-62.

Niechayev, N. A., Pereira, P. N. and Cushman, J. C. 2019. Understanding trait diversity associated with crassulacean acid metabolism (CAM). *Curr. Op. Plant Biol.* 49: 74-85.

Nikam, A. A., Devarumath, R. M., Ahuja, A., Babu, H., Shitole, M. G. and Suprasanna, P. 2015. Radiation-induced *in vitro* mutagenesis system for salt tolerance and other agronomic characters in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Crop J.* 3: 46-56.

Nogués, S., Allen, D. J. and Baker, N. R. 2006. Potential effects of UV-B on photosynthesis and photosynthetic productivity of higher plants. *In: Ghetti, F., Checcucci, G. and Bornman, J. F. (eds). Environmental UV radiation: Impact on ecosystems and human health and predictive models.* Springer. Dordrecht, Netherladns. pp: 137-146.

Paletti, T. S., Nurcahyani, E., Yulianty, Y. and Agustrina, R. 2019. Stomatal Index of *Cattleya* sp. Lindl., Planlet in Drought-Stress Conditions. *J. BEKH.* 6(1): 15-19.

Park, E. J., Jeknić, Z., Chen, T. H. and Murata, N. 2007. The *codA* transgene for glycinebetaine synthesis increases the size of flowers and fruits in tomato. *Plant Biotechnol. J.* 5(3): 422-430.

- Pei, L., Li, H., Zhou, Y., Li, W., Jiang, Y. and Li, H. 2020. Exogenous Glycinebetaine Application Contributes to Abiotic Stress Tolerance in Maize. *J. Plant Biol.* 1-13.
- Peleg, Z., Apse, M. P. and Blumwald, E. 2011. Engineering salinity and water-stress tolerance in crop plants: getting closer to the field. *Adv. Bot. Res.* 57: 405-443.
- Penna, S., Vitthal, S. B., and Yadav, P. V. 2012. *In vitro* mutagenesis and selection in plant tissue cultures and their prospects for crop improvement. *Bioremed. Biodiv. Bioavailab.* 6: 6-14.
- Perez-Molphe, E. M. B., Ramírez, M. R., Nuñez, P. H. G. y Ochoa, A. N. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. p: 141.
- Pirasteh-Anosheh, H., Saed-Moucheshi, A., Pakniyat, H. and Pessaraki, M. 2016. Stomatal responses to drought stress. *Water Stress Crop Plants.* 1: 24-40.
- Piowarczyk, B., Kamińska, I. and Rybiński, W. 2014. Influence of PEG generated osmotic stress on shoot regeneration and some biochemical parameters in *Lathyrus* culture. *Czech J. Genet. Plant.* 50(2): 77-83.
- Pradhan, N., Singh, P., Dwivedi, P. and Pandey, D.K. 2020. Evaluation of sodium nitroprusside and putrescine on polyethylene glycol induced drought stress in *Stevia rebaudiana* Bertoni under *in vitro* condition. *Ind. Crop. Prod.* 154: 112754.
- Qayyum, A., Razzaq, A., Bibi, Y., Khan, S. U., Abbasi, K. S., Sher, A., Mehmood, A., Ahmed, W., Mahmood, I., Manaf, A., Khan, A., Farid, A. and Jenks, M.A. 2018. Water stress effects on biochemical traits and antioxidant activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) under *In vitro* conditions. *Acta Agr. Scand. B-S. P.* 68(4): 283-290.
- Queiros, F., Fidalgo, F., Santos, I., and Salema, R. 2007. *In vitro* selection of salt tolerant cell lines in *Solanum tuberosum* L. *Biol. Plant.* 51(4): 728-734.

- Rai, M. K., Kalia, R. K., Singh, R., Gangola, M. P. and Dhawan, A. K. 2011. Developing stress tolerant plants through in vitro selection—an overview of the recent progress. *Environ. Exp. Bot.* 71(1): 89-98.
- Ramírez, H., Guevara, M. E. y Escobar Pérez, R. H. 2012. Cultivo de tejidos vegetales: conceptos y prácticas. Universidad Nacional de Colombia. p. 160.
- Ramírez-Mosqueda, M. A., Cruz-Cruz, C. A., Atlahua-Temoxtle, J., and Bello-Bello, J. J. 2019. *In vitro* conservation and regeneration of *Laelia anceps* Lindl. *S. Afr. J. Bot.* 121: 219-223.
- Ramírez-Mosqueda, M. A., Iglesias-Andreu, L. G., Luna-Rodríguez, M. and Castro-Luna, A. A. 2015. *In vitro* phytotoxicity of culture filtrates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* in *Vanilla planifolia* Jacks. *Sci. Hortic.* 197: 573-578.
- Rao, K., Raghavendra, A. and Reddy, K. 2006. Physiology and molecular biology of stress tolerance. Springer. Dordrecht, Great Britain. pp. 1-14.
- Razavizadeh, R., Farahzadianpoor, F., Adabavazeh, F. and Komatsu, S. 2019. Physiological and morphological analyses of *Thymus vulgaris* L. *in vitro* cultures under polyethylene glycol (PEG)-induced osmotic stress. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 55(3): 342-357.
- Retheesh, S. T., & Bhat, A. I. 2010. Simultaneous elimination of Cucumber mosaic virus and *Cymbidium mosaic virus* infecting *Vanilla planifolia* through meristem culture. *Crop Prot.* 29(10): 1214-1217.
- Salehi-Lisar, S. Y. and Bakhshayeshan-Agdam, H. 2016. Drought stress in plants: causes, consequences, and tolerance. In: Hossain M., Wani S., Bhattacharjee S., Burritt D., Tran LS. (eds). *Drought Stress Tolerance in Plants*, Vol 1. Springer, Cham, Switzerland. pp. 1-16.
- Sasikumar, B. 2010. Vanilla breeding - A review. *Agric. Reviews.* 31(2): 139-144.

