

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Dehidrinas en plantas de *Pinus pinceana* Gordon de dos procedencias.

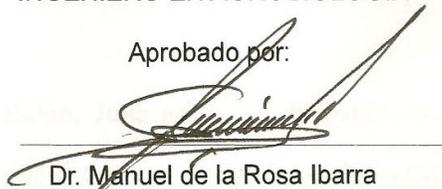
Por:

JOSÉ MARCIANO DE LA CRUZ OLIVARES

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el Título de:

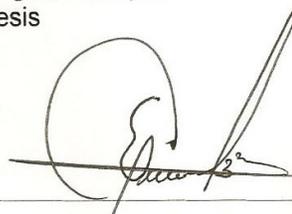
INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Aprobado por:


Dr. Manuel de la Rosa Ibarra
Asesor principal


Dr. Edmundo Mario Rodríguez Campos
Director de Tesis


Dr. Eladio Heriberto Cornejo Oviedo
Asesor


Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo
Coordinador de la División de Agronomía

División de Agronomía

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Mayo del 2011.

DEDICATORIA

A mi madre **Graciela Olivares Sánchez**, por traerme al mundo y brindarme su inagotable e inigualable amor y por su apoyo moral, además de darme sus peculiares consejos con un toque de sarcasmo. Le agradezco infinitamente por enseñarme a ser un persona que nunca se da por vencido.

A mi padre **Eusebio de la Cruz Tejeda**, que me brindo el apoyo económico, y me enseñó que las cosas materiales son pasajeras y las cosas del corazón perduran para siempre. Le agradezco mucho por sus consejos y por ser más que un padre, por ser el amigo ideal.

A mis hermanos **Ana Belén, Julia Patricia y Eusebio**, por darme apoyo moral, por confiar en mi y por todos los tantos momentos de gratos. A mis sobrinos **Uriel y Danna** que colmaron mi vida de ternura.

Siempre los tengo en mi corazón por que ustedes son mi motivación.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Edmundo Mario Rodríguez Campos por su apoyo económico para la realización de esta investigación, por compartir sus conocimientos conmigo y por sus valiosos comentarios para desarrollar y terminar este trabajo.

Al Dr. Manuel de la Rosa Ibarra por su asesoría y consejos dados durante el proyecto, así como su confianza y amistad dada.

Al Dr. Eladio Cornejo Oviedo por la asesoría y sus comentarios.

A mis compañeros y colegas Ing. Fernando Ínes Juárez, M.C. Camerino Rojas Montes, Ing. Ricardo Sánchez Arrieta, Martin Alonso Reyes, por compartir conmigo parte de su tiempo y por darme consejos.

A mis compañeros de laboratorio Dr. Erika Vázquez, Aquiles López, M.C. Marisol Cruz y M.C. Alejandro Méndez, sus comentarios además de hacer un entorno de trabajo dinámico y divertido.

A mi novia Alma Vázquez Baranda por su espacio y tiempo dedicado, por darle un giro a mi vida y por compartir tantos momentos lindos e inolvidables para el corazón.

A mis amigos y roomates Esteban Olivares Duran, Daniel Soto Muñoz, Dalia Lopez Lopez, Mariela Itandehui González Molina y Guiyer Vázquez González por su momentos de convivencia, por hacerme pasar tantos momentos agradables y especialmente por enseñarme a visualizar lo cómico de la vida cotidiana.

A todas aquellas personas que de alguna forma permitieron mi desarrollo académico durante la estancia en la UAAAN.

Índice de Contenido

ÍNDICE DE CUADROS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
RESUMEN	IV
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. HIPÓTESIS	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	4
El estrés en plantas	4
Respuesta fisiológica de los pinos a la sequía	5
Las dehidrinas (DNHs) y su expresión en pinos	6
Distribución de las poblaciones de <i>P. pinceana</i>	8
Estudios en <i>P. pinceana</i>	10
V. MATERIALES Y MÉTODOS	12
Material biológico	12
Ubicación geográfica de las poblaciones de <i>P. pinceana</i> estudiadas	12
Características de los lugares de procedencia de <i>P. pinceana</i>	12
Ensayo de sequía	13
Diseño experimental	14
Muestreo y parámetros fisiológicos de estrés	15
Análisis bioquímico	17
Extracción de proteína	17
Cuantificación de proteínas totales	18
Preparación de proteína	20
Separación de proteínas totales por Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)	20

Análisis Western Blot para detectar dehidrinas	22
VI. RESULTADOS	25
Dinámica de la pérdida de agua en el sustrato	25
Potencial hídrico antes del amanecer (Ψ_{AA})	25
Potencial hídrico después del mediodía (Ψ_{APm})	26
Contenido relativo de agua en las hojas (CRA)	27
Análisis bioquímico	28
Dehidrinas en embrión de <i>P. pinceana</i>	29
Dehidrinas en tejido de tallo y hoja de <i>P. pinceana</i>	30
VII. DISCUSIÓN	34
VIII. CONCLUSIÓN	38
IX. BIBLIOGRAFÍA	39
ANEXOS	45

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Ubicación geográfica de poblaciones de <i>Pinus pinceana</i> Gordon en los estados de Coahuila y Maguey Verde.	12
Cuadro2. Diluciones para realizar la cuantificación de proteína en los extractos de tallo y hoja.	19

Índice de Figuras

Figura 1. Ubicación de 14 poblaciones naturales de <i>P. pinceana</i>	9
Figura 2. Esquema del orden y distribución de las plantas de <i>P. pinceana</i> para el ensayo de sequía.	15
Figura 3. Dinámica de la pérdida de agua en el sustrato con plantas de <i>P. pinceana</i>	16
Figura 4. Potencial hídrico antes del amanecer (Ψ_{aa}) de plantas de <i>P. pinceana</i> de las procedencias El Cinco y Maguey Verde, en condiciones de riego y bajo estrés hídrico	26
Figura 5. Potencial hídrico después del medio día (Ψ_{apm}) de plantas de <i>Pinus pinceana</i> Gordon de las procedencias El Cinco y Maguey Verde en condiciones de riego y estrés hídrico	27
Figura 6. Contenido Relativo de Agua en las acículas de plantas de <i>P. pinceana</i> de las procedencias El Cinco y Maguey Verde en condiciones de riego y bajo estrés hídrico	28
Figura 7. SDS-PAGE teñido con azul de Coomasie. Patrón de bandas de proteínas totales de <i>P. pinceana</i> de hoja de la procedencia Maguey Verde.	29
Figura 8. Inmunotransferencia de dehidrinasa de hoja de <i>P. pinceana</i> de plantas tratadas y plantas control de la procedencia Maguey Verde.	30
Figura 9. Inmunotransferencia de dehidrinasa de tallo de plantas tratadas y plantas control de <i>P. pinceana</i> de las procedencias el cinco y Maguey Verde.	31

Figura 10. Inmunotransferencia de dehidrinas de tallo de plantas control de <i>P. pinceana</i> de las procedencias El Cinco y Maguey Verde.	32
Figura 11. Inmunotransferencia de dehidrinas de tallo de <i>P. pinceana</i> de las procedencias El Cinco y Maguey Verde.	32
Figura 12. Inmunotransferencia de dehidrinas de hoja de plantas de <i>P. pinceana</i> bajo estrés hídrico de las procedencias El Cinco y Maguey Verde.	33
Figura 13. Inmunotransferencia de dehidrinas de hoja de plantas control de <i>P. pinceana</i> de las procedencias El Cinco y Maguey Verde.	33

Resumen

El objetivo de este estudio fue detectar dehidrinas en *P. pinceana* y su acumulación como respuesta a estrés hídrico en dos procedencias. La presente investigación se llevó a cabo en el invernadero del Departamento de Forestal y en el laboratorio de Agrobiotecnología del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Plantas de *P. pinceana* de la procedencia El Cinco de Mayo, Coahuila y Maguey Verde, Querétaro se sometieron a un ensayo de sequía en el que se establecieron cuatro tiempos de muestreo de acuerdo con el contenido porcentual de agua en el sustrato (82, 45, 25 y 6%). Para cuantificar el nivel de estrés hídrico impuesto se midió el potencial hídrico antes del amanecer (ψ_{aa}), el potencial hídrico después del medio día (ψ_{apm}) y el contenido relativo de agua en las acículas. El análisis bioquímico se hizo en el embrión de *P. pinceana*, así como en tallos y acículas de plantas testigo y bajo estrés hídrico de ambas procedencias. Las dehidrinas fueron detectadas mediante la técnica Western Blot utilizando el anticuerpo anti-dehidrina de conejo, un anticuerpo específico contra el segmento K característico de las dehidrinas. Los resultados de ψ_{aa} y ψ_{apm} mostraron diferencias significativas. Las plantas bajo estrés hídrico que tuvieron un contenido porcentual de agua en el suelo de 6% llegaron a tener un ψ_{aa} de -2 MPa. Los datos del contenido relativo de agua en las acículas no mostraron diferencias significativas entre las plantas tratadas y en las control. De acuerdo al análisis de inmunotransferencia en embrión de *P. pinceana* se detectaron cinco dehidrinas que van de un peso molecular de 17 a 60 Kda. En tallos bajo condiciones de estrés hídrico se detectaron 2 dehidrinas de 69 y 59 KDa, en plantas con riego también

se detectaron dehidrinas similares aunque muy tenues. En acículas de plantas bajo condiciones de estrés hídrico solo se detectó una dehidrina de 69 KDa, en plantas con riego se observó la misma dehidrina pero muy tenue.

Palabras clave: *Pinus pinceana*, Dehidrinas, LEA, Estrés hídrico.

I. INTRODUCCIÓN

El estrés se ha definido como una desviación significativa de las condiciones óptimas para la vida. Como respuesta a dicha desviación se inducen cambios en todos los niveles funcionales del organismo, pudiendo ser dichos cambios reversibles o permanentes. Si el estrés es demasiado intenso o si el periodo de acción es demasiado largo, entonces los daños latentes se transforman en daño irreversible que puede afectar a la planta en algunas partes o en su totalidad (Benavides, 2002).

Algunos de los estreses más sobresalientes impuestos por factores ambientales son temperaturas extremas, sequía y salinidad, que afectan significativamente la productividad de plantas cultivadas (Rodríguez *et al.*, 2005). En especies forestales se ve afectada la altura y el diámetro de los árboles, que son aspectos que juegan un papel importante en la producción e incremento de la supervivencia en campo (Martínez, 2004).

Uno de los estreses abióticos más importantes es el estrés hídrico. A medida que el contenido hídrico de la planta disminuye, las células se encogen y las paredes celulares se relajan. Esta reducción en el volumen celular da lugar a una menor presión de turgencia y a lo consiguiente concentración de los solutos en las células. También existe un aumento de la deposición de cera en la superficie de las hojas (Taiz y Zeiger, 2006).

