

ALTERACIONES FISIOLÓGICAS PROVOCADAS POR SEQUÍA EN NOPAL (*Opuntia ficus-indica*)PHYSIOLOGICAL ALTERATIONS INDUCED BY DROUGHT STRESS ON PRICKLY PEAR (*Opuntia ficus-indica*)Guillermo Aguilar Becerril^{1*} y Cecilia Beatriz Peña Valdivia²

¹Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. 56230, Chapingo, Edo. de México. ²Programa de Botánica, Campus Montecillo, Colegio de Postgrados. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. de México.

*Autor para correspondencia (aguilar_becerril_guillermo@hotmail.com)

RESUMEN

Los cambios fisiológicos provocados por la falta de agua en el nopal (*Opuntia ficus-indica*) han sido poco estudiados. En esta investigación se analizó el efecto del estrés hídrico en cladodios de nopal de seis meses de edad, de plantas cultivadas en maceta e invernadero durante 180 d. En las plantas bajo sequía severa (sin ningún riego) se redujo significativamente la concentración de clorofilas. En el clorénquima la clorofila *a+b* disminuyó en 42.3 %, la clorofila *a* en 34.2 % y la clorofila *b* 31.4 %; en el parénquima, los decrementos fueron de 39.6 %, 35.8 % y 23.6 %, respectivamente. La actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa disminuyó significativamente 19.6 % en tejido clorenquimatoso y 60 % en parénquima; el transporte fotosintético de electrones se redujo en 29.5 % en el tejido clorenquimatoso, mientras que en el parénquima aumentó 150 %. La sequía redujo la fluorescencia de la clorofila tanto en el clorénquima como en el parénquima. En cambio, las características fisiológicas en plantas con sequía intermedia (dos riegos) fueron afectadas ligeramente.

Palabras clave: *Opuntia*, clorofila, transporte de electrones, PEPCasa.

SUMMARY

Photochemical changes caused by drought stress in prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica*) have been little studied. In this research the effect of drought stress was analyzed in six months old potted plants grown in a greenhouse for 180 d. Under severe drought (without any watering) the chlorophyll concentration was significantly reduced. In chlorenchyma, chlorophyll *a+b* was diminished in 42.3 %, chlorophyll *a* in 34.1 %, and chlorophyll *b* in 31.4 %. In parenchyma, chlorophyll *a+b*, *a* and *b* were decreased in 39.4, 35.7 and 23.5 %, respectively. Phosphoenol pyruvate carboxylase activity was also significantly diminished (19.0 % in chlorenchyma and 60 % in parenchyma). Photosynthetic electron transport was diminished by 29.5 % in chlorenchyma, while it increased (150 %) in parenchyma. Under drought stress the chlorophyll fluorescence was reduced in both chlorenchyma and parenchyma. However under a moderate stress (two waterings) these physiological traits were only slightly affected.

Index words: *Opuntia*, chlorophyll, electron transport, PEPCasa.

Recibido: 18 de Julio del 2003.

Aceptado: 24 de Junio del 2006.

INTRODUCCIÓN

La falta de agua provoca reducción de la humedad aprovechable del suelo y del contenido de agua de los tejidos de las plantas, y ha sido considerada el factor ambiental que restringe con más frecuencia la productividad de los ecosistemas naturales y la agricultura, que ha generado pérdidas económicas en numerosas regiones a lo largo de la historia (Blum, 1997). El efecto del déficit de agua está determinado por su intensidad, duración y oportunidad, así como por la capacidad de las especies para sortearlo y tolerarlo (Bradford y Hsiao, 1982).

En especies anuales con metabolismo fotosintético tipo C3 se han descrito los principales cambios fisiológicos y bioquímicos causados por el déficit de agua. La información más abundante se refiere a procesos en las hojas, en relación con la fotosíntesis, acumulación y degradación de metabolitos, alteración de las membranas celulares y actividades enzimáticas ligadas a ellas (Hare y Cress, 1997; Steudle, 2000; Wu y Cosgrove, 2000). Sin embargo, existe menos información de especies que efectúan el metabolismo fotosintético de las crasuláceas (MAC).

Para sectores amplios de la población de México, el nopal (*Opuntia ficus-indica*) es un cultivo importante porque satisface parte de sus necesidades alimentarias, es fuente de ingreso económico y prospera en lugares donde la escasa lluvia no permite el desarrollo de otros cultivos hortícolas. No obstante su adaptabilidad y resistencia a sequía, los cambios fisiológicos del nopal provocados por la falta de agua se han estudiado relativamente poco.