- Seleiman, M. F., Al-Suhaibani, N., Ali, N., Akmal, M., Alotaibi, M., Refay, Y., Dindaroglu, T., Abdul-Wajid, H. H., and Battaglia, M. L. 2021. Drought Stress Impacts on Plants and Different Approaches to Alleviate Its Adverse Effects. *Plants*. 10(2): 259.
- Sen, A. and Alikamanoglu, S. 2012. Analysis of drought-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) mutants induced with gamma radiation using SDS-PAGE and ISSR markers. *Mutat. Res. – Fund. Mol. M.* 738: 38-44.
- Sewelam, N., Kazan, K. and Schenk, P. M. 2016. Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road. *Front. Plant Sci.* 7: 187.
- Soto-Arenas, M. A. and Cribb, P. 2010. A new infrageneric classification and synopsis of the genus *Vanilla* plum. ex mill. (Orchidaceae: Vanillinae). *Lankesteriana*. 9: 355-398.
- Soto-Arenas, M. A. and Dressler, R. L. 2010. A revision of the Mexican and Central American species of *Vanilla* plumier ex miller with a characterization of their ITS region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana*. 9: 285-354.
- Suis, M. A. F., Ping, K. S., Keong, C. C. and Subramaniam, S. 2015. Biochemical and physiological responses to polyethylene glycol (PEG) treatment in protocorm-like bodies (PLBs) of Aranda Broga Blue Bell. *Emir. J. Food Agr.* 776-783.
- Szepesi, Á., and Szöllősi, R. 2018. Mechanism of proline biosynthesis and role of proline metabolism enzymes under environmental stress in plants. *In: Ahmad, P., Ahanger, M. A., Singh, V. P., Tripathi, D. K., Alam, P. and Alyemeni, M. N. (eds). Plant metabolites and regulation under environmental stress. Elsevier. London, Great Britain. pp: 337-353.*
- Taiz, L., and Zeiger, E. 2010. Inorganic Carbon–Concentrating Mechanisms: Crassulacean Acid Metabolism (CAM). *In: Taiz, L., and Zeiger, E. (eds). Plant Physiology, Fifth Edition. Sinauer Associates Inc. Massachusetts, USA. pp: 221-224*
- Tan, B. C. and Chin, C. F. 2015. *Vanilla planifolia*: an economically important orchid and its propagation. *Minerva Biotechnol.* 27: 107-116.

- Tokarz, B., Wójtowicz, T., Makowski, W., Jędrzejczyk, R. J., and Tokarz, K. M. 2020. What is the Difference between the Response of Grass Pea (*Lathyrus sativus* L.) to Salinity and Drought Stress? - A Physiological Study. *Agronomy*. 10(6): 1-24.
- Velasco, I., Ochoa, L. y Gutiérrez, C. 2005. Sequía, un problema de perspectiva y gestión. *Región Soc.* 17(34): 35-71.
- Verbruggen, N. and Hermans, C. 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Aminoacids*. 35(4): 753-759.
- Villanueva-Viramontes, S., Hernández-Apolinar, M., Fernández-Concha, G. C., Dorantes-Euán, A., Dzib, G. R. and Castillo, J. M. 2017. Wild *Vanilla planifolia* and its relatives in the Mexican Yucatan peninsula: Systematic analyses with ISSR and ITS. *Bot. Sci.* 95(2): 169-187.
- Vinocur, B. and Altman, A. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotech.* 16(2): 123-132.
- Vuksanović, V., Kovačević, B., Orlović, S., Kebert, M., and Kovač, M. 2019. The influence of drought on growth and development of white poplar shoots *in vitro*. *Topola*. 203: 13-18.
- Wawrosch, C. 2010. *In vitro* propagation of medicinal plants for conservation and quality assurance. *Med. Plant Biotec.* 93-97.
- Witcombe, J. R., Hollington, P. A., Howarth, C. J., Reader, S. and Steele, K. A. 2008. Breeding for abiotic stresses for sustainable agriculture. *Philos. T. R. Soc. B.* 363(1492): 703-716.
- Yang, X., Liang, Z., Wen, X. and Lu, C. 2008, Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine leads to increased tolerance of photosynthesis to salt stress in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 66(1-2): 73.
- Zhang, X., Zhang, G., Li, P., Yang, Q., Chen, K., Zhao, L., Apaliya, M. T., Gu, X. and Zhang, H. 2017. Mechanisms of glycine betaine enhancing oxidative stress tolerance and biocontrol efficacy of *Pichia caribbica* against blue mold on apples. *Biol. Control*. 108: 55-63.

- Zhang, Y. B., Yang, S. L., Dao, J. M., Deng, J., Shahzad, A. N., Fan, X., Li, R. D., Quan, Y. J., Hussain, S. A. B. and Zeng, Z. H. 2020. Drought-induced alterations in photosynthetic, ultrastructural and biochemical traits of contrasting sugarcane genotypes. *Plos One*. 15(7): 1-13.
- Zia, R., Nawaz, M. S., Siddique, M. J., Hakim, S. and Imran, A. 2020. Plant survival under drought stress: Implications, adaptive responses, and integrated rhizosphere management strategy for stress mitigation. *Microbiol. Res.* 126626.
- Zivcak, M., Brestic, M. and Sytar O. 2016. Osmotic Adjustment and Plant Adaptation to Drought Stress. In: Hossain M., Wani S., Bhattacharjee S., Burritt D., Tran LS. (eds). *Drought Stress Tolerance in Plants*, Vol 1. Springer, Cham, Switzerland. Volume 1, pp. 105-143.