

# ANÁLISIS DE PIGMENTOS, PEROXIDASA, PROLINA Y PROTEÍNAS DE TRES ESPECIES DE *Paulownia* BAJO ESTRES HÍDRICO

## ANALYSIS OF PIGMENTS, PEROXIDASE, PROLINE AND PROTEINS OF THREE *Paulownia* SPECIES UNDER WATER STRESS

José Manuel Llano Sotelo<sup>1</sup> y Lilia Alcaraz Meléndez<sup>2</sup>

### RESUMEN

Los árboles del género *Paulownia* son de rápido crecimiento y tienen importancia económica en Asia como materia prima de uso común en la elaboración de muebles, instrumentos musicales y cercos, lo que ha despertado interés por cultivarlos en diferentes ambientes. Con el objetivo de evaluar la tolerancia al estrés hídrico se eligieron tres especies, *P. imperialis*, *P. fortunei* y *P. elongata*, porque son las que se utilizan en China con mayor frecuencia en la reforestación y en la industria maderera. Se realizaron análisis bioquímicos de las hojas para determinar los siguientes componentes: como pigmentos, a las clorofilas total, a y b;  $\beta$ -caroteno, violaxantina y luteína; las enzimas peroxidasa y prolina, así como proteínas solubles, insolubles y totales en tres diferentes condiciones de humedad del suelo, bajo dos condiciones ambientales, campo e invernadero, entre los cuales se observaron diferencias significativas; destaca un incremento del contenido de pigmentos y peroxidasa, y una disminución de las proteínas y prolina en el ambiente controlado, principalmente. Al evaluar la respuesta al estrés hídrico entre las especies se concluyó que *P. imperialis* y *P. elongata* son más tolerantes que *P. fortunei*, debido a su mayor contenido de prolina, mas proteínas totales y solubles, indicadores de una mejor tolerancia a condiciones de estrés.

**Palabras clave:** Aminoácidos, luteína, *Paulownia elongata* S. Y. Hu, *Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl., *Paulownia imperialis* Siebold & Zucc., peroxidasa, violaxantina.

### ABSTRACT

*Paulownia* trees are fast growing and are economically important in Asia as raw material regularly used for furniture, musical instruments, fences, etc., which rose some interest in their cultivation in different environments. In order to assess water stress tolerance, three of these species, *P. imperialis*, *P. fortunei* and *P. elongata*, were selected as they are the most commonly used in reforestation and wood industry in China. Biochemical analyses were performed in leaves, to determine the following elements: pigments (total, a and b chlorophyll;  $\beta$ -carotene, violaxanthin; lutein), peroxidase, proline, total, soluble and insoluble proteins, under three moisture soil concentrations and two environments, field and greenhouse, the latter of which revealed significant differences between them; there is an increment in pigment and peroxidase content and a decrease in protein and proline content, mainly in the greenhouse environment. When water stress was assessed among species, it was concluded that *P. imperialis* and *P. elongata* are more tolerant than *P. fortunei* because of their higher content of proline, total and soluble proteins, which are major tolerance markers in stress conditions.

**Key words:** Amino acids, lutein, *Paulownia elongata* S. Y. Hu, *Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl., *Paulownia imperialis* Siebold & Zucc., peroxidase, violaxanthin.

Fecha de recepción: 16 de mayo de 2011.

Fecha de aceptación: 21 de febrero de 2012.

---

<sup>1</sup>Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad de Sonora.

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Correo-e: lalcaraz04@cibnor.mx

## INTRODUCCIÓN

Los árboles del género *Paulownia* son de rápido crecimiento y producen madera de buena calidad, por lo que en China este material es de uso común en la elaboración de muebles, instrumentos musicales, cercos (Yao, 1990). Estas características han despertado el interés por cultivarlos en diferentes ambientes, incluso aquellos con problemas de sequía.

El estrés hídrico en las plantas se manifiesta con cambios a nivel celular, fisiológico y del desarrollo (Larcher, 1995). En el primero se protegen las estructuras celulares con las proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA) o con un ajuste osmótico, por medio de la síntesis de osmolitos, como prolina, betaina, sacarosa, pinitol y aldosa (Bray, 1993). Desde el punto de vista fisiológico se presenta el cierre de estomas, cambios en el crecimiento de raíz, tallo y hojas (Parsons, 1987) e inhibición de la fotosíntesis, como resultado de la disminución del factor de acoplamiento del adenosin trifosfato (ATP) y la ATP sintetasa (Tezara *et al.*, 1999).