Como respuesta bioquímica al estrés hídrico, las plantas inician una cascada de señales que activan factores de homeostasis. Por ejemplo, el estrés osmótico activa un conjunto de proteín-cinasas que inducen mecanismos de homeostasis

osmótica y/o respuesta a destoxificación (Rodríguez *et al.*, 2005). Otro ejemplo en algunas plantas es el aumento en el contenido de prolina en hojas, que juega un papel importante en los procesos de ajuste osmótico (Parra *et al.*, 1999; Rosales *et al.*, 2007).

Otro cambio bioquímico provocado por el estrés hídrico es una disminución de la síntesis total de proteínas y la inducción de la síntesis de algunas en particular. Un ejemplo son las dehidrininas, que son proteínas que se forman en respuesta a estreses ambientales como sequía, temperatura baja, salinidad y durante la maduración de semillas. La estructura particular de estas proteínas, su acumulación bajo condiciones de deshidratación y su localización subcelular son consistentes con un papel como estabilizador intracelular (Campbell y Close, 1997).

En el presente trabajo se realizó la detección de dehidrininas en *P. pinceana*, una especie que muestra una amplia diversidad genética con respecto a otras especies de pinos de distribución geográfica limitada. Esta característica favorece su capacidad de adaptación a gradientes ambientales adversos (Ramírez-Herrera, 2007). Este trabajo tiene la finalidad de aportar nuevos datos para entender los mecanismos de ajuste de estas coníferas a los diferentes ecosistemas en los que se distribuyen.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Detectar dehidrinas en *P. pinceana* y su acumulación como respuesta a estrés hídrico en plantas de dos procedencias.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar los cambios en el potencial hídrico en dos procedencias de *P. pinceana* sujetas a un ensayo de sequía.
- Detectar y caracterizar las dehidrinas de *P. pinceana* que se acumulan en la semilla.
- Detectar y comparar la acumulación de dehidrinas en acículas y tallos entre dos procedencias de *P. pinceana* como respuesta a estrés hídrico.

III. HIPÓTESIS

El estrés hídrico induce la acumulación de dehidrinas en acículas y tallos de *P. pinceana*.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

El estrés en plantas

Tanto en cultivo como en la naturaleza, las plantas están expuestas constantemente a estreses ambientales. El estrés se define normalmente como un factor externo que ejerce una influencia negativa sobre la planta. Los factores ambientales o abióticos generan estrés en la planta, aunque los factores bióticos, como malas hierbas, patógenos e insectos depredadores también pueden generar estrés. En muchos casos, el estrés se mide con relación a la supervivencia de la planta, el rendimiento del cultivo, el crecimiento (acumulación de biomasa) o los procesos de asimilación primaria (incorporación de CO₂ y minerales) (Taiz y Zeiger, 2006).

Los factores ambientales tales como la sequía, salinidad y temperaturas extremas afectan significativamente la productividad de los cultivos y debido a su ocurrencia generalizada causan pérdidas económicas en la agricultura (Rodríguez *et al.*, 2005; Beck *et al.*, 2007). La sequía afecta de manera que cuando el contenido de agua en la planta disminuye, las células pierden turgencia, lo que provoca la concentración de solutos en las células, esto afecta también a las actividades que dependen de la turgencia, como la expansión foliar y la elongación radicular. Otro mecanismo, llamado cierre hidroactivo, tiene lugar cuando la hoja o las raíces están deshidratadas (Taiz y Zeiger, 2006).

En general la sequía es uno de los factores que más afecta el desarrollo de las plantas y también la productividad de árboles forestales.

Respuesta fisiológica de los pinos a la sequía

Los pinos se caracterizan en general por ser plantas longevas, esto involucra diferentes procesos en su ciclo de vida. Uno de estos procesos es la capacidad de sobrevivir bajo condiciones ambientales muchas veces muy adversas, de las cuales destaca la sequía, el estrés más común que causa mortalidad y severas pérdidas en la producción anual de plantaciones forestales comerciales (González-Martínez *et al.*, 2006).

Martínez-Trinidad *et al.*, (2002) en un ensayo de sequía con un tiempo de dos meses en *Pinus leiophylla*, encontraron que el estrés hídrico, redujo la acumulación de biomasa en un 80%, y también retrasó el desarrollo de hojas secundarias, además estos datos difieren según la procedencia.

Sin embargo existen especies de pino que muestran tolerancia a la sequía, como es el caso de la estudiada en el trabajo de Martínez (2004) que al suspender el riego a plántulas de *Pinus duranguensis* por 16 días, éstas alcanzaron un potencial hídrico antes del amanecer de -2.5 MPa, y el autor no encontró diferencias significativas entre las plantas control y las plantas sometidas a estrés hídrico en las variables morfológicas medidas (altura, diámetro basal).

Uno de los efectos relacionados con el estrés hídrico es la formación de solutos de bajo peso molecular, llamados osmolitos. Entre los solutos que se suelen acumular se incluye el aminoácido prolina, azúcar-alcoholes (como por ejemplo, el sorbitol y el manitol) y una amina cuaternaria, llamada glicina betaina. Estos solutos

aparecen en grandes cantidades (hasta un 20% del total de la masa seca) (Taiz y Zeiger, 2006; Caramelo y Lusem, 2009).

Desde un nivel bioquímico en las plantas ocurren cambios, como la disminución parcial o total de la síntesis de proteínas, pero una inducción de la síntesis de algunas proteínas específicas, como las dehidrinas (Close, 1996).

Las Dehidrinas (DHNs) y su expresión en pinos

Las dehidrinas pertenecen al grupo de proteínas llamadas LEA (Late Embryogenesis Abundant), las dehidrinas forman parte del grupo II de las LEA que a la vez conforman a las hidrofílicas. Estas proteínas se acumulan en la fase tardía de la embriogénesis (como su nombre lo indica), cuando la semilla pierde la mayor parte de su contenido de agua. También se acumulan en los tejidos vegetativos cuando la planta se somete a déficit hídrico, como sequía, salinidad o bajas temperaturas, por lo que se les asocia con un papel de protección o estabilizador de membranas y proteínas (Close, 1996; Campbell y Close, 1997; Close, 1997).

Estas proteínas son altamente hidrofílicas, poseen un elevado contenido de aminoácidos pequeños y polares, permanecen solubles a temperaturas de ebullición debido a que poseen poca o nula estructura secundaria. Sin embargo, presentan un dominio que puede adquirir conformación de α hélice anfipática que es rico en lisinas, conocido como el segmento K, característico de estas proteínas. Pueden poseer otros dominios como el segmento S rico en Serina y que puede estar fosforilado, y otro segmento consenso llamado segmento Y (Campbell y

Close, 1997).

El estudio de la expresión genética y la síntesis de dehidrinas es de gran utilidad para explicar los procesos de adaptación de las especies forestales a climas áridos y bajas temperaturas.

Se han detectado dehidrinas en algunas gimnospermas, por ejemplo Kontunen-Soppela *et al.* (2000) analizaron la desaclimatación a baja temperatura desde el punto de vista del metabolismo de proteínas en plántulas de *Pinus sylvestris* y encontraron una dehidrina de 60 KDa en acículas. La desaclimatación fue seguida por las variables fisiológicas: resistencia a congelación y el potencial osmótico. También encontraron que las dehidrinas van desapareciendo durante la desaclimatación más rápidamente en plantas fertilizadas que en las plantas control.

Kontunen-Soppela y Laine (2001) al hacer detección de dehidrinas mensualmente de arboles de Pino Scots (*Pinus sylvestris* L.) de aproximadamente 40 años en su estado natural, en acículas, yema y corteza viva encontraron una dehidrina de 60 KDa y en corteza además encontraron una dehidrina de 50 KDa.

Sin embargo, a diferencia de los amplios estudios que se han hecho sobre los mecanismos de adaptación de plantas que crecen en condiciones mesicas, *P. pinceana* es una especie de pino que sobrevive en zonas áridas y es interesante hacer estudios de los mecanismos relacionados con la capacidad de estos pinos a sobrevivir bajo condiciones de sequía, así como investigaciones más profundas como la detección de dehidrinas.

Distribución de las poblaciones de *P. pinceana*

P. pinceana es una especie que sobrevive en lugares muy adversos, crece en poblaciones dispersas y aisladas a lo largo de la Sierra Madre Oriental (figura 1) en los Estados de Hidalgo, Querétaro, San Luís Potosí, Zacatecas, Coahuila (Ledig *et al.*, 2001; Shaw, 1993), Durango (González, 2010) y Nuevo León (Favela *et al.*, 2009) entre los 19 y 25 grados de latitud norte, donde su hábitat se caracteriza por un clima extremo en términos de humedad y temperatura y donde la precipitación anual rara vez sobrepasa los 400 mm, se le encuentra también asociado con *Pinus cembroides*.

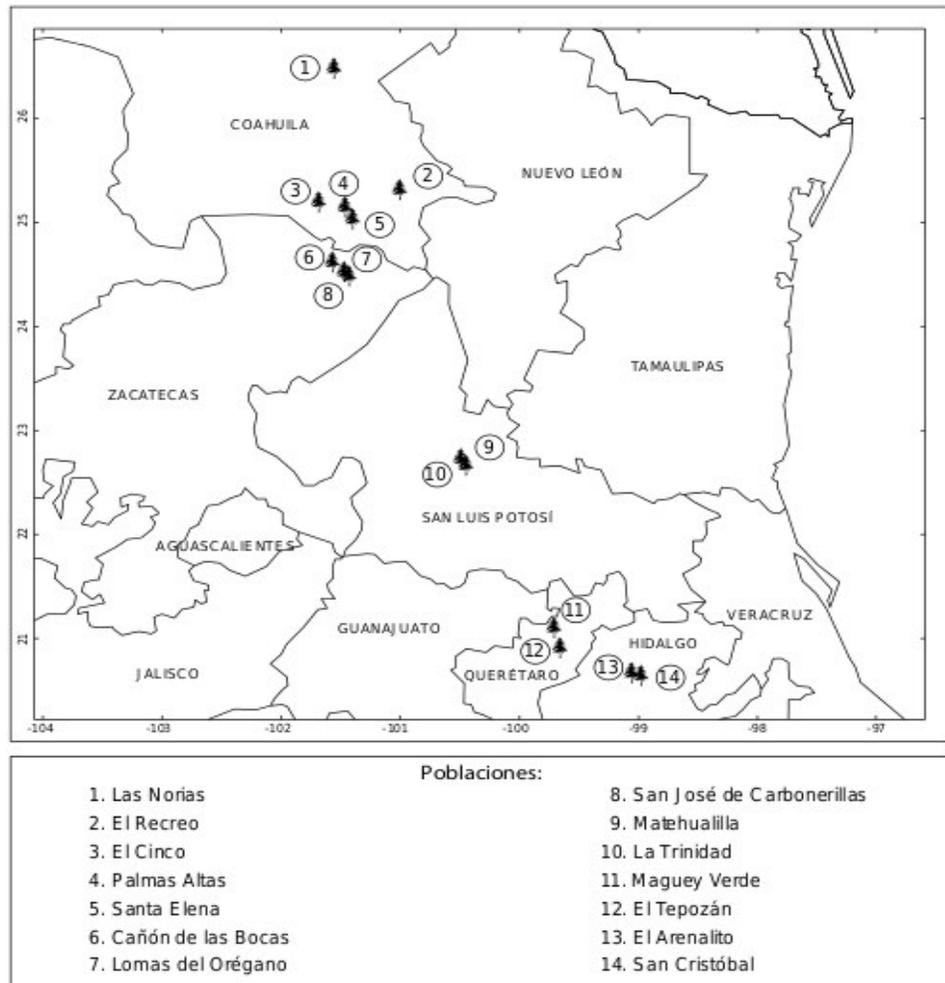


Figura 1. Ubicación de 14 poblaciones naturales de *P. pinceana* (Villarreal et al., 2009).