Von Willert *et al.* (1992) caracterizaron la sequía en plantas MAC. La aplicación de viento seco y

temperaturas altas durante un periodo corto forzó a las plantas a generar respuestas rápidas. La condición de estrés se presentó a cualquier hora del día o de la noche y duró varias horas o días. En la planta hubo reducción nocturna de la acumulación de ácido málico, entre 60 y 80 %, debido a la casi nula incorporación de CO₂ causada a su vez por una modificación de la actividad de la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPCasa) y por el cierre de estomas. Estos mismos autores indujeron la pérdida paulatina de agua en el suelo para generar una sequía progresiva durante un periodo prolongado, con lo cual las plantas se adaptaron gradualmente al estrés. Esta adaptación involucró modificaciones bioquímicas y cambios morfológicos, como cierre de estomas, disminución de la acumulación de CO₂, caída de la actividad de la PEPCasa, reducción de la síntesis de ácido málico, detención del crecimiento, reducción de la superficie foliar (caída de hojas y otros órganos), y traslocación del agua del tejido medular (tejido suculento) al tejido clorenquimatoso.

De acuerdo con Nobel (1988), las raíces de las cactáceas tienden a ser someras; la mayoría se localiza en los primeros 20 cm del suelo y generalmente representan de 7 a 14 % del peso seco de la planta. El bajo peso seco de las raíces refleja la alta eficiencia de uso de agua de las plantas MAC, en comparación con las plantas de metabolismo tipo C3 y C4. Al respecto, Nobel (1994) señala que las plantas MAC necesitan menos tejido en la raíz para absorber agua. Sin embargo, durante la sequía la tasa de pérdida de agua podría llegar a ser excesiva, si no fuera por los mecanismos de adaptación de las plantas MAC, como: 1) Muerte de raíces, especialmente las raíces laterales más delgadas (Nobel, 1988), y 2) Disminución de la conductividad hidráulica de la raíz, debido parcialmente al colapso de las células del córtex (North y Nobel, 1992) por la deshidratación de las capas de la peridermis suberizada de la raíz, cuando el periodo de sequía se prolonga. Esta deshidratación induce la entrada de aire en el xilema, efecto denominado embolismo, y se interrumpe la continuidad del agua y, por tanto, el flujo en el xilema. Después de que las raíces se hidratan, el embolismo se revierte y pueden desarrollarse nuevas raíces y restaurarse la capacidad de captación de agua del sistema radical (Huang y Nobel, 1993).

Según Aguilar (1991), el engrosamiento y el crecimiento longitudinal y transversal de los cladodios de nopal (*Opuntia* spp.) disminuyen cuando las plantas permanecen por periodos prolongados en sequía. Esto ocasiona que la coloración verde clara del cladodio cambie a verde oscura, que se endurezca y forme la capa cerosa en su superficie externa. Este autor también señala que si el déficit de agua en el suelo se agudiza, se genera una disminución del crecimiento y arrugamiento severo del cladodio. El arrugamiento de los tejidos se debe a la traslocación del agua

del tejido medular al tejido clorenquimatoso; si se incrementa la falta de agua ocurre abscisión de órganos y el cambio de la coloración verde oscura a amarillenta (Von Willert *et al.*, 1992). La fluorescencia puede usarse como herramienta para obtener información acerca del estado fisiológico del aparato fotosintético, y la reproducibilidad de la respuesta será indicadora del daño o alteración (Smillie y Hetherington, 1990).

Se han identificado algunos mecanismos de resistencia a la sequía en plantas MAC; el más común es la absorción o penetración a través de areolas (Aguilar, 1991) e hidátodos (Tolken, 1977) del agua que se condensa (niebla y vapor de agua) durante la madrugada. La penetración de agua se incrementa cuando hay días nublados, lo que fue comprobado mediante aspersiones de soluciones coloreadas a tallos y hojas; la solución coloreada penetró los tejidos sin cambiar de tonalidad, vía areolas e hidátodos. La penetración de agua también se puede dar a través de los estomas y la epidermis (Von Willert *et al.*, 1992).

El objetivo del presente trabajo fue comparar los efectos del riego y sequía, en los niveles de clorofila, la fluorescencia inducida por la luz en la clorofila, la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCasa) y el transporte fotosintético de electrones.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se hizo en un invernadero sin control de temperatura y humedad, del Colegio de Postgraduados, ubicado en Chapingo, México. Las temperaturas medias en el invernadero oscilaron entre 27 °C durante el día y 15 °C durante la noche, y la intensidad lumínica promedió 60 % con respecto a la externa (el máximo flujo de fotones fotosintéticamente activos a la intemperie de un día de mayo, sin nubosidad, fue casi 2000 µmol fotones m⁻² s⁻¹).

Se utilizaron cladodios de nopal variedad 'Tlaconopal' la cual tiene bajo contenido de fibra, sin sabor ácido y casi sin espinas (García, 1972). Se emplearon cladodios de seis meses de edad, los que se plantaron en macetas de 25 cm de diámetro por 40 cm de fondo. Cada maceta contenía aproximadamente 3 kg de suelo franco.