En este contexto, la ejecución de un estudio sobre el análisis bioquímico para conocer la respuesta de *Paulownia elongata* S. Y. Hu, *Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl., *Paulownia imperialis* Siebold & Zucc. al estrés hídrico es de suma importancia. Existen registros de la acumulación de prolina en condiciones de estrés hídrico. Por ejemplo, Handa *et al.* (1983) la relacionan con la reducción en el contenido de las proteínas solubles en las células. Fukutoku y Yamada (1984) lo hacen con la síntesis de la misma proteína procedente de la degradación de proteínas solubles de la hoja, en cambio, Gibon *et al.* (2000) lo asocian con la pérdida de clorofilas y la disminución de la actividad mitocondrial. Stewart *et al.* (1977) refieren que el exceso de prolina está relacionada con la inhibición de la formación de ácido glutámico y una menor oxidación de prolina. Así, el objetivo del presente trabajo fue investigar la tolerancia al estrés hídrico de tres las especies de *Paulownia* anteriormente indicadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de humedad del suelo en campo e invernadero.- Las plantas pertenecen al Campo Experimental del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, en La Paz, B.C.S. Con base en trabajos anteriores (Llano- Sotelo *et al.*, 2010), en los cuales se determinó el potencial hídrico del suelo, se probó la capacidad de campo de la siguiente manera: testigo ( $25.9 \pm 1.4\%$ ), humedad intermedia ( $12.7 \pm 1\%$ ) y humedad baja en el suelo ( $9.3 \pm 1.8\%$ ). Una vez sometidas las plantas a estas condiciones, se tomaron muestras de cinco hojas por individuo ( $n= 4$ ) de cada una de las tres especies de *Paulownia*.

## INTRODUCTION

*Paulownia* trees are fast growing and produce high quality wood, which is of regular use in furniture, musical instruments, fences, etc. (Yao, 1990). This has aroused interest in their cultivation in different environments, even in those with drought problems.

Water stress in plants is shown by changes at a cellular, physiological and development levels (Larcher, 1995). In the first one are protected cell structures with the abundant proteins in late embryogenesis (LEA) or with an osmotic adjustment, by the synthesis of osmolites such as proline, betaine, saccharose, pinitol and aldose (Bray, 1993). From a physiological viewpoint, stomata close, there is growth in root, stem and leaves (Parsons, 1987) and photosynthesis inhibition, as a result of the reduction of the coupling factor of adenosine triphosphate (ATP) and adenosine triphosphate synthase (Tezara *et al.*, 1999).

In this context, a biochemical study of the response of *Paulownia elongata* S. Y. Hu, *Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl., *Paulownia imperialis* Siebold & Zucc. to water stress is very important. There are records of proline accumulation under water stress. For example, Handa *et al.* (1983) relate it with the reduction of soluble protein content in cells. Fukutoku and Yamada (1984) do it in regard to the synthesis of the same protein that comes from the degradation of soluble proteins of the leaf; in contrast, Gibon *et al.* (2000) link it with chlorophyll loss and the reduction of mitochondrial activity. Stewart *et al.* (1977) refer that proline excess is related with the inhibition of glutamic acid formation and a lower proline oxidation. Thus, the aim of the actual paper was to study the water stress tolerance of the above-mentioned *Paulownia* species.

## MATERIALS AND METHODS

Plant material and soil moisture in field and greenhouse.- Plants belong to the Northwestern Biologic Research Center Experimental Station located at La Paz, Baja California State. Based upon former studies (Llano- Sotelo *et al.*, 2010) in which soil water potential was determined, field capacity was tested in the following way: control ( $25.9 \pm 1.4\%$ ), intermediate moisture ( $12.7 \pm 1\%$ ) and low soil moisture ( $9.3 \pm 1.8\%$ ). Once plants were submitted to these treatments, samples of five leaves per individual ( $n= 4$ ) of the three *Paulownia* species were taken off.