Las comunidades de *P. pinceana* muestran una combinación de especies propias de bosque de encinos con elementos de matorral, presentándose como formas de transición entre comunidades de vegetación xerófila y mesófila (Villarreal et al. 2009).

Estudios en *P. pinceana*

Ramírez-Herrera (2007) al hacer un ensayo de sequía con una duración de 104 días con plántulas de *P. pinceana* de 12 procedencias en la que midió cantidad de cera en acículas, encontró diferencias significativas entre procedencias, la procedencia Palmas Altas fue la que produjo más cera (16.6 mg g^{-1}). Concluyó que en *P. pinceana* hay un alto nivel de variación geográfica con respecto a la cantidad de cera, de tal manera que las poblaciones de la región norte tuvieron una cantidad más alta de cera que las poblaciones de la región centro y sur.

Martiñón (2009) al someter plántulas de *P. pinceana* de 25 meses de edad y de 6 procedencias, a un ciclo sequía de 160 días, encontró diferencias entre regiones. La tasa de crecimiento relativo más baja fue el de la región sur de la procedencia Ejido Núñez ($0.02 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ mes}^{-1}$). También hizo un análisis de la composición isotópica de carbono y encontró diferencias entre procedencias en el uso eficiente del agua.

Pérez (2006) al cuantificar el número de estomas en hojas cotiledonares y primarias de plántulas de *P. pinceana* de las procedencias Garambullo, municipio de Saltillo, Coahuila, Lomas del Orégano, municipio de Mazapil, Zacatecas y Palmas Altas municipio de Saltillo, Coahuila, el autor encontró que la procedencia de Palmas Altas presentó mayor número de estomas por milímetro cuadrado. Recomienda estudiar el ambiente de cada localidad para correlacionar las condiciones con la densidad de estomas.

Ramírez (2008) al hacer un ensayo de *P. pinceana* de tres procedencias: Los Lirios, Arteaga, Saltillo, Coahuila, Ejido Jagüey de Ferniza, Saltillo, Coahuila. Ejido

San José Carbonerillas Mazapil, Zacatecas, evaluó la sobrevivencia, variables dasonométricas en la cual incluyó la altura total, diámetro de copa y número de verticilios encontró una sobrevivencia global del 87.8 %, en la que sobresalió la localidad de San José Carbonerillas, Zacatecas. El conocimiento de los cambios bioquímicos que acontecen en *P. pinceana* nos permite aportar información para entender los mecanismos de sobrevivencia en estas coníferas en ambientes con disponibilidad de agua muy limitada.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron plantas de *Pinus pinceana* procedentes de dos poblaciones que crecieron en el ejido El Cinco de Mayo municipio de Parras, Coahuila y ejido Maguey Verde municipio de Peñamiller, Querétaro.

Ubicación geográfica de las poblaciones de *Pinus pinceana* estudiadas

Cuadro 1. Ubicación geográfica de poblaciones de *P. pinceana* en los estados de Coahuila y Querétaro (Martíñón, 2009).

Nombre de la localidad	Coordenadas geográficas		Altitud (m.s.n.m.)
	Latitud (N)	Longitud (O)	
Región Norte			
El Cinco	25° 10' 41"	101° 41' 16"	2250
Región Sur			
Maguey Verde	21° 05' 25"	99° 42' 00"	2176

Características de los lugares de procedencia de *P. pinceana*

Las poblaciones de *P. pinceana* de El Cinco son de tamaño mediano con una producción de conos que varía desde muy buena a baja. Este sitio está ubicado al sur de Coahuila y al norte con Zacatecas, está localizada en las Sierras Transversales. Las poblaciones de *P. pinceana* de El Cinco se desenvuelven en condiciones climáticas donde la temperatura media anual es de 19°C, la precipitación media anual es de 397 mm y el clima está clasificado como Bs1Kw"(e), los suelos son de tipo eutrico (Villarreal *et al.* 2009; CENTENAL, 1975). Las poblaciones de Maguey Verde están situadas en las Sierras y llanuras del norte de Guanajuato. Las poblaciones de *P. pinceana* de Maguey Verde, se

desarrollan en ambientes donde la temperatura media anual es de 21°C, la precipitación media anual es de 509.5mm y el clima esta clasificado como Bs1hw". Los suelos son de tipo Rendzina (CENTENAL, 1974; CENTENAL, 1975; Cardenaz, 2010; Villarreal *et al.*, 2009). Los grupos principales componentes de la flora vascular de las comunidades de *Pinus pinceana* son: Pteridophyta, Pinophyta, Magnoliophyta, Liliopsida y Magnoliopsida (Villarreal *et al.* 2009). El trabajo se dividió en dos partes: La parte fisiológica en la cual se hicieron mediciones del potencial hídrico antes del amanecer y después del medio día y contenido relativo de agua en las acículas, para determinar el nivel de estrés impuesto en las plantas. En la segunda parte se hizo el análisis bioquímico para la detección de dehidrinas como respuesta al estrés hídrico aplicado.

Ensayo de sequía

El ensayo de sequía consistió en suspender el riego en plantas de *P. pinceana*. Para cuantificar la pérdida de agua en el sustrato, las macetas se pesaron cada dos días. Las plantas control también se pesaron y se les suministraba agua para mantener el contenido de agua en el sustrato constante. La medición de la dinámica de la pérdida de agua en el sustrato se hizo con el fin determinar tiempo de muestreo.

Para el ensayo, las plantas de *P. pinceana* fueron trasplantadas a bolsas de polietileno de un litro de capacidad y con sustrato consistente en una mezcla en una proporción de 2:2:1 de Peat moss, Vermiculita y Agrolita, respectivamente y adicionado con fertilizante de lenta liberación (0.75 kg de Osmocote, 15:15:15, N:P:K) en aproximadamente 50 litros de sustrato total.

El contenido máximo de agua en una maceta fue de 1077 g, esto se determinó a partir de macetas que fueron regadas hasta saturar el sustrato, posteriormente se dejó drenar el exceso de agua por varias horas y se pesaron posteriormente, se puso el sustrato en una estufa de secado a 80°C por 2 días. La diferencia entre el peso a saturación del sustrato y sustrato seco, fue el dato tomando en cuenta como el contenido máximo de agua en una maceta. Este procedimiento fue realizado con cuatro repeticiones, también se determinó el peso estándar de las plantas, así como el peso promedio de bolsas, siendo el peso promedio de la planta de 88 g y el peso medio de la bolsa 13 g. El ensayo de sequía inició el 3 de noviembre del 2009 en el cual todas las plantas del experimento se regaron a saturación y a partir de ahí se suspendió el riego. Las plantas testigo se mantuvieron al 82% de agua en el sustrato, suministrando agua cada vez que se perdía. Todas las plantas fueron pesadas con una balanza (TorRey, L-EQ series) cada dos días para cuantificar la pérdida de agua en el sustrato.

Diseño experimental

Los tratamientos se aleatorizaron en cada bloque; tratamiento de riego normal (7 plantas de la procedencia El Cinco y 8 plantas de la procedencia Maguey Verde) y tratamiento de sequía (7 plantas de la procedencia El Cinco y 8 plantas de la procedencia Maguey Verde) (figura 2).

Cada bloque contó con 15 plantas útiles y 33 plantas de borde como se observa en la figura 2. Todas las macetas se mantuvieron elevadas del suelo con charolas de poliestireno para lograr un buen drenaje.

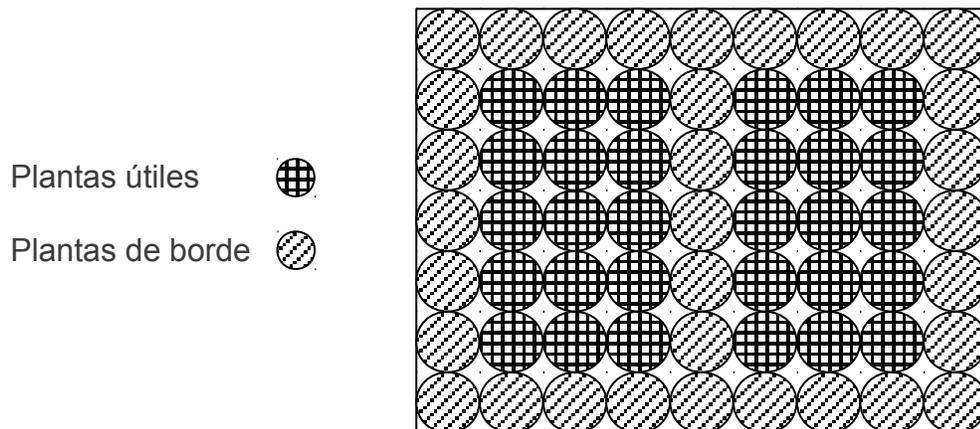


Figura 2. Esquema del orden y distribución de las plantas de *P. pinceana* para el ensayo de sequía.

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial de AxBxC con 3 repeticiones.

Donde:

A = Procedencias: El Cinco de mayo, Coahuila y Maguey Verde, Querétaro.

B = Tiempos de muestreo; Contenido porcentual de agua en el sustrato: 82%, 45%, 25% y 6%.

C = Tratamientos: Plantas sin riego y plantas con riego normal.

El análisis estadístico de los datos de los parámetros fisiológicos se procesó con el software estadístico R.

Muestreos y parámetros fisiológicos de estrés

Se muestreó en cuatro tiempos, que se determinaron de acuerdo a la dinámica de agua en el sustrato (figura 3). El tiempo uno fue con 82%, el tiempo dos fue 45%, tiempo tres 25% y el tiempo cuatro fue con el 6% de agua en el sustrato.