Se aplicaron los siguientes tratamientos por un periodo de 180 d: 1) Sin déficit: el suelo se mantuvo con 12.5 % de agua (-8 bar) (equivalente a 50 % de capacidad de campo, de acuerdo con Ortiz, 1977) durante todo el experimento; 2) 'Déficit intermedio': se aplicaron dos riegos a capacidad de campo, uno en el momento de la plantación y el otro 60 d después; 3) 'Déficit severo': sin aplicación de agua durante 180 d; sin embargo, 20 d después de que el experimento se estableció las plantas del Tratamiento 3

sufrieron una severa infección de *Dactylopius coccus* (cochinilla) por lo que se eliminaron. El experimento se reinió en la forma descrita arriba, pero en el Tratamiento 3 los cladodios se plantaron en bandeja con agrolita, sin suministro de agua a lo largo de 180 d.

Cuantificación de clorofilas

Se utilizó la técnica descrita por Bruinsma (1961), que consiste en macerar 200 mg de tejido fresco en presencia de 5 mL de acetona 80 % en agua (v:v) y centrifugar a 2096 g durante 4 min. El sobrenadante se aforó a 10 mL con acetona a 80 % y se cuantificó la absorbancia a 663 y 645 nm, en un espectrofotómetro Spectronic 210D (Milton Roy).

La concentración (mg L⁻¹) de las clorofilas *a*, *b* y *a+b* se calculó con las siguientes ecuaciones (Bruinsma, 1961): Clorofila *a* = 12.7 x A₆₆₃ - 2.7 x A₆₄₅; Clorofila *b* = 22.9 x A₆₄₅ - 4.7 x A₆₆₃; Clorofila *a+b* = 27.8 A₆₅₂.

Donde A es la absorbancia a la longitud de onda indicada. La concentración (mg L⁻¹) también se calculó en mg por 100 g de tejido fresco, con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración (mg en 100 g de tejido)} = \frac{CV 100}{1000P}$$

Donde: C = Concentración (mg L⁻¹); V = Volumen aforado (mL); P = Peso de la muestra (g); y 1000 = Factor de conversión de mg L⁻¹ a mg mL⁻¹.

Determinación de la actividad enzimática

La actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCasa) se midió con una adaptación de los métodos descritos por Arnozis y Barneix (1989), Coombs (1988), Champony *et al.* (1983), Deroche *et al.* (1983) y Price y Donkin (1982). En este estudio no se midió la actividad de la enzima *in vivo* sino su actividad potencial *in vitro*, en presencia de fosfoenolpiruvato (PEP) y ácido carbónico (HCO₃) como sustratos. El principio básico de la determinación consiste en acoplar la actividad de la PEPCasa a la de la malato deshidrogenasa (MDH), la cual emplea como sustrato el producto de la PEPCasa (oxaloacetato, OAA), y la coenzima nicotin adenin dinucleótido reducido (NADH) para formar malato, que es el producto final de la reacción. La actividad de la enzima se calculó con el consumo del NADH reducido. La composición del medio de reacción, concentración, volumen y orden en que se agregaron los componentes, se presentan en el Cuadro 1. Para llevar a cabo el ensayo, se cortaron al azar trozos con cinco repeticiones (1 x 1 cm) de todo el cladodio (al considerar cada cladodio como una repetición); de ellos se separaron el

clorénquima y el parénquima o médula, con ayuda de un microscopio estereoscópico, y se analizaron por separado. Todas las muestras fueron procesadas inmediatamente.

Cuadro 1. Concentración, volumen y orden en que se agregan los constituyentes del medio de reacción de la enzima PEPCasa.

Orden de adición	Componente [†]	Concentración	Volumen (uL)	Tratamiento	Testigo
1	TRIS-HCl pH 8.25	100 mM	1400		1700
2	MgCl ₂	20 mM	300		300
3	NaHCO ₃	5 mM	300		300
4	MDH	5 unidades	200		200
5	NADH	2 mg mL	300		300
6	PEP	2 mM	300	0	
7	Extracto vegetal		200		200

[†] MDH = Enzima malato deshidrogenasa; NADH = Coenzima nicotin adenin dinucleótido reducido; PEP = fosfoenolpiruvato.

Se pesó 0.5 g de tejido y se trituró con 5 mL de una solución (pH 7.8) de TRIS-HCl (100 mM) y mercaptoetanol (12 mM) a 4 °C, sin inhibidores de proteasas. Al respecto, Rajagopalan *et al.* (1993) indicaron que la adición de fenilmetil sulfonil fluoruro (un inhibidor de proteasas) al medio de aislamiento de la PEPCasa de plantas C4 no modificó la desactivación en oscuridad, por lo que en este proceso no ocurre degradación proteolítica de la enzima.