Greenhouse experiments were made in the Vegetal Biotechnology Laboratory of the same Center. Plants were sown in 2 L black plastic bags with a mixture of two parts of peat (peat moss, Pro- Mix) plus one of sand; they were kept under continuous fluorescent light, at  $61.1 \pm 15.2 \mu \text{mols}^{-1}\text{m}^{-2}$  and  $23.4 \pm 2^\circ\text{C}$ , and relative humidity of  $72.2 \pm 4.6\%$ . Soil moisture was at field capacity, in control,  $47.8\% \pm 2.2$ , intermediate,  $15.7\% \pm 0.8$  and low,  $8.2\% \pm 0.6$ . Samples were taken from five leaves per individual ( $n= 9$ ) and species.

Los experimentos en invernadero se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del mismo Centro. Las plantas se sembraron en bolsas de plástico negro de 2 L con una mezcla de dos partes de turba (*peat moss*, Pro-Mix) y una parte de arena; se mantuvieron con luz fluorescente continua a una intensidad de  $61.1 \pm 15.2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ . La temperatura fue de  $23.4 \pm 2^\circ\text{C}$  y la humedad relativa de  $72.2 \pm 4.6\%$ . La humedad en el suelo permaneció a capacidad de campo, en el testigo fue de  $47.8\% \pm 2.2$ , la intermedia de  $15.7\% \pm 0.8$  y la baja de  $8.2\% \pm 0.6$ . Se tomaron muestras de cinco hojas por individuo ( $n=9$ ) y especie.

Análisis de pigmentos. La extracción de los pigmentos se realizó con acetona grado HPLC (100%), a partir de muestras de 2 mg de hojas liofilizadas. Los extractos permanecieron 24 h a  $-20^\circ\text{C}$ , después se centrifugaron a 4,000 rpm, 15 min a  $5^\circ\text{C}$ . Los extractos se pasaron por un filtro de fibra de vidrio de poro de  $0.45 \mu\text{m}$ . El sobrenadante se recuperó y guardó en un tubo Eppendorf y se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$ , en oscuridad.

Se identificaron y cuantificaron clorofilas *a*, *b*, total,  $\beta$ -caroteno, violaxantina y luteína, de acuerdo al método descrito por Vidussi *et al.* (1996); mediante el método de cromatografía líquida de alta presión (HPLC, Hewlett Packard, modelo 1100). Se tomaron  $20 \mu\text{L}$  y se inyectaron en el equipo de cromatografía. Para la separación de los pigmentos se empleó una fase móvil conjugada con dos soluciones: la solución A correspondió a una mezcla de metanol, acetato de amonio 1 N en una proporción 70:30 v/v y la solución B de metanol grado HPLC 100%. La fase estacionaria fue una columna Hypersil C8, de 10 cm de longitud, 0.45 cm de diámetro lleno con partículas de sílice de  $5 \mu\text{m}$ . El detector fue un arreglo de diodos con un intervalo de longitud de onda de 190-900 nm y capacidad para determinar cinco longitudes de onda fijas. La cuantificación se llevó a cabo con una curva de calibración en concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ng/mL del estándar.

Análisis de prolina. Por medio del método de Bates *et al.* (1973), se tomaron 50 mg por muestra liofilizada, los cuales se molieron con 5 mL de ácido sulfosalicílico acuoso (3% w/v) en un homogenizador Polytron, Willems®. Las muestras se centrifugaron en una microcentrífuga Sanyo Hawk/05, a 1,200 rpm, 10 min y a  $5^\circ\text{C}$ . Dos mililitros del filtrado se colocaron en un tubo de ensayo. El blanco consistió en ácido sulfosalicílico al 3%. A cada tubo de ensayo se le agregaron 2 mL de ácido acético glacial y 2 mL de ninhidrina ácida. La mezcla fue homogenizada con un mezclador Vortex (Modelo K-550 G, Scientific Industries). Los tubos de ensayo se pusieron en Baño María por una hora. Se finalizó la reacción con hielo, hasta bajar la temperatura; cuando esta alcanzó la temperatura ambiente, se extrajo la mezcla con 4 mL de tolueno y se colocó en un Vortex por 20 s. El sobrenadante se tomó con pipeta Pasteur y se leyó a 520 nm con el espectrofotómetro Spectro master modelo 415 de Fisher Scientific.

Pigment analysis. The extraction of pigments was made with HPLC (100%) acetone from 2 mg samples of lyophilized leaves. Extracts remained for 24 h at  $-20^\circ\text{C}$ , and were later centrifuged at 4,000 rpm, and 15 min at  $5^\circ\text{C}$ . They were passed through a glass fiber filter of  $0.45 \mu\text{m}$  pores. Supernatant was recovered, kept into an Eppendorf tube and stored at  $-20^\circ\text{C}$  in darkness.