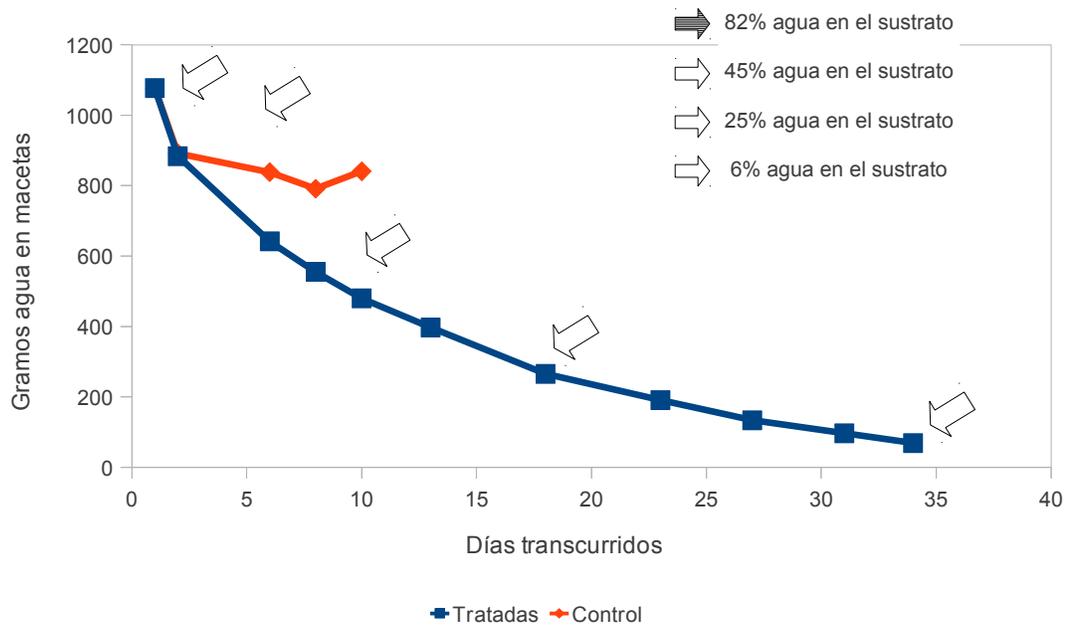


Figura 3. Dinámica de la pérdida de agua en el sustrato con plantas de *P. pinceana*. Las fechas indican los tiempos de muestreo.

En cada tiempo de muestreo, tanto en plantas tratadas como en plantas control, se hicieron las siguientes mediciones: El potencial hídrico antes del amanecer (ψ_{aa}) (entre 3 y 5 am) y el potencial hídrico después del medio día (ψ_{apm}) (entre 12 y 2 pm). La medición se hizo de acuerdo con la metodología recomendada por Day y Walsh (1980) con una cámara de presión modelo 600 (PMS Instruments Co., Corvallis, OR. USA). Se utilizaron 3 muestras de acículas (3 repeticiones) de plantas control y bajo estrés hídrico en ambas procedencias (12 plantas por muestreo).

También se determinó el Contenido Relativo de Agua en las acículas (RWC acículas) según la metodología de Teulat *et al.* (1997) cuya ecuación es:

$$RWC = \frac{(FW - DW)}{(TW - DW)} \times 100$$

Donde RWC: es el Contenido Relativo de Agua en acículas

FW: Peso fresco

DW: Peso seco

TW: Peso turgente

El procedimiento para obtener el contenido relativo de agua en las acículas fue el siguiente:

Se utilizaron 3 muestras de acículas de plantas control y bajo estrés hídrico y de ambas procedencias (el número total de plantas fue 12 por tiempo de muestreo).

Se utilizó 1 g de acículas (FW), posteriormente se pusieron en tubos Falcon con 50 ml de agua destilada, después se pusieron en refrigeración a 4°C por 24 h. Se retiraron las acículas de los tubos y se secó el agua excedente con papel, luego se pesaron las acículas para así obtener el peso turgente, después se pusieron a secar por 24 h a 80°C, finalmente se pesaron, obteniendo así el peso seco.

Los datos obtenidos de los parámetros fisiológicos fueron capturados en una hoja de cálculo de Openoffice para utilizarlos en el análisis de varianza.

La segunda parte de la investigación fue el análisis bioquímico para la detección de dehidrinas, y el cual involucra diversas técnicas. Primeramente se realizó la extracción de proteína de los dos órganos de plantas de *P. pinceana*.

Análisis bioquímico

Extracción de proteína

Se realizó la extracción y cuantificación de proteínas de hoja (acículas jóvenes: acículas del mismo año) y tallo de *P. pinceana* de la siguiente manera:

Se utilizaron 100 mg de hoja ó 200 mg de tallo (básicamente los tejidos vivos de la corteza, que se obtuvieron al raspar la corteza muerta de los tallos, se obtuvo la corteza viva (color verde) para la extracción de proteína. Las muestras fueron molidas en mortero con nitrógeno líquido, el polvo resultante se pasó a tubos Eppendorf, posteriormente se agregó 1 ml de buffer de extracción (50 mM de Borato de sodio, 50 mM de ácido ascorbico, 1.5% de Polivinil-polipirrolidona (PPVP), 100 μ M de Ditiotritol (DTT) y 10 μ M de Fluoruro de Sulfonil fenilMetano (PMSF), los últimos dos reactivos se agregaron en el momento de utilizar el buffer), se mezcló en vortex y los tubos con las muestras fueron centrifugados en una centrifuga marca Thermo Scientific modelo SL 40R a 20,000 xg por una hora a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se pasó a nuevos tubos, para hacer la cuantificación de proteína en el sobrenadante.

Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de la proteína contenida en el sobrenadante se hizo de acuerdo al método de Bradford (1976), para esto es necesario efectuar una curva estándar. Para hacer dicha curva se utilizan diluciones de una proteína pura concentrada conocida. Sobre cada dilución se lleva a cabo la reacción con solución de Bradford (Sigma Aldrich) y la curva estándar se obtiene al graficar los datos de absorbancia correspondientes a cada una de las diluciones contra la concentración de proteína de las misma. El rango de detección de proteínas para el método es de 200 a 1000 μ g/ml, dentro de la cual la relación absorbancia-concentración se mantiene lineal.

La curva estándar se utiliza relacionando la absorbancia medida en los estándares con la absorbancia medida en el sobrenadante.

Se realizó una curva estándar de la siguiente manera:

1. En tubos de ensaye se efectuaron las siguientes diluciones con albúmina de suero bovino(BSA) y agua milili Q (cuadro 2).

Cuadro 2: Diluciones para realizar la cuantificación de proteína en los extractos de tallo y hoja. BSA: albúmina de suero bovino.

Proteína (µg/ml)	0	200	400	600	800	1000
Agua (µl)	100	80	60	40	20	0
BSA (µl)	0	20	40	60	80	100

2. Fueron mezcladas en el vortex y se tomaron 50 µl de cada una.
3. A los tubos de ensaye con los 50 µl BSA y agua se agregó 1.5 ml de solución de Bradford, y fueron bien mezclados en vortex, también en nuevos tubos de ensaye se pusieron 50 µl del sobrenadante obtenido, se agregó 1.5 ml de solución de Bradford y se mezcló bien en vortex.
4. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific modelo Genesys 10-S).

Algunas muestras de acículas resultaron muy diluidas, por lo que fue necesario concentrarlas mediante ultrafiltración.

1. Se pusieron 500 µl de extracto de hoja en membranas de ultrafiltración (Millipore-Amicon Ultra 3K -3000 NMWL).
2. Posteriormente se centrifugaron a 14,000 xg por 30 min a 25°C, después se recupero el concentrado (aproximadamente 50 µl).
3. Para la cuantificación se hizo una dilución 1:10 ó 1:50 con 5 µl de la

proteína concentrada.

Una vez que se obtuvo el dato de la cuantificación de proteína, se preparó la proteína para su análisis.

Preparación de proteína

1. En tubos Eppendorf se agregó el volumen de extracto de tejido necesario para obtener 20 µg de proteína.
2. Se agregó Buffer de muestra (Buffer de Laemmli: agua mili-Q; 0.5 M de Tris-HCl pH 6.8; glicerol; SDS al 10%; 0.5% de azul de bromofenol y 50 µl de β-Mercaptoetanol).
3. Se aforó a un volumen de 20 µl con agua mili-Q y las muestras fueron desnaturalizadas por calentamiento en un circulador de agua (Plyscience modelo 109C01258) a 95°C por 5min.

Luego de que se preparó la muestra de proteína, se paso a hacer el siguiente análisis.

Separación de proteína totales por Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con Dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

La electroforesis es una técnica para separar proteínas. Básicamente las proteínas se mezclan con SDS, un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas eliminando sus estructuras, además le confiere un exceso de cargas negativas. Se adiciona el buffer de Laemmli que contiene β-Mercaptoetanol que reduce los puentes disulfuro y posteriormente se someten a un campo eléctrico para forzar su paso en una matriz de poliacrilamida y donde quedan así separadas en función de

su peso molecular.

La electroforesis se hizo de la siguiente manera: Se colocaron dos placas de vidrio en una cámara de electroforesis vertical (Enduro modelo E2010-P) con un espacio de 1 mm entre ambas donde se hizo un gel de separación como sigue:

1. En un vaso de precipitado se preparó un gel al 12% de poliacrilamida el cual contenía (9.5 ml): 3.4 ml de agua Mili-Q; 2.5 ml de Buffer tris-glicina 1.5 M pH 8.8; 100 μ l de SDS al 10%; 4 ml de solución de acrilamida al 30%; 50 μ l de persulfato de amonio al 10% y 5 μ l de N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamida (TEMED), se mezcló bien y el contenido del vaso se vació entre los espacios de las placas con la ayuda de una pipeta Pasteur.
2. Se dejó polimerizar por más o menos 15 minutos.
3. En un vaso de precipitados preparó un gel concentrador al 5% de acrilamida el cual contenía (6.5 ml): 4.2 agua Mili-Q; 0.65 ml de solución de acrilamida; 1.6 ml de Buffer tris-glicina 0.5M pH 6.8; 50 μ l de persulfato de amonio y 5 μ l de TEMED, se mezcló bien y se vació entre las placas e inmediatamente se colocó un peine de 10 pozos y se dejó polimerizar.

Para la corrida de las muestras de proteína de *P. pinceana* la cámara fue montada en un tanque que se llenó con un litro de buffer (Tris-glicina y SDS), se cargaron las muestras preparadas como se describió anteriormente en los pozos del gel de acrilamida con una jeringa Halmilton de 100 μ l a un volumen de 20 μ l por cada

carril. Se utilizó un volumen de 5 µl de marcadores moleculares preteñidos (Bio Basic, rango de 2-200 KDa). Como control positivo se utilizó proteína de embrión de maíz, obtenida usando el mismo procedimiento utilizado en hoja y tallo de pino. La electroforesis se desarrolló aplicando 150 V, por más o menos una hora y media. La electroforesis finalizó cuando el colorante llegó casi al final de las placas del gel y que fue visible en la parte frontal de la cámara.