El producto de la trituración se recibió en tubos sumergidos en hielo e inmediatamente se centrifugó a 1677 g durante 5 min. Para determinar estas condiciones del ensayo se efectuaron pruebas previas con velocidades de 3144 y 5241 g y tiempos de 10 y 15 min, pero sin obtener mayor cantidad de extracto. Después de agregar el extracto vegetal a la mezcla, se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm; a este valor se le denominó absorbancia de tiempo inicial (t₀). Las muestras se incubaron 10 min en baño maría a 30 °C, y se registró la absorbancia nuevamente; este valor correspondió al tiempo final (t₁). La diferencia entre la absorbancia de ambos tiempos (t₀-t₁) dependió de la cantidad de NADH consumido en la reacción.

Cálculo de la actividad potencial de la PEPCasa

La actividad se calculó en forma indirecta, con la cuantificación del consumo de NADH, mediante la siguiente ecuación (Arnozis y Barneix, 1989; Coombs, 1988):

$$\mu\text{moles de NADH oxidados (min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{)} = \frac{(A)(VE)(VTE)}{6.22(t)(v)(g)}$$

Donde: A = Absorbancia en el tiempo t₀ menos absorbancia en el tiempo t₁; VE = Volumen total del ensayo (mL); VTE = Volumen total de extracción (mL); t = Intervalo de tiempo (min); v = Alícuota del extracto en el ensayo (mL); g = Gramos de tejido fresco; y 6.22 = Coeficiente de extinción del NADH.

Transporte fotosintético de electrones (liberación de O₂)

Para evaluar la velocidad del transporte fotosintético de electrones se utilizó un oxímetro-fluorómetro para fase gaseosa (Hansatech LC1, Inglaterra), equipado con un electrodo tipo Clark y fuente de iluminación integrada, constituida por diodos (para evitar el calentamiento proporcionado por otras fuentes de luz) que suministran intensidad luminosa con un máximo en 635 nm (Walker, 1987).

Para esta determinación se cosecharon los cladodios; de cada uno se extrajo un segmento de 3.5 cm de diámetro, del cual se separó el parénquima y el clorénquima. Ambas partes se colocaron independientemente en la cámara de lectura (módulo detector del oxígeno CB1D) del oxímetro y se iluminó durante 3 o 4 min. Los cambios de la concentración de oxígeno en el medio gaseoso donde se encontraba el tejido, se registraron con un graficador (LKB Bromma/2210) con velocidad de corrimiento del papel de 0.2 mm s⁻¹. Para que el transporte fotosintético de electrones no fuera inhibido indirectamente por la falta de CO₂, durante el periodo de iluminación se colocaron círculos de papel filtro humedecidos con 0.2 mL de carbonato de sodio 1M sobre el tejido. Así se evitó mojar el tejido directamente, y la concentración de CO₂ en el interior de la cámara se mantuvo aproximadamente en 1 %. Antes de las evaluaciones, el oxímetro se calibró con 0.1 mL de aire y los cálculos se realizaron al considerar que el aire contiene 21 % de oxígeno a 20 °C, lo que equivale a 0.873 μmol de O₂ por 0.1 mL de aire. Para el cálculo de la tasa de liberación de oxígeno, se relacionó la longitud del trazo y el área de la muestra utilizada (Walker, 1987).

Fluorescencia de la clorofila

Para esta evaluación se utilizó el oxímetro fluorómetro para fase gaseosa (Hansatech LC1), equipado con fuente de iluminación integrada que emite luz con longitud de onda de 635 nm (Walker, 1987). Los cladodios a evaluar se llevaron del invernadero al laboratorio y se mantuvieron en la penumbra hasta el inicio del ensayo. Con un sacabocado se tomaron, al azar, porciones circulares de 0.5 cm de diámetro. Posteriormente, se separó el clorénquima del parénquima, y cada tejido se colocó por separado en la cámara del fluorómetro, y se mantuvieron ambos en oscuridad absoluta por 3 min más. El registro de la fluorescencia se hizo después de iluminar durante 1 min el tejido, con una intensidad luminosa de 600 μmol fotones m⁻² s⁻¹. La fuente luminosa fue la del propio fluorómetro y la señal se registró en un graficador (LKB Bromma 2210), con una velocidad de corrimiento de papel de 5 mm s⁻¹.