A, b and total chlorophylls,  $\beta$ -carotene, violaxanthin and lutein were identified and quantified as described by the method of Vidussi *et al.* (1996), by the high-pressure liquid chromatography method (HPLC, Hewlett Packard, 1100 model).  $20 \mu\text{L}$  were taken and were injected into the chromatography equipment. In order to separate the pigments, a conjugation mobile phase with two solutions was used: the A solution was a mixture of methanol, 70:30 v/v 1 N ammonia acetate in one portion, and the B solution was 100% HPLC methanol. The stationary phase was a Hypersil C8 column, 10 cm long and 0.45 cm in diameter, filled with  $5 \mu\text{m}$  silica particles. The detector consisted of a diode arrangement with a 190-900 nm wave length interval and ability to determine five fixed wave lengths. Quantification was made with a calibration curve in 20, 40, 60, 80 y 100  $\text{ng mL}^{-1}$  of the standard.

Proline analysis. Following the Bates *et al.* (1973) method, 50 mg of each lyophilized sample were taken and they were mashed with 5 mL of sulphosalicylic acid in aqueous solution (3% w/v) in a Polytron, Willems® homogenizer. Samples were put into a Sanyo Hawk/05 microcentrifuge, at 1,200 rpm, for 10 min and at  $5^\circ\text{C}$ . 2 mL of the filtered product were placed in an assay tube. Control was made-up by sulphosalicylic acid at 3%. 2 mL of glacial acetic acid and 2 mL of acid ninhydrin were added to each tube. The mixture was homogenized by Vortex (K-550 G model, Scientific Industries) mixer. The assay tubes were put into double boil for 1 h. The reaction was ended with ice in order to lower temperature; when it became room temperature, 1 mL the mixture was extracted with 1 mL of toluene and was placed in the Vortex mixer for 20 s. The supernatant was taken with a Pasteur pipette and was read at 520 nm by a spectrophotometer (Fisher Scientific 415 model Spectro master).

Peroxidase analysis. Based upon the Bergmeyer (1974) method, 50 mg of lyophilized leaves were taken, to which 5 mL of a 0.1 M phosphate, pH 7 buffer was added and it was homogenized with a Polytron, Willems® equipment. Tubes were put into ice in order to avoid enzyme denaturalization. The mixture was put into a refrigerated Sanyo Hawk/05 microcentrifuge at 1,200 rpm, for 10 min and  $5^\circ\text{C}$ . In one cell were added 3 mL of 0.1 M phosphate, pH 7 buffer, 0.05 mL of 20.1 mM guaiacol solution, 0.1 of sample, 0.03 mL of 12.3 mM hydrogen peroxide. Readings were made at 436 nm by a spectrophotometer (Fisher Scientific 415 model Spectro master) every 30 s up to 120 s.

Análisis de peroxidadas. Se determinaron con el método de Bergmeyer (1974): se tomaron 50 mg de hojas liofilizadas, a las que se les añadieron 5 mL de buffer de fosfato 0.1 M, pH 7 y homogeneizó en un equipo Polytron, Willems®. Los tubos se colocaron en hielo para evitar la desnaturalización de las enzimas. La mezcla se centrifugó en una microcentrifuga refrigerada (Sanyo Hawk/05) a 1,200 rpm, 10 min y 5°C. En una celda se agregaron 3 mL de buffer de fosfato 0.1 M, pH 7, 0.05 mL de solución de guaiacol 20.1 mM, 0.1 de muestra, 0.03 mL de solución de peróxido de hidrógeno 12.3 mM. Las lecturas se hicieron a 436 nm con el espectrofotómetro Spectro Master (Modelo 415, Fisher Scientific, Pittsburg, PA), cada 30 s hasta 120 s.