El gel fue puesto en una solución para teñir (40% de metanol, 0.2% azul de Coomassie R y 7% ácido acético) en agitación constante en un agitador por tres horas, posteriormente se puso en una solución para desteñir (40% de metanol y 7% de ácido acético) se agitó y finalmente el gel se puso en agitación con una segunda solución para desteñir (40% ácido acético y 2% metanol).

El gel resultante de una electroforesis y que no fue teñido con azul de Coomassie, fue utilizado para la detección de dehidrinas por la técnica Western Blot.

Análisis Western Blot para detectar dehidrinas (DNHs)

La identificación de las DNHs se hizo por inmunodetección (“Western Blot”, Towbin *et al.*, 1979).

Generalidades del método

En el análisis de inmunodetección básicamente se hace utilizando un anticuerpo específico, en este caso, contra el segmento K de las dehidrinas (Close *et al.*, 1993).

La técnica de inmunodetección consta de los siguientes pasos: separación de proteínas mediante electroforesis, posteriormente se transfieren las proteínas

desde el gel a una membrana de nitrocelulosa por acción de un campo eléctrico. Después se incubó la membrana con una solución de proteínas para bloquear la membrana y evitar la unión inespecífica a la superficie de los anticuerpos de interés. En el siguiente paso se une a la proteína transferida un anticuerpo específico, posteriormente se une a otro marcado con una enzima y finalmente se añade un sustrato para la enzima y lo cual dará como resultado un precipitado cromogénico en la membrana.

La inmunodetección se hizo de la siguiente manera:

Primeramente para la transferencia de las proteínas en el gel de acrilamida a membrana se utilizó una membrana de nitrocelulosa de 9 cm x 6 cm, la cual junto con 4 papeles filtro de 7 cm x 10 cm fueron bien mojados en buffer de transferencia (buffer de electrodo, 250 mM de Tris base, 1.92 M de glicina y 20% de metanol) se acomodó la membrana y el gel de acrilamida de la siguiente manera: primero una esponja seguida de dos papeles filtro, en seguida se puso el gel de acrilamida después la membrana de nitrocelulosa seguida de dos papeles filtro y encima dos esponjas, el sándwich fue ensamblado en la cámara, se hizo la transferencia a 30 V toda la noche dentro del refrigerador.

Posteriormente se retiró la membrana y se puso en un recipiente y en agitación por 40 minutos con solución de bloqueo la cual contenía: TBS (10 mM de tris base y 0.25 M de NaCl, pH 7.5 ajustado con HCl concentrado) 0.02% de azida de sodio y 3% de gelatina de piel de pescado. Después se incubó la membrana en una bolsa de polietileno y en agitación por 2 h con el anticuerpo primario anti-dehidrina de conejo diluido 1:2000 con TBS 1x y gelatina de piel de pescado al 1%. La

membrana se enjuagó brevemente en TBS, después se dieron 3 enjuagues de 7 minutos cada uno en TTBS (TBS más 0.05% de Tween 20).

Después se incubó la membrana en una bolsa de polietileno y en agitación por 45 minutos con el anticuerpo secundario (IgG anticonejo-fosfatasa alcalina, Sigma Aldrich) diluido 1:750 con TBS 1x y gelatina de piel de pescado al 1%.

La membrana se enjuagó brevemente en TBS, después se dieron 3 enjuagues de 7 minutos cada uno en TTBS, más otro enjuague por un minuto en buffer fosfatasa alcalina (ALPH) (100 mM de tris pH 9.5, 100 mM de NaCl, 5 mM de $MgCl_2$).

Se hizo la reacción de la fosfatasa usando buffer ALPH adicionado con 0.66% de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) y 0.33% de NBT (azul de nitrotetrazolio) por aproximadamente 10 minutos cuando se observó un precipitado púrpura en la membrana, después se enjuagó con agua destilada por un minuto, luego en ácido acético al 10%, finalmente se dejó secar al aire en la oscuridad.

VI. RESULTADOS

Dinámica de la pérdida de agua en el sustrato

El contenido de agua en el sustrato, es el agua disponible para la planta por lo que esto nos da una idea de que tanto estrés hídrico se puede provocar a las plantas de *P. pinceana*. En este caso se logró bajar hasta el 6% el contenido de agua en el sustrato.

Potencial hídrico antes del amanecer (Ψ_{aa})

Se realizaron mediciones de potencial hídrico antes del amanecer (Ψ_{aa}) cuando el potencial hídrico en la planta tiende a estar en equilibrio con el potencial hídrico en el suelo.

El análisis de varianza de los datos de Ψ_{aa} , arrojó una diferencia altamente significativa tanto entre tratamientos, como en tiempos de muestreos, pero no entre procedencias, ni en sus interacciones (anexo). Los valores medios de Ψ_{aa} al inicio del ciclo (tiempo 1) el Ψ_{aa} es cercano a -1 MPa tanto para las plantas control como las tratadas cuando el contenido de agua en el sustrato es de aproximadamente 82% (Figura 4). La tendencia de plantas bajo estrés hídrico es clara, el contenido de agua en el sustrato baja y el Ψ_{aa} , se hace más negativo.

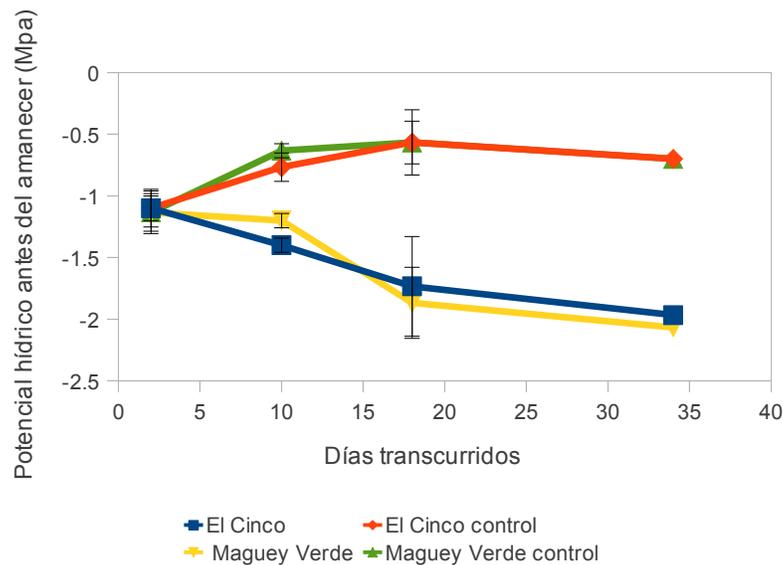


Figura 4. Potencial hídrico antes del amanecer (Ψ_{aa}) de plantas de *P. pinceana* en condiciones de las procedencias El Cinco y Maguey Verde bajo condiciones de riego y bajo estrés hídrico. Las barras representan la desviación estándar.

Potencial hídrico después del medio (Ψ_{apm})

Los datos del análisis de varianza resultaron altamente significativos tanto en el tiempos de muestreo como entre tratamientos, pero no entre procedencias, ni en las interacciones. Al inicio del ensayo de sequía el contenido de agua en el suelo fue de 82% en las plantas control y plantas bajo estrés hídrico el Ψ_{apm} fue de aproximadamente -1.4 MPa a medida que los días transcurrieron el Ψ_{apm} se hizo más negativo (Figura 5). A los 10 días las plantas bajo estrés hídrico tuvieron 45% de agua en el sustrato y el Ψ_{apm} fue de más o menos -1.8 MPa, al término de ciclo cuando el agua en el sustrato fue de 6% las plantas de ambas procedencias tuvieron un Ψ_{apm} de -2.3 MPa. Por otra parte las plantas control hicieron ligeramente más negativo el Ψ_{apm} a los 10 y 18. A los 34 días el Ψ_{apm} subió más o menos a el valor del cual partió el ciclo (-1.4 Mpa).

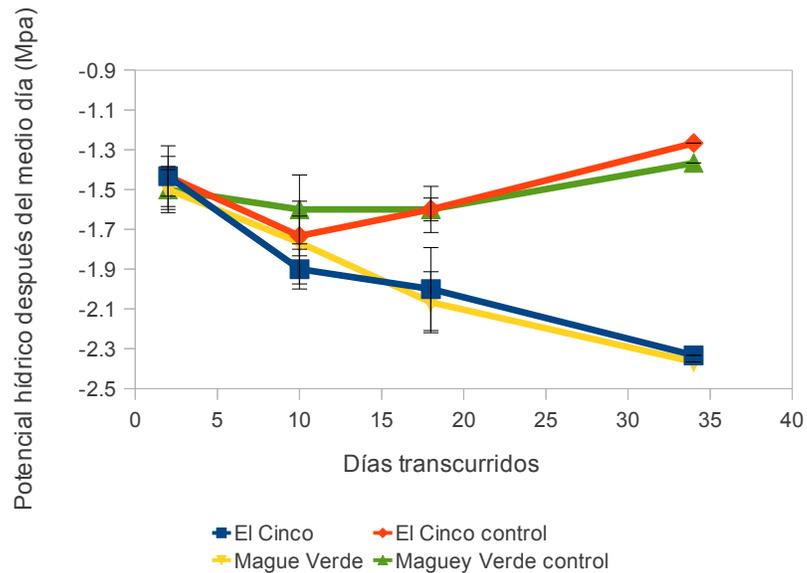


Figura 5. Potencial hídrico después del medio día (Ψ_{apm}) de plantas de *P. pinceana* de las procedencias el Cinco y Maguey Verde en condiciones de riego y bajo estrés hídrico. Las barras representan la desviación estándar.

Contenido relativo de agua en las acículas (CRA)

El contenido relativo de agua en las acículas, de acuerdo al análisis de varianza de los datos, no existió diferencia significativa en las variables estudiadas. El gráfico de la figura 6 muestra que la desviación estándar es alta, lo que puede ser a causa de que el tamaño de muestra fue pequeño (3 repeticiones), también debe tomarse en cuenta que es una especie silvestre y por eso existió variación amplia entre individuos.

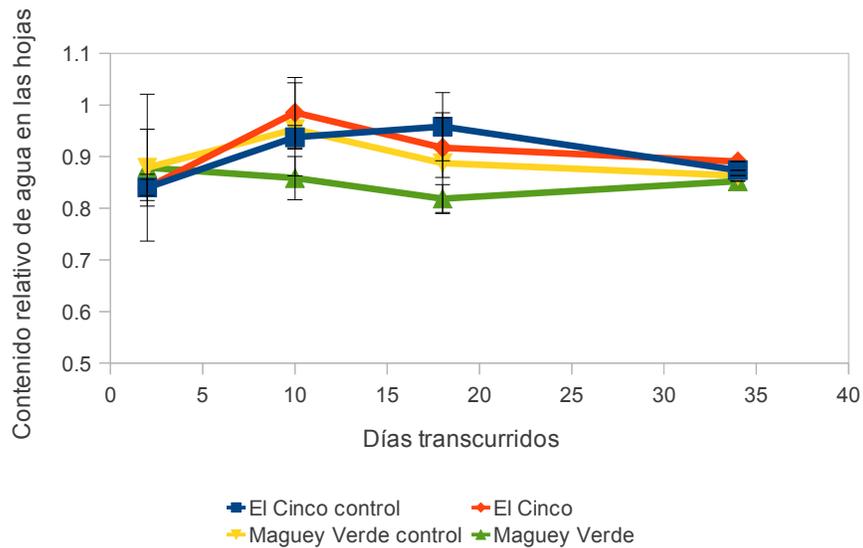


Figura 6. Contenido Relativo de Agua en las acículas de plantas de *P. pinceana* de las procedencia El Cinco y Maguey Verde en condiciones de riego y bajo estrés hídrico. Las barras representan la desviación estándar.