El experimento se estableció con un diseño completamente al azar y cuatro repeticiones. La unidad experimental fue una maceta que contenía un cladodio. Las variables se sometieron a análisis de varianza y comparaciones múltiples de medias con la prueba de Tukey, mediante el paquete estadístico SAS (SAS, 1988).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El déficit de agua severo (Tratamiento 3) redujo significativamente la concentración de los pigmentos fotosintéticos en el tejido clorenquimatoso, ya que las clorofilas crecieron a 57.6 % (a+b), 65.8 % (a) y 68.6 % (b) con respecto al tratamiento que se mantuvo con riego (Tratamiento 1) (Cuadro 2). La disminución de la concentración de la clorofila *a* como resultado del déficit severo de agua, coincide con lo señalado por Demming *et al.* (1988), quienes encontraron que la clorofila *a* disminuye cuando se impone un estrés por sequía, y es más evidente cuando el déficit de agua se agudiza; en ese momento también inicia la disminución de la clorofila *b*. Al parecer, la disminución de los niveles de clorofilas es una respuesta común al estrés por sequía (Ludwing y Matthews, 1993). La disminución de las clorofilas en el clorénquima con el 'déficit severo' de agua, contrastó con el incremento significativo de las clorofilas *a+b* (14.2 %) y *a* (36.5 %) cuando el déficit de agua fue intermedio (Cuadro 2).

Cuadro 2. Contenido de clorofilas (mg por 100 g de tejido fresco) en clorénquima y parénquima de *Opuntia ficus-indica* var. 'Tlaconopal', a seis meses de aplicados los tratamientos.

Tipo de clorofila	Sin déficit (T1)	Déficit intermedio (T2)	Déficit severo (T3)	T3/T1 (%)
Clorénquima				
Clorofila <i>a+b</i>	19.6 ab	22.4 a	11.3 c	57.6
Clorofila <i>a</i>	8.2 b	11.2 a	5.4 c	65.8
Clorofila <i>b</i>	6.7 a	6.9 a	4.6 b	68.6
Parénquima				
Clorofila <i>a+b</i>	9.1 a	7.6 b	5.5 c	60.4
Clorofila <i>a</i>	4.2 a	3.8 a	2.7 b	64.2
Clorofila <i>b</i>	3.4 b	4.4 a	2.6 c	76.4

Letras iguales en cada hilera indican promedios estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

En la literatura no se establece con precisión qué se considera realmente un déficit de agua en nopal (Huang y Nobel, 1993) ni en plantas MAC (Von Willert *et al.*, 1992). Pero en el estudio que aquí se describe el déficit de agua intermedio redujo el contenido de pigmentos fotosintéticos del parénquima, mientras que en el clorénquima indujo un incremento significativo ($P \leq 0.05$) del contenido de clorofila *b* y una disminución de la clorofila *a+b*, sin afectar el contenido de clorofila *a*. Se puede plantear, de

acuerdo con estos resultados, que biológicamente es más importante la presencia de la clorofila en el clorénquima que en el parénquima.

Las variables de fluorescencia de la clorofila (fluorescencia máxima, variable e inicial) en el clorénquima y en parénquima fueron poco afectadas por el déficit intermedio de agua (Cuadro 3). En cambios el déficit severo indujo una disminución significativa en las tres variables de la fluorescencia, en ambos tejidos del cladodio. La fluorescencia inicial fue la más afectada, pues en el clorénquima disminuyó en 46 % y en el parénquima en 52 % (Cuadro 3). Estos resultados apoyan la idea de que el déficit de agua afecta primero al parénquima en el nopal, porque este tejido transfiere su humedad al clorénquima.

*Cuadro 3. Fluorescencia máxima, variable e inicial de la clorofila (unidades relativas), inducida con una intensidad luminosa de 600 $\mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en clorénquima y parénquima de *Opuntia ficus-indica* var. 'Tlaconopal', a los seis meses de aplicados los tratamientos.*

Tejido	Sin déficit (T1)	Déficit intermedio (T2)	Déficit severo (T3)	T3/T1 (%)
Fluorescencia máxima (Fm)				
Clorénquima	7.0 a	7.5 a	4.8 b	68.5
Parénquima	6.9 a	6.1 b	3.8 c	55.1
Fluorescencia variable (Fv)				
Clorénquima	4.3 a	4.2 a	3.2 b	74.4
Parénquima	4.3 a	3.2 b	2.5 c	58.1
Fluorescencia inicial (Fo)				
Clorénquima	2.8 a	2.9 a	1.5 b	53.6
Parénquima	2.5 a	2.8 a	1.2 b	48.0

Letras iguales en cada hilera indican promedios estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

Se infiere también que la fluorescencia inducida por luz en la clorofila, es una variable independiente de la concentración de la clorofila en el tejido. Por ello, aunque el contenido de clorofila en el clorénquima del nopal es cerca del doble del parénquima (Cuadro 2), los valores de los tres parámetros de la fluorescencia tuvieron magnitud similar entre ambos tejidos (Cuadro 3). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que estas alteraciones en los valores de la fluorescencia sean un resultado de la combinación de alteraciones del contenido de clorofila, las reacciones fotoquímicas y las reacciones bioquímicas de la fotosíntesis en los dos tejidos.