Análisis de proteínas. Las proteínas solubles, insolubles y totales se determinaron de acuerdo a Bradford (1976). En el caso de la proteína soluble se pesaron 50 mg de hojas molidas liofilizadas, se añadieron 5 mL de buffer de fosfato, 50 mM, se molió con el homogenizador Polytron, Willems. Los tubos se enfriaron en hielo, se centrifugó con la microcentrifuga refrigerada Sanyo Hawk/05 a 1,200 rpm, 10 min y a 5°C. Las proteínas solubles se precipitaron con 1 mL de ácido tricloroacético al 10% y se centrifugó (centrifuga Damon/IEC Division Modelo IEC HN-S) a 3500 rpm, 10 min. Las proteínas precipitadas se disolvieron con 5 mL de NaOH 0.1 N; se tomaron 100 µL de solución y se añadieron 5 mL de reactivo de Bradford. Se agitaron con el Vortex (Modelo K-550G Scientific Industries, Inc.), después de cinco minutos se leyó en el espectrofotómetro (Spectro Master, Modelo 415 Fisher Scientific) a 595 nm. Los estándares se prepararon con albúmina bovina. Las proteínas insolubles se calcularon por diferencia entre la proteína total y la soluble.

Análisis estadístico. Se realizaron pruebas de análisis multifactorial de varianza (ANOVA) y el análisis de una vía para determinar las diferencias significativas (Least Significant Test, LSD). Las comparaciones de medias fueron probadas al 5% de probabilidad, con una comparación múltiple de Tukey (Zar, 1974). El análisis se realizó con el paquete estadístico NCSS (Statistical and Power Analysis Software, 2000).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Plantas en campo.- En el Cuadro 1 se presentan los resultados correspondientes a los pigmentos. El contenido de clorofila *a*, *b*, total y β-caroteno en las hojas disminuyó cuando aumentó el estrés hídrico en el suelo, en las tres especies estudiadas. Randall *et al.* (1977) registraron en maíz (*Zea mays* L. cv. Funk's 4808) una reducción de clorofila total, cuando el potencial hídrico baja; sin embargo, Brown *et al.* (1995) observaron que el estrés hídrico no afectó los niveles de clorofila total en maíz. Sairam y Saxena (2000) citan una menor cantidad en el contenido de clorofila total y caroteno en diferentes genotipos de trigo (*Triticum* sp.), al reducirse la humedad en el suelo.

Protein analysis. Total, soluble and insoluble proteins were determined according to Bradford (1976). In regard to the soluble protein, 50 mg of mashed lyophilized leaves were weighed; 5 mL of 50 mM phosphate buffer was added, and they were mashed by a Polytron Willems homogenizer. The tubes were cooled with ice in order to avoid enzymatic desnaturalization. The mixture was placed into a refrigerated Sanyo Hawk/05 microcentrifuge at 1,200 rpm, for 0 min and at 5°C. Soluble proteins precipitated with 1 mL of 10% trichloroacetic acid and centrifuged by a Damon/IEC Division IEC HN-S model equipment at 3500 rpm for 10 min. Precipitated proteins were solved by 5 mL of NaOH 0.1 N; 100 µL of the solution were taken and 5 mL of the Bradford reactive were added. They were shaken by Vortex (K-550G Model, Scientific Industries, Inc.) for 5 min and were read by the spectrophotometer (Spectro Master, 415 Model, Fisher Scientific) at 595 nm. Standards were prepared with cow albumin. Insoluble proteins were determined by the difference between total protein and soluble protein.

Statistical analysis. Multifactorial analysis of variance tests (ANOVA) and one way analysis to determine the significant differences by the Least Significant Test (LSD) were used. Mean comparisons were tested at a 5% probability, with Tukey's multiple comparison test (Zar, 1974). Data were analyzed by NCSS (Statistical and Power Analysis Software, 2000).

## RESULTS AND DISCUSION

Field plants. In Table 1 are shown the results about pigments. The content of *a*, *b*, total chlorophyll and β-carotene in leaves diminished when soil water stress increased in the three studied species. Randall *et al.* (1977) registered a total chlorophyll reduction when water potential lowers in corn (*Zea mays* L. cv. Funk's 4808); however, Brown *et al.* (1995) observed that water stress did not affect total chlorophyll levels in corn. Sairam and Saxena (2000) quote a lower amount of total chlorophyll and carotene in different wheat (*Triticum* sp.), genotypes when soil moisture goes down.

Violaxantina increased from 0.09 to 0.15 ng µg<sup>-1</sup> in *Paulownia elongata*, in *P. fortunei* it kept the same (0.07 µg<sup>-1</sup>) and in *P. imperialis* it changed from 0.17 to 0.16 µg<sup>-1</sup>. Lutein went from 0.39 to 0.3 µg<sup>-1</sup> in *P. elongata*, it diminished from 0.55 to 0.50 µg<sup>-1</sup> in *P. fortunei* and in *P. imperialis* there was an increment from 0.31 to 0.49 µg<sup>-1</sup>. The increment of lutein in *P. imperialis* could be related to the protection of this species against stress, since literature gathers reports in which it changes as lightning on leaves varies; a lutein cycle is considered (Matsubara *et al.* 2007).