Las condiciones en las que se realizó el experimento no provocaron cambios en el contenido relativo de agua en las acículas, es decir, bajo condiciones de riego normal, sin riego y de diferente procedencia el contenido relativo de agua en las acículas fue el mismo.

Análisis bioquímico

En la electroforesis de proteínas totales de acículas de la procedencia Maguey Verde tanto de muestras de plantas tratadas como de plantas control evidente que el patrón de bandeo es homogéneo lo cual indica que la cantidad de muestra puesta en cada carril del gel fue similar (Figura 7).

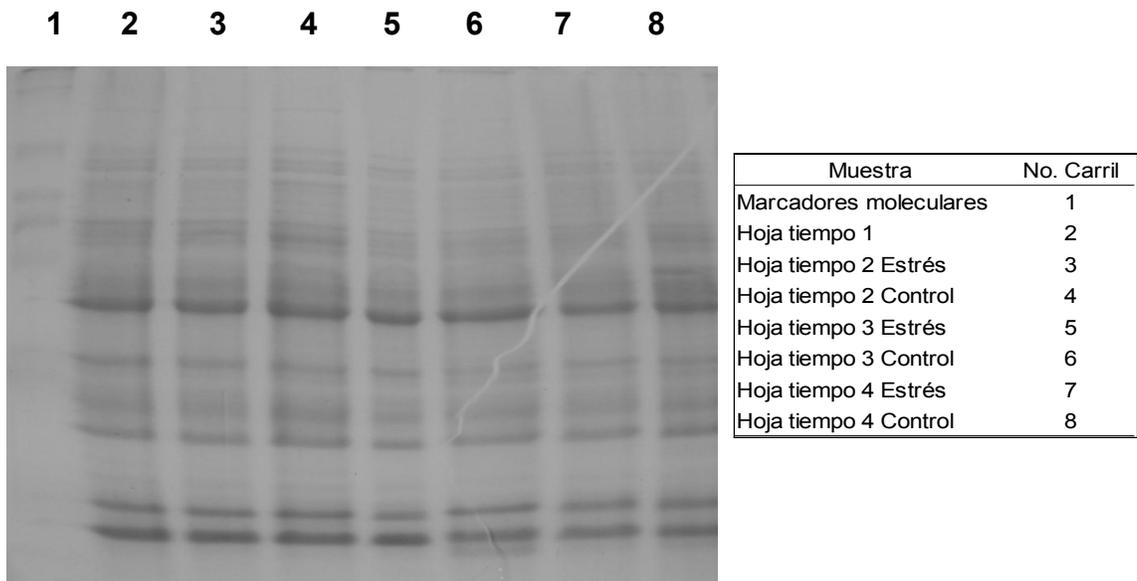


Figura 7. SDS-PAGE teñido con azul de Coomasie. Patrón de bandas de proteínas totales de *P. pinceana* de hoja de la procedencia Maguey Verde.

Dehidrinas en embrión de *P. pinceana*

Las dehidrinas son proteínas que se acumulan en la fase tardía de la embriogénesis de la mayoría de las plantas. Para definir cuales dehidrinas existen en *P. pinceana* se hizo el análisis Western Blot en embrión, utilizando el anticuerpo anti-dehidrina de conejo (Close *et al.*, 1993).

En la figura 8 se muestra la inmunotransferencia de las proteínas de embrión de maíz utilizada como control positivo (carril 1), pues estas proteínas son ampliamente conocidas. En el carril 2 aparece la inmunotransferencia de las proteínas de embrión de *P. pinceana*, en la cual se detectaron 5 dehidrinas que van de un peso molecular de 17 a 60 KDa. La dehidrina de 51 KDa es la mejor marcada en comparación con las otras dehidrinas.

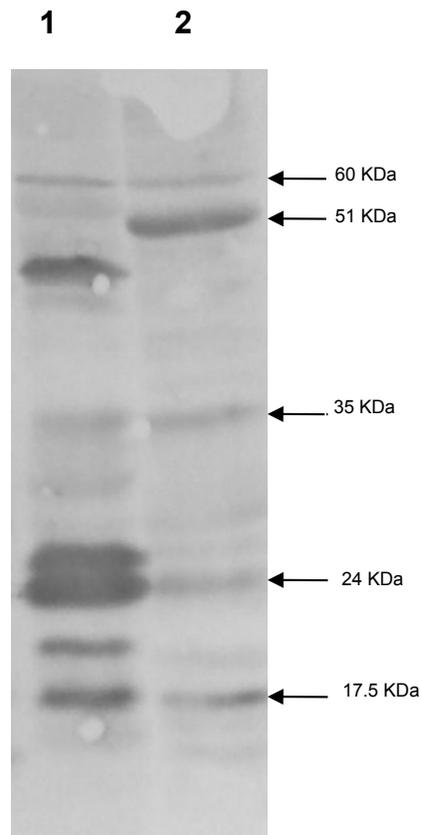


Figura 8. Inmunotransferencia de dehidrinas de embrión de maíz (carril 1) y de embrión de *P. pinceana* (carril 2).

Dehidrinas en tallo y hoja de *P. pinceana*

Después de que se hizo la detección de dehidrinas en embrión de *P. pinceana* se hizo la inmunodetección en tallo y hoja de *P. pinceana* sujetas a estrés hídrico.

En la figura 9 se muestra la membrana resultante de la inmunodetección en el cual se identificaron 2 dehidrinas (69 y 59 KDa) en el tallo.

En el ultimo tiempo de muestreo (a los 34 días) existió una ligera diferencia en el patrón de bandeado de ambas procedencias; para el caso de la procedencia El Cinco la dehidrina mejor marcada es la de 59 Kda en las plantas de la procedencia Magüey Verde la dehidrina que mas sobresalió fue la de 69 Mpa.

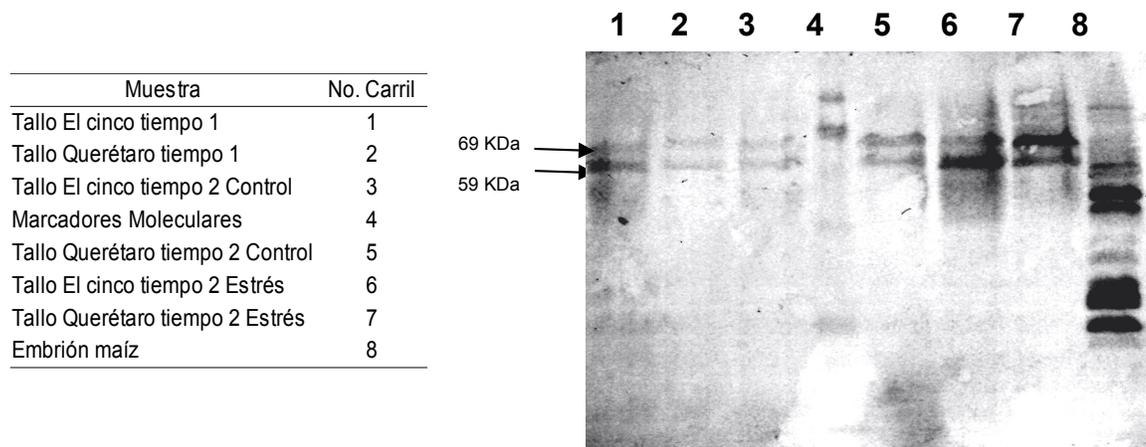


Figura 9. Inmunotransferencia de dehidrinas de tallo de plantas tratadas y plantas control de *P. pinceana* de las procedencias el cinco y Maguey Verde.

En la figura 10 aparece una membrana de nitrocelulosa con las dehidrinas plasmadas, resultado de la inmunodetección en tallo de plantas control de *P. pinceana* y de ambas procedencias. En plantas control en las que el contenido porcentual de agua en las macetas es de 45%, el potencial hídrico antes del amanecer se mantuvo en un rango de entre -0.6 a 1.8 MPa y el potencial hídrico después del medio día se mantuvo entre -1.6 a -2 MPa y como puede observarse existen dos dehidrinas presentes (69 y 59 Kda) en las plantas de la procedencia El Cinco, también se logra visualizar algunos polipéptidos que no definen bien una banda.

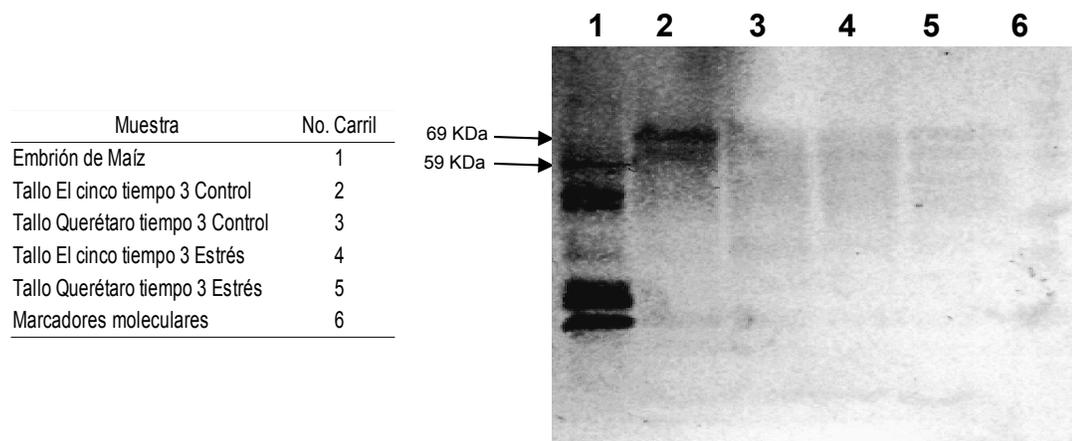


Figura 10. Inmunotransferencia de dehidrinas de tallo de plantas control de *P. pinceana* de las procedencias El Cinco y Maguey Verde.

Como se puede apreciar en la figura 11 las dehidrinas de 69 y 59 KDa también están presentes en ambas procedencias aunque con mayor intensidad en el tiempo 4 de plantas control, tanto las plantas de la procedencia El Cinco como la procedencia Maguey Verde tenían un potencial hídrico antes del amanecer de -0.7 MPa y el potencial hídrico después del medio día fue de -1.3 MPa. Además de que también se puede visualizar muy tenue una dehidrina de 32.2KDa.