La energía absorbida por la clorofila puede utilizarse en las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis, disiparse como calor, generar radicales libres, ser transferida a otras moléculas por resonancia inductiva, o emitirse como fluorescencia (Hipkins y Baker, 1986). Aquí sobresalió el hecho de que la sequía intermedia afectara poco al parénquima y no afectara al clorénquima. Este resultado puede tomarse como evidencia de que un déficit moderado de

agua no produce daño severo en la maquinaria fotosintética del nopal, o bien, que el nopal posee una maquinaria fotosintética tolerante al déficit de agua, ya que en condiciones menos severas de estrés hídrico las plantas de especies anuales con metabolismos fotosintéticos tipos C3 y C4 son dañadas drásticamente (Peña-Valdivia, 1994; Irízar-Garza y Peña-Valdivia, 2000; Irízar-Garza *et al.*, 2000).

Santrucek *et al.* (1992) concluyeron que cuando se modifica el contenido de clorofillas *a* y *b*, las plantas C3 presentan variaciones en los valores de la fluorescencia inicial y máxima. En plantas MAC también se han registrado cambios en la fluorescencia de la clorofila ante variaciones en el contenido de agua del suelo, ya que también modifica el porcentaje de agua en los tejidos, y produce un desbalance de la relación de agua entre simplasto y apoplasto, con el consecuente daño al aparato fotosintético (Von Willert *et al.*, 1992). Existe la posibilidad de que no se haya inducido una sequía tan severa como se establece en la literatura (Huang y Nobel, 1993; Von Willert *et al.*, 1992).

La caída de las fluorescencias máxima y variable en los dos tejidos del cladodio de nopal sometidos a déficit severo de agua, puede repercutir en la actividad de transporte fotosintético de electrones (Raya *et al.*, 1997). Schreiber y Berry (1977) observaron que la exposición de las hojas a altas temperaturas modifica la fluorescencia, lo cual puede ocurrir cuando las enzimas que intervienen en el proceso de reducción del carbono se dañan y se inhibe el transporte fotosintético de electrones. Por su parte, Demming *et al.* (1988) y Raya *et al.* (1997) encontraron que cuando las plantas crecen con déficit de agua, disminuyen tanto la fluorescencia máxima como la variable.

Como en el caso de la fluorescencia de la clorofila, únicamente el déficit severo de agua disminuyó significativamente la actividad de la PEPCasa, 20 % en clorénquima, 60 % en parénquima, respecto del Tratamiento 1 (Cuadro 4). La inhibición diferente de la actividad de la PEPCasa tal vez se debió a que tejido medular es el primero que pierde altos porcentajes de agua en condiciones de sequía, lo que ocasiona arrugamiento severo del cladodio y cambios de coloración (Aguilar, 1991), similares a lo documentado en otras plantas MAC (Nobel, 1994).

Las alteraciones fisiológicas relacionadas con las actividades enzimáticas en las plantas MAC, como son el flujo y la utilización de la energía y el flujo de agua e intercambio gaseoso, seguramente están relacionadas con el nivel de estrés que induce el déficit de agua (Von Willert *et al.*, 1992). En condiciones severas de déficit de agua, Acevedo *et al.* (1983) observaron que los cladodios maduros de *O. ficus-indica* cierran los estomas, lo que pudo causar cambios en la actividad de la PEPCasa. Estas

modificaciones fisiológicas también pueden estar relacionadas con las alteraciones en la síntesis de proteínas inducidas por efecto de la sequía (Pustovoitova y Zholkevich, 1992)¹

Cuadro 4. Actividad de la PEPCasa y transporte fotosintético de electrones en clorénquima y parénquima de Opuntia ficus-indica var. 'Tlaconopal', a los seis meses de aplicados los tratamientos.

Tejido	Sin déficit (T1)	Déficit Intermedio (T2)	Déficit severo (T3)
Actividad de PEPCasa ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)			
Clorénquima	0.050 a ⁺	0.052 a	0.040 b
Parénquima	0.025 a	0.027 a	0.010 b
Transporte fotosintético de electrones ($\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{m}^{-2}$)			
Clorénquima	0.300 a	0.275 a	0.212 b
Parénquima	0.027 b	0.028 b	0.068 a

Letras iguales en cada hilera indican promedios estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

En el clorénquima de los cladodios sometidos al Tratamiento 1 en el que se mantuvieron con humedad alta, hubo un transporte fotosintético de electrones 11 veces más activo que en el parénquima. En el Tratamiento 2, el déficit intermedio de agua no afectó el transporte fotosintético de electrones en ninguno de los tejidos, pero la sequía severa del Tratamiento 3 inhibió en 29 % esta actividad fotoquímica del clorénquima y la aumentó en más del doble en el parénquima (Cuadro 4).