Cuadro 1. Resultados en la clorofila a, clorofila b, clorofila total,  $\beta$ -caroteno, violaxantina y luteína en hojas de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y *Paulownia imperialis* bajo diferentes condiciones de humedad del suelo en el campo.Table 1. Results of a chlorophyll, b chlorophyll, total chlorophyll,  $\beta$ -carotene, violaxantine and lutein in *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* and *Paulownia imperialis* leaves under different soil moisture conditions in the field.

Especies	Humedad del Suelo %	Clorofila a ng $\mu\text{g}^{-1}$	Clorofila b ng $\mu\text{g}^{-1}$	Clorofila Total ng $\mu\text{g}^{-1}$	$\beta$ -caroteno ng $\mu\text{g}^{-1}$	Violaxantina ng $\mu\text{g}^{-1}$	Luteína ng $\mu\text{g}^{-1}$
<i>Paulownia elongata</i> S. Y. Hu	25.6 $\pm$ 1.6	1.83 $\pm$ 0.23a	0.54 $\pm$ 0.03a	2.37 $\pm$ 0.24a	0.30 $\pm$ 0.02a	0.09 $\pm$ 0.02a	0.39 $\pm$ 0.03b
<i>Paulownia elongata</i>	13.6 $\pm$ 0.7	1.97 $\pm$ 0.53a	0.58 $\pm$ 0.15a	2.55 $\pm$ 0.68a	0.28 $\pm$ 0.06a	0.13 $\pm$ 0.08a	0.49 $\pm$ 0.06a
<i>Paulownia elongata</i>	10.3 $\pm$ 1.3	1.65 $\pm$ 0.22a	0.51 $\pm$ 0.04a	2.16 $\pm$ 0.23a	0.28 $\pm$ 0.04a	0.15 $\pm$ 0.00a	0.3 $\pm$ 0.01b
<i>Paulownia fortunei</i> (Seem.) Hemsl.	25.2 $\pm$ 0.8	2.49 $\pm$ 0.43a	0.78 $\pm$ 0.22a	3.27 $\pm$ 0.63a	0.24 $\pm$ 0.05a	0.07 $\pm$ 0.06a	0.55 $\pm$ 0.11a
<i>Paulownia fortunei</i>	12.1 $\pm$ 1.2	2.69 $\pm$ 0.21a	0.79 $\pm$ 0.04a	3.49 $\pm$ 0.24a	0.27 $\pm$ 0.03a	0.04 $\pm$ 0.01a	0.59 $\pm$ 0.04a
<i>Paulownia fortunei</i>	7.4 $\pm$ 0.8	2.43 $\pm$ 0.57a	0.73 $\pm$ 0.15a	3.16 $\pm$ 0.72a	0.25 $\pm$ 0.06a	0.07 $\pm$ 0.02a	0.50 $\pm$ 0.11a
<i>Paulownia imperialis</i> Siebold & Zucc.	26.8 $\pm$ 1.5	1.60 $\pm$ 0.15a	0.56 $\pm$ 0.01a	2.17 $\pm$ 0.15a	0.31 $\pm$ 0.03a	0.17 $\pm$ 0.01a	0.31 $\pm$ 0.02b
<i>Paulownia imperialis</i>	12.5 $\pm$ 0.6	2.13 $\pm$ 0.75a	0.76 $\pm$ 0.29a	2.89 $\pm$ 1.04a	0.37 $\pm$ 0.13a	0.17 $\pm$ 0.09a	0.42 $\pm$ 0.09ab
<i>Paulownia imperialis</i>	10.2 $\pm$ 1.5	2.88 $\pm$ 0.59a	0.97 $\pm$ 0.15a	3.85 $\pm$ 0.74a	0.38 $\pm$ 0.01a	0.16 $\pm$ 0.06a	0.49 $\pm$ 0.06a

Las letras indican diferencias significativas estadísticamente entre la humedad en el suelo de cada especie

Los valores son el promedio  $\pm$  D. S.

Letters mean significant statistical differences among soil moisture content of each species.

Values are the  $\pm$ S.D. average.