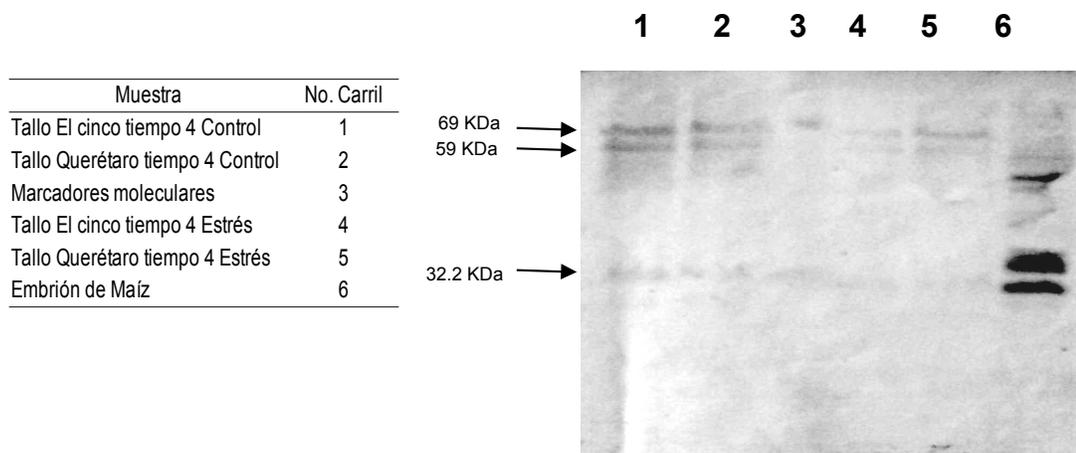


Figura 11. Inmunotransferencia de dehidrinas de tallo de *P. pinceana* de las procedencias El Cinco y Maguey Verde.

Se hizo el análisis Western Blot de proteínas de hoja de plantas de *P. pinceana* bajo estrés hídrico y como se puede observar en el figura 12 también esta presente la dehidrina de 69 KDa a lo largo de los 4 tiempos de muestreo, así como en ambas procedencias.

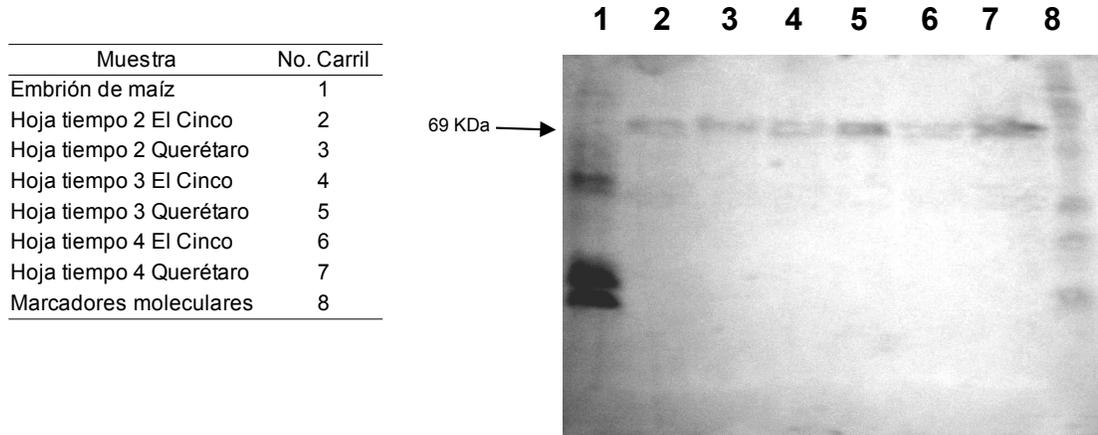


Figura 12. Inmunotransferencia de dehidrinas de hoja de plantas de *P. pinceana* bajo estrés hídrico de las procedencias El Cinco y Maguey Verde.

En las plantas control en las cuales se mantuvo el agua en el sustrato al 82% se detectó una dehidrina de 69 KDa (figura 13) en todos los tiempos de muestreo y también en ambas procedencias aunque estas bandas son muy tenues.

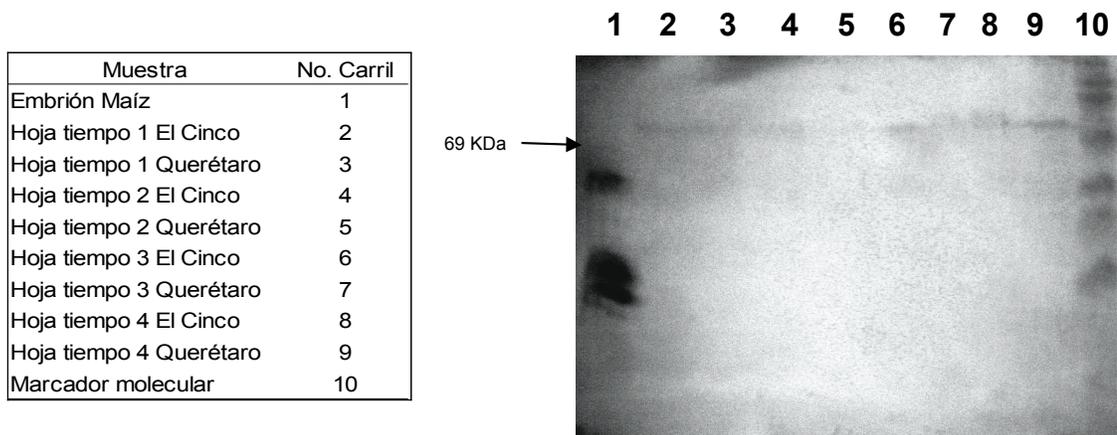


Figura 13. Inmunotransferencia de dehidrinas de hoja de plantas control de *P. pinceana* de las procedencias El Cinco y Maguey Verde.

VII. DISCUSIÓN

A los 34 días el contenido de agua en el sustrato de plantas de *P. pinceana* bajó hasta el 6% en ambas procedencias. En plantas bajo estrés hídrico de ambas procedencias no existió diferencia significativa, el potencial hídrico antes del amanecer registrado fue de -1.9 MPa. En plantas control de ambas procedencias el potencial hídrico antes del amanecer fue de -0.7 MPa. Estos resultados son similares a los encontrados por Ramírez-Herrera (2007) en el que a plántulas de *P. pinceana* de un año de edad, de 12 procedencias entre ellas la procedencia El Cinco y Maguey Verde, se sometieron a un ciclo de sequía de 104 días y se determinó un potencial hídrico antes del amanecer de -2 MPa, sin embargo midió la cantidad de cera en 12 diferentes procedencias y encontró diferencias significativas, en este caso la procedencia El Cinco produjo $15.9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ y Maguey Verde produjo $13.4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Estas diferencias entre procedencias también fueron encontradas por Martiñón (2009), quien a plantas de *P. pinceana* de 25 meses de edad y diferentes poblaciones entre ellas El Cinco, Coahuila y de la parte sur, la población de San Cristóbal, Hidalgo, las sometió a condiciones de sequía por 160 días, y al realizar la determinación de la composición isotópica de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), encontró que las poblaciones de la región norte presentan en promedio una menor discriminación del isótopo ^{13}C (-23.99) que las poblaciones del sur (-24.43). Una menor discriminación del isótopo de carbono se asocia con una mayor eficiencia en el uso del agua de las plantas en condiciones de estrés hídrico.

Un aspecto muy importante que debe considerarse para ensayos de sequía es la edad de las plantas, ya que Ramírez-Herrera (2007) midió un potencial hídrico

antes del amanecer de -2 MPa, en plántulas de una año de edad a los 104 días, mientras que Martiñón (2009) midió el mismo valor del potencial hídrico a los 160 días en plántulas de *P. pinceana* de 25 meses de edad.

El ensayo de sequía se llevo a acabo en un invernadero en donde la temperatura se mantuvo en 28°C en el día, en la noche a 24°C y la humedad relativa se mantuvo entre 70 y 80%. Estas condiciones son muy similares a las condiciones en las Martínez (2004) al suspender el riego a plántulas de *Pinus duranguensis* por 16 días y que alcanzó un potencial hídrico antes del amanecer de -2.5 MPa, sin embargo no encontró diferencias significativas entre las plantas control y las plantas sometidas a estrés hídrico en las variables morfológicas medidas (altura, diámetro basal).

En plantas de *P. pinceana* de ambas procedencias, tanto en plantas control como en plantas sometidas a estrés hídrico, el contenido relativo de agua en las acículas fue igual. Estos resultados no concuerdan con los encontrados por Nguyen-Queyrens y Bouchet-Lannat (2003) que sometieron a un ensayo de sequía por 10 semanas a plántulas de *Pinus pinaster* de 5 procedencias, encontraron diferencias significativas tanto entre procedencias como entre los tiempos de muestreo y a las 10 semanas el contenido relativo de agua en las acículas más bajo fue de 77.4%, también midieron el ajuste osmótico y encontraron que la sequía que impusieron afecto poco a las plantas ya que *Pinus pinaster* mostró un alto nivel de ajuste osmótico (0.30 MPa) en acículas y raíces.

En *P. pinceana* muy probablemente también existió ajuste osmótico y puede ser una razón de por que el contenido relativo de agua en las acículas en condiciones

de sequía y en condiciones de riego es el mismo. Aunque el agua presente en el sustrato no es el único factor principal directamente relacionado con el estrés en las plantas, puesto que también depende de la severidad de la demanda atmosférica (Day y Walsh, 1980).

Del análisis Western Blot que se hizo en embrión de *P. pinceana* se detectaron 5 dehidrinas con un peso molecular de 60, 51, 35, 24 y 17.5 KDa. La dehidrina de 51 KDa fue la mejor y más fuertemente marcada que el resto de las dehidrinas. Algunas de estas dehidrinas son parecidas a las encontradas por Close *et al.* (1993) en embrión de *Pinus edulis* Engelm., en este caso de las 3 dehidrinas detectadas (84, 33 y 16 KDa), la dehidrina mejor marca en *P. edulis* fue la de 16 KDa y que tiene mucha similitud a la de 17.5 KDa detectada en *P. pinceana*.

En tallo de *P. pinceana* se detectaron 2 dehidrinas de 69 y 59 KDa de peso molecular. De acuerdo a los parámetros fisiológicos vistos anteriormente el estrés hídrico impuesto a plantas de *P. pinceana* posiblemente no fue tan severo o probablemente las dehidrinas detectadas no fueron inducidas por la sequía. Una dehidrina de 60 KDa muy parecida a la de 59 KDa de *P. pinceana* fue detectada en tejido vivo de corteza de plantas de *Pinus sylvestris* L. por Kontunen-Soppela y Laine (2001) al hacer la detección de dehidrinas en tejido de acícula, yemas y corteza viva de árboles de 40 años de edad en estado natural, también encontraron 3 dehidrinas de 60, 56 y 50 KDa, y aseveran que existe una correlación entre el potencial osmótico y aparición de dehidrinas. En yemas y corteza la concentración de dehidrinas tuvo muchas fluctuaciones a lo largo del año y los niveles más altos se obtuvieron en invierno.