Como demuestran los resultados, la mayor actividad del transporte fotosintético de electrones del clorénquima en los cladodios sin restricciones de humedad, confirma que esta actividad fotoquímica ocurre principalmente en los cloroplastos del clorénquima. La estabilidad de la tasa de transporte fotosintético de electrones con la sequía intermedia y su alteración con la sequía drástica, concuerdan con los resultados de la fluorescencia inducida de la clorofila, y confirman que los fotosistemas y el conjunto de reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis en el cladodio permanecen activos después de haber recibido sólo un par de riegos en un periodo de 180 d, al inhibirse sólo una pequeña parte de su actividad después del mismo periodo sin riego.

La disminución de la actividad del transporte fotosintético de electrones en el clorénquima por el déficit drástico de agua también pudo ser efecto de otras alteraciones, como el cierre más prolongado de los estomas (Acevedo *et al.*, 1983) que probablemente alteró las actividades fotosintéticas, especialmente la reducción bioquímica del CO₂ (Peña-Valdivia, 1994; Von Willert *et al.*, 1992). Peña-Valdivia y Aguilar (2001) evaluaron este tipo de estrés en un estudio similar y encontraron que el crecimiento vegeta-

tivo de los cladodios (expresado como área fotosintética caulinar) disminuyó en 27 % con dos riegos durante un lapso de seis meses, y se inhibió totalmente en cladodios sin riego durante el mismo lapso.

CONCLUSIONES

En cladodios de nopal, el clorénquima posee el doble de concentración de clorofila respecto al parénquima. La mayor actividad fotosintética del cladodio, determinada con la actividad de PEPCasa y el transporte fotosintético de electrones, se desarrolla en el clorénquima, aunque ambos tejidos, clorénquima y parénquima, poseen una eficiencia fotoquímica similar (determinada con el índice fluorescencia variable/fluorescencia máxima). La fluorescencia inducida por luz de la clorofila es una variable independiente de la concentración de la clorofila en el tejido. La maquinaria fotosintética del nopal es parcialmente estable al estrés por déficit de agua, por lo que la actividad de la PEPCasa y del transporte fotosintético de electrones se mantuvieron ligeramente estables después de haber recibido sólo un par de riegos en un periodo de 180 d, y sólo se inhibió una pequeña parte de ambas actividades después del mismo periodo en ausencia total de riego.

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo E, I Badilla, P S Nobel (1983) Water relations, diurnal acidity changes, and productivity of a cultivated cactus, *Opuntia ficus-indica*. *Plant Physiol.* 72:775-780.
- Aguilar B G (1991) Experiencias en la producción de nopal (*Opuntia spp.*) en el área de Chapingo México. Sociedad Mexicana de Fitogenética. Germen 10:8-9.
- Arnozis P A, A J Barneix (1989) PEP-Carboxylase activity during ammonium assimilation in wheat plants. *J. Plant Nutr.* 12: 85-94.
- Blum A (1997) Constitutive traits affecting plant performance under stress. In: Developing Drought- and Low N- Tolerant Maize. G O Edmeades, M Bänziger, H.R. Mickelson, C B Peña-Valdivia (eds). Proc. of a Symposium, March 25-29, 1996, CIMMYT, México, D.F.: pp:131-135.
- Bradford K J, T C Hsiao (1982) Physiological responses to moderate water stress. In: *Physiological Plant Ecology, II*. O L Lange, P S Nobel, C B Osmond, H Ziegler (eds). Springer-Verlag. Berlin. pp:263-324.
- Bruinsma I (1961) A comment on the spectrophotometric determination of chlorophyll. *Biochim. Biophys. Acta* 52: 576-578.
- Champigny M L, J D Manjula, F Moutot (1983) Increased phosphoenolpyruvate carboxylase activity in phosphate deficient wheat seedlings does not alter the pattern of photosynthetic carbon assimilation. *Plant Physiol.* 21:1041-1045.
- Coombs J (1988) Metabolismo del carbono. In: *Técnicas en Fotosíntesis y Bioproducción*. J J Coombs D O Hall, S D Long J M Scurlock (eds). Colegio de Postgraduados Editor. Chapingo, México. pp:116-130.
- Demming B, K Winter, A Kruger, C Franz-Christian (1988) Zeaxanthin and the heat dissipation of excess light energy in *Nerium oleander* exposed to a combination of light and water stress. *Plant Physiol.* 87:17-24.
- Deroche M E, E Carayol, E Jolivet (1983) Phosphoenolpyruvate carboxylase in legume nodules. *Physiol.* 21:1075-1081.