La violaxantina en *Paulownia elongata* aumentó de 0.09 a 0.15 ng  $\mu\text{g}^{-1}$ , en *P. fortunei* permaneció en 0.07  $\mu\text{g}^{-1}$  y en *P. imperialis* cambió de 0.17 a 0.16  $\mu\text{g}^{-1}$ . La luteína en *P. elongata* tuvo un valor de 0.39 a 0.3  $\mu\text{g}^{-1}$ , en *P. fortunei* disminuyó de 0.55 a 0.50  $\mu\text{g}^{-1}$  y en *P. imperialis* se tuvo un incremento de 0.31 a 0.49  $\mu\text{g}^{-1}$ . El comportamiento de la luteína en esta última especie pudiese relacionarse con la protección de la especie contra el estrés, ya que en la literatura se informa sobre trabajos en los que esta cambia, al variar la iluminación en las hojas; además se plantea un ciclo de la luteína (Matsubara *et al.* 2007).

Los resultados referentes a los contenidos de peroxidasa y prolina se resumen en el Cuadro 2. Las peroxidasa mostraron diferencias significativas en *P. fortunei*, respecto al testigo, y en *P. elongata* y *P. imperialis* no se registraron. Sairam y Saxena (2000) consignan un incremento en peroxidasa al reducirse la humedad en el suelo. Las hojas en expansión

Results referring to peroxidases and proline are summarized in Table 2. Peroxidases revealed significant differences in *P. fortunei*, in regard to control, and there were non in *P. elongata* and *P. imperialis*. Sairam and Saxena (2000) report an increment in peroxidase when soil moisture lowers. When the expansion leaves of *Lolium temulentum* L. grow under water deficit, they increase peroxidase activity in their cell wall (Stuart *et al.*, 1997). Brown *et al.* (1995) stated that water stress does not affect ascorbate peroxidase levels in corn leaves.

It was found a greater amount of proline (20.7 to 30.8  $\mu\text{mol dry weight}^{-1}$ ) in *Paulownia imperialis*, followed by *P. elongata* (17.2 to 18.9  $\mu\text{mol dry weight}^{-1}$ ) and finally, *P. fortunei* (9.5 to 17.1  $\mu\text{mol dry weight}^{-1}$ ), even though there were no significant differences in any of the three species when subjected to water stress. There are several possibilities that explain proline increment when soil water stress does; Stewart *et al.* (1997)

de *Lolium temulentum* L. cuando crecen bajo déficit de agua, aumentan la actividad de la peroxidasa en su pared celular (Stuart *et al.*, 1997). Brown *et al.* (1995) manifiestan que el estrés hídrico no afecta los niveles de ascorbato peroxidasa en células de hojas de maíz.

En *Paulownia imperialis* se determinó mayor cantidad de prolina (20.7 a 30.8  $\mu\text{mol peso seco}^{-1}$ ), le sigue *P. elongata* (17.2 a 18.9  $\mu\text{mol peso seco}^{-1}$ ) y por último *P. fortunei* (9.5 a 17.1  $\mu\text{mol peso seco}^{-1}$ ); aunque no se obtuvieron diferencias significativas en ninguna de las tres especies al someterlas a estrés hídrico. Hay varias posibilidades por las que se incrementa la prolina cuando lo hace el estrés hídrico en el suelo; Stewart *et al.* (1997) demostraron que la acumulación de prolina se

proved that proline accumulation is the result of the inhibition of the glutamic acid synthesis. Fukutoku and Yamada (1984), after working with soy bean (*Glycine max* (L.) Merr.) mentioned that this condition comes from the soluble protein degradation of leaves. Handa *et al.* (1983) discovered an increment and later reduction of proline in tomato cells (*Lycopersicon esculentum* P. Mill.) when soil water stress went higher. In the varieties of sugar cane (*Saccharum officinarum* L.), their response to soil water stress varies, and it is observed in both ways (Rincones, 1997). Gibon *et al.* (2000) relate proline accumulation with chlorophyll loss and with a reduction of mitochondrial activity. Increment is also associated to the nitrogen components of senescent leaves. Killingbeck and Whitford (2001) record this fact in 50% of them in plants of the Chihuahuan Desert.

Cuadro 2. Resultados de peroxidasa y prolina en hojas de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y *Paulownia imperialis* bajo diferentes condiciones de humedad en el suelo en el campo.