En hoja de plantas de *P. pinceana* bajo estrés hídrico se detectó solo una dehidrina de 69 KDa. Kontunen-Soppela *et al.* (2000) detecto una dehidrina de 60 KDa en acículas de plántulas de *Pinus sylvestris* L. de 2 años de edad al estudiar la desaclimatación desde la perspectiva de la síntesis de proteínas, que esta relacionada con la fertilización nitrogenada. La desaclimatación fue seguida por las variables fisiológicas: resistencia a congelación y el potencial osmótico. También encontraron que las dehidrinas van desapareciendo durante la desaclimatación más rápidamente en plantas fertilizadas que en las plantas control, por lo que esa dehidrina puede estar específicamente relacionada con el acondicionamiento a bajas temperaturas.

VIII. CONCLUSIONES

Las condiciones en las que se realizó el ensayo de sequía en *P. pinceana* y de acuerdo a los parámetros fisiológicos medidos determinan que el estrés hídrico impuesto no fue severo, o en su defecto *P. pinceana* debido a que es una planta xerofita, desencadena una serie de mecanismos fisiológicos de ajuste como el cierre estomático y el ajuste osmótico, haciendo un

uso eficiente del agua ante condiciones de escasez de agua en el sustrato.

Bioquímicamente el estrés hídrico impuesto no indujo la acumulación de dehidrinas de manera significativa.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- 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: 248-254 .
- Beck H., Fetting S., Knake C., Harting K, Bhattarai T. 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought. *Journal Bioscience*. 32(3) 501-510.
- Benavides, A., M. 2002. El concepto de estrés. *Ecofisiología y bioquímica del estrés en plantas*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. México. pp11.
- Campbell S. A. y Close T. J. 1997. Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *New Phytologist*. 137: 61-74.
- Caramelo J. J., Lusem N. D. 2009. When cells lose water: Lessons from biophysics and biology. *Progress in Biophysics and molecular biology*. 99. 1-9.
- Cardenaz, L. B. 2010. Ensayo de Adaptación de Cuatro Procedencias de *Pinus pinceana* Gordon en el Municipio de Saltillo, Coahuila. Tesis de Ingeniero Forestal, División de Agronomía. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. México. 51 pp.

- Comisión de Estudios del Territorio Nacional (CETENAL). 1974. Carta Edafológica, F14 C47, Peñamiller, Querétaro. Escala 1:50,000. México.
- Comisión de Estudios del Territorio Nacional (CETENAL). 1975. Carta geológica, G14 C33, Escala 1:50,000. Saltillo, Coahuila.
- Close T. J. 1996. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum*. 97: 795-803.
- Close T. J. 1997. Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum*. 100: 291-296.
- Close T. J., Fenton R. D., Moonan F. 1993. A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxy terminal peptide. *Plant Mol Biol* 23: 279-286 .
- Favela S., Velazco C., Alanís G. 2009. *Pinus pinceana* (Pinaceae), nuevo registro para el estado de Nuevo León, México. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*. 3(2): 771-774.
- Day R. J. y Walsh S. J. 1980. A manual for using the pressure chamber in nurseries and plantations. *Silv. Rep.* 1980-2 Lakehead University School of Forestry. Thunder Bay, Ontario. Canada.

González M. S. 2010. Comunicación personal. Academia de Recursos Bióticos, Centro Interdisciplinario para el Desarrollo Integral Regional-Unidad Durango. Durango (CIIDIR-DGO). Correo electrónico: herbario_ciidir@yahoo.com.

González-Martínez S. C., Ersoz E., Brown G. R., Wheeler N. C., Neale D. B. 2006. DNA sequence variation and selection of tag single-nucleotide polymorphisms at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L. Genetics Society of America. 172: 1915-1926.

Kontunen-Soppela S. y Laine K. 2001. Seasonal fluctuation of dehydrins is related to osmotic status in Scots pine needles. Trees. 15: 425-430.

Kontunen-Soppela S., Taulavuori K., Taulavuori E., Lahdesmaki P., Laine K. 2000. Soluble proteins and dehydrins in nitrogen-fertilized Scots pine seedlings during deacclimation and the onset of growth. Physiologia Plantarum. 109: 404-409.

Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.

Ledig F. T., Capó-Arteaga M. A., Hodgskiss P. D., Sbay H., Flores-Lopez C., Thompson M., Bermejo-Velázquez B. 2001. Genetic diversity and the

mating system of a rare mexican piñon, *Pinus pinceana*, and a comparison with *Pinus maximartinezii* (Pinaceae). American Journal of Botany. 88(11): 1977-1987.

Martínez G. 2004. Evaluación del estrés hídrico en *Pinus duranguensis*. Tesis Ingeniero Forestal, División de Agronomía. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. México. 48 pp.

Martínez-Trinidad T., Vargas-Hernández J., López-Upton J., Muñoz-Orozco A. 2002. Respuesta al déficit hídrico en *Pinus leiophylla*: acumulación de biomasa, desarrollo de hojas secundarias y mortalidad de plántulas. Terra. 20 (3): 291-301.

Martiñón R. J. 2009. Efecto del estrés hídrico y por altas temperaturas sobre algunas características de crecimiento, distribución y composición isotópica de carbono de poblaciones de *Pinus pinceana*. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo. Texcoco, Estado de México. México. 64 pp.

Nguyen-Queyrens A. y Bouchet-Lannat F. 2003. Osmotic adjustment in three-year-old seedling of five provenances of maritime pine (*Pinus pinaster*) in response to drought. Tree Physiology. 23, 397-404.

- Pérez J. A. 2006. Tamaño y densidad de estomas en hojas de *Pinus pinceana* Gordon de tres procedencias del Norte de México. Tesis de licenciatura, División de Agronomía. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. México. 46 pp.
- Parra R. A., Rodríguez J. L., González V. A. 1999. Traspiración, potencial hídrico y prolina en zarzamora bajo déficit hídrico. *Terra*. 22 (2):125-130.
- Ramírez J. 2008. Ensayo de tres procedencias de *Pinus pinceana* Gordon en tres localidades del norte de México. Tesis, División de Agronomía. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. México. 53 pp.
- Ramírez-Herrera C. 2007. Quantitative trait variation and allozyme diversity of *Pinus pinceana*. Thesis Doctor of Philosophy in Forestry. University of New Brunswick. Canadá. 198 pp.
- Rodríguez M., Canales E., Borrás-Hidalgo O. 2005. Review: Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biotechnología aplicada*. 22: 1-10.
- Rosales M. A, Blasco B., Rubio-Wilhelmi M., Castilla N., Ruiz J.M., Romero L. 2007. Influencia de diferentes variables ambientales sobre el metabolismo de prolina en frutos de tomate cherry y cultivos en

invernadero. Acta de Horticultura No 48. XI Congreso Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Granada, España. 290-293.

Shaw G. R. 1993. The pines of México. Faculty of Forestry University of Toronto. Arnold Arboretum. 96 pp.

Taiz L., Zeiger E. 2006. Fisiología Vegetal 3rd.edición. Publicacions de la Universitat Jaume. USA. 656 pp.

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

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electroforetic transfer of proteins for polyacrylamide nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76(9):4350-4354.

Villarreal J. A., Mares O., Cornejo E., Capó-Arteaga M. A. 2009. Estudio florístico de los piñonares de *Pinus pinceana* Gordon. Acta Botánica Mexicana 89: 87-124.

ANEXOS

Análisis de varianza de los datos de potencial hídrico antes del amanecer (Ψ_{aa})

	GL	SC	CM	F	Pr(>F)
Tiempo	1	55.13	55.13	11.6268	0.001691 **
Tratamiento	1	843.59	843.59	177.9039	4.565e-15 ***
Procedencia	1	0.10	0.10	0.0201	0.888137
Tiempo:Tratamiento	1	211.44	211.44	44.5900	1.151e-07 ***
Tiempo:Procedencia	1	2.44	2.44	0.5146	0.478066
Tratamiento:Procedencia	1	0.04	0.04	0.0093	0.923732
Tiempo:Tratamiento:Procedencia	1	4.61	4.61	0.9721	0.331122
Residuals	34	161.22	4.74		

Símbolos de significancia: 0 '****', 0.001 '***', 0.01 '**', 0.05 '!', 0.1 ' ' 1

Valores medios de potencial hídrico antes del amanecer en plantas de *P. pinceana*.
Valores dados en MPa.

Días Transcurridos	Ψ_{aa} El	Ψ_{aa} El Cinco	Ψ_{aa} Maguey	Ψ_{aa} Maguey Verde
	Cinco	Control	Verde	Control
2	-1.1	-1.1	-1.1	-1.1
10	-1.4	-0.7	-1.2	-0.6
18	-1.7	-0.5	-1.8	-0.5
34	-1.9	-0.7	-2	-0.7

Análisis de varianza de los datos de potencial hídrico después del medio día (Ψ_{apm})

	GL	SC	CM	F	Pr(>F)
Tiempo	1	44.00	44.00	16.3405	0.0002868 ***
Tratamiento	1	283.95	283.95	105.4506	5.887e-12 ***
Procedencia	1	0.00	0.000	1.335e-29	1.0000000
Tiempo:Tratamiento	1	82.37	82.37	30.5894	3.509e-06 ***
Tiempo:Procedencia	1	1.43	1.43	0.5332	0.4702524
Tratamiento:Procedencia	1	0.38	0.38	0.1417	0.7089388
Tiempo:Tratamiento:Procedencia	1	0.771	0.771	0.2865	0.5959707
Residuals	34	91.556	2.693		

Símbolos de significancia: 0 '****', 0.001 '***', 0.01 '**', 0.05 '!', 0.1 ' ' 1

Valores medios de potencial hídrico después del medio día en plantas de *P. pinceana*. Valores dados en MPa.

Días Transcurridos	Ψ_{apm} El	Ψ_{apm} El Cinco	Ψ_{apm} Maguey	Ψ_{apm} Maguey Verde
	Cinco	Control	Verde	Control
2	-1.4	-1.4	-1.5	-1.5
10	-1.9	-1.7	-1.7	-1.6
18	-2	-1.6	-2	-1.6
34	-2.3	-1.2	-2.3	-1.3

Valores medios de contenido relativo de agua en las acículas (RWC) en plantas de *P. pinceana*. Valores porcentuales.

Días Transcurridos	RWC El	RWC El Cinco	RWC Maguey	RWC Maguey Verde
	Cinco	Control	Verde	Control
2	84	84	87.8	87.8
10	98.5	93.7	85.8	95.3
18	91.7	95.8	81.9	88.7
34	89.1	87.4	85.2	86.3