¹ Pustovoitova T N, V N Zholkevich (1992) Main trends in the study of the effect of drought on physiological processes in plants. *Plant Breed. Abst.*

- García V A (1972)** Cultivo del Nopal Verdura. Libro publicado por el Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 8 p.
- Hare P D, W A Cress (1997)** Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Reg.* 21:79-102.
- Hipkins M F, N R Baker (1986)** Photosynthesis, energy transduction. In: *Photosynthesis*. M F Hipkins, N R Baker (ed.). IRL Press Oxford, Eng. pp:51-100.
- Huang B, P S Nobel (1993)** Hydraulic conductivity and anatomy along lateral roots of cacti: changes with soil water status. *New Phytol.* 123:499-507.
- Irizar-Garza M B G, C B Peña-Valdivia (2000)** Chlorophyll and photosynthetic oxygen evolution in water-stressed triticale (*Tricosecale wittmack*) and wheat (*Triticum aestivum* L.) during vegetative stage. *Cereal Res. Comm.* 28 (4):387-394.
- Irizar-Garza M B G, C B Peña-Valdivia, A Salazar-Zazueta (2000)** Respuestas fotoquímicas y de los estomas al recurso hídrico de dos cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Inf. Tecnol.* 11(3):31-35.
- Ludwing G, M A Matthews (1993)** Reversibility of drought induced chloroplast degradation in maize. *Plant Physiol.* 102:155-158.
- Nobel P S (1988)** *Environmental Biology of Agaves and Cacti*. Cambridge University Press, Cambridge. pp:166-270.
- Nobel P S (1994)** *Remarkable Agaves and Cacti*. Oxford University Press, New York. pp:89-126.
- North G B, P S Nobel (1992)** Drought-induced changes in hydraulic conductivity and structure in roots of *Ferocactus acanthodes* and *Opuntia ficus-indica*. *New Phytol.* 120:9-19.
- Ortiz V B (1977)** Edafología. Libro publicado por la Escuela Nacional de Agricultura. Chapingo, Méx. pp:143-160.
- Peña-Valdivia C B (1994)** Functional effects of mild water stress on young *Phaseolus vulgaris* L. plant. *Plant Physiol. Life Sci. Adv.* 13:125-134.
- Peña-Valdivia C B, G Aguilar B (2001)** Respuestas bioquímico-fisiológicas de *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller a la sequía. *Rev. Quad. Bot. Amb. Appl.* 10:97-103.
- Price D N, M E Donkin (1982)** A demonstration of carboxylase enzyme activity in pea pod and seeds tissues. *Biochem. Educ.* 10:13-15.
- Rajagopalan A V, M Tirumala, A S Raghavendra (1993)** Patterns of phosphoenolpyruvate carboxylase activity and cytosolic pH during light activation and dark deactivation in C₃ and C₄ plants. *Photos. Res.* 38:51-60.
- Raya P J C, C B Peña-Valdivia, G O Edmeades (1997)** Procesos bioquímico-fisiológicos del maíz involucrados en la tolerancia a sequía. In: *Developing Drought- and Low N- Tolerant Maize*. G O Edmeades, M Bänziger, H R Mickelson, C B Peña-Valdivia (eds). *Proc. of a Symposium*, March 25-29, 1996, CIMMYT, México, D.F. pp:169-176.
- Santrucek K, P Siffel, M Lang, H K Lichtenthaler, C Schindler, H Synkova, V Konecna, K Szabo (1992)** Photosynthetic activity and chlorophyll fluorescence parameters in aurea and green forms of *Nicotiana tabacum*. *Photosynthetica* 27:529-543.
- SAS (1988)** *SAS/STAT Users Guide*. Release 6.03 SAS Institute. Carry North Caroline. U.S.A.
- Schreiber U, J P Berry (1977)** Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in intact leaves correlated with damage of the photosynthetic apparatus. *Planta* 136:233-238.
- Smillie R M, S E Hetherington (1990)** Screening for stress tolerance by chlorophyll fluorescence. In: *Techniques in Plant Science*. Y Hashimoto, P J Kramer, H Nonami, R B Strain (eds). Academic Press, U S A. pp:229-233.
- Steudle E (2000)** Water uptake by roots: effect of water deficit. *J. Exp. Bot.* 51:1531-1542.
- Tolken H R (1977)** A Revision of the Genus *Crassula* in Southern Africa. Contributions from the Bolus Herbarium. Cambridge University Press. UK. pp:1-200.
- Von Willert D J, B M Eller, M J A Werger, E Brinckmann, H D Ihlenfeldt (1992)** Life strategies of succulents in deserts: with special reference to the Namib desert. Cambridge University Press. Cambridge. pp:155-275.
- Walker D (1987)** The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. Oxygraphics Limited, U S A. 203 p.
- Wu Y, D J Cosgrove (2000)** Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *J. Exp. Bot.* 51:1543-1553.