Table 2. Results of peroxidase and proline in *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* and *Paulownia imperialis* leaves under different soil moisture conditions in the field.

Especies	Humedad en el suelo %	Peroxidasa U mL <sup>-1</sup>	Prolina $\mu\text{mol peso seco}^{-1}$
<i>Paulownia elongata</i> S. Y. Hu	25.6 ± 1.6	0.409 ± 0.2a**	18.704 ± 1.65a**
<i>Paulownia elongata</i>	13.6 ± 0.7	0.333 ± 0.1a	17.180 ± 4.03a
<i>Paulownia elongata</i>	10.3 ± 1.3	0.544 ± 0.25a	18.850 ± 1.22a
<i>Paulownia fortunei</i> (Seem.) Hemsl.	25.2 ± 0.8	2.481 ± 1.33a*	12.405 ± 0.521a**
<i>Paulownia fortunei</i>	12.1 ± 1.2	0.427 ± 0.2ab	9.487 ± 1.38a
<i>Paulownia fortunei</i>	7.4 ± 0.8	0.981 ± 0.04 b	17.063 ± 2.53a
<i>Paulownia imperialis</i> Siebold & Zucc.	26.8 ± 1.5	0.223 ± 0.09a**	30.806 ± 13.62a*
<i>Paulownia imperialis</i>	12.5 ± 0.6	0.403 ± 0.11a	20.700 ± 4.38a
<i>Paulownia imperialis</i>	10.2 ± 1.5	0.276 ± 0.13a	23.810 ± 0.8a

Las letras indican diferencias entre la humedad en el suelo de cada especie

\* Diferencias significativas estadísticamente entre cada especie

\*\* Los valores son el promedio ± S.D.

Letters mean significant statistical differences among soil moisture content of each species.

\* Statistical significant differences between each species.

\*\* Values are the ±S.D. average.

produce por la inhibición de la síntesis de ácido glutámico. Fukutoku y Yamada (1984), al trabajar con frijol soya (*Glycine max* (L.) Merr.) mencionan que se debe a la degradación de las proteínas solubles de las hojas. Handa *et al.* (1983) descubrieron un incremento y posterior disminución de la prolina en células de tomate (*Lycopersicon esculentum* P. Mill.) al aumentar el estrés hídrico del suelo. Las células con mayor contenido de prolina fueron las que tenían menor proteína soluble. En las variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) la respuesta al estrés hídrico en el suelo, es variable y se observa en ambos sentidos (Rincones, 1997). Gibon *et al.* (2000) relacionan la acumulación de prolina con la pérdida de clorofilas y con la reducción de la actividad mitocondrial. El incremento también se relaciona con la translocación de

Total protein increases significantly in *P. elongata* and there are no significant differences in *P. fortunei* and *P. imperialis*, when soil moisture became lower (Table 3). Brown *et al.* (1995) found that water stress did not affect protein levels in cells of *Zea mays* leaves. Soluble proteins significantly diminished in *P. elongata*, while in *P. imperialis*, they significantly increased when soil moisture lowered; in *P. fortunei* their concentration values were very small. The increment of soluble protein could be related to LEA (Late Embryogenesis Abundance) increase. These globular hydrophilic proteins are synthesized in greater amount when there is water deficit (Bray, 1997). Insoluble protein significantly increased in *P. elongata*; while in *P. imperialis* there were no significant differences when soil moisture reduced; thus, they were not detected in *P. fortunei*, as protein content was

compuestos nitrogenados de las hojas senescentes. Killingbeck y Whitford (2001) documentan esta actividad en 50% de hojas senescentes en plantas del Desierto Chihuahuense.

very low. The increment of insoluble proteins when soil moisture content becomes lower might be a response to GRP proteins (Glycine Rich Proteins), since glycine has an important role in the drought effect over plants (Jeffrey, 1987; Showalter, 1993).

Cuadro 3. Resultados de proteína total, soluble e insoluble en hojas de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y *Paulownia imperialis* bajo diferentes condiciones de humedad del suelo en el campo.

Table 3. Results of total, soluble and insoluble proteins in *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* and *Paulownia imperialis* leaves under different soil moisture conditions in the field.

Especies	Humedad del suelo	Proteína Total	Proteína Soluble	Proteína Insoluble
	%	mg mL <sup>-1</sup>	mg mL <sup>-1</sup>	mg mL <sup>-1</sup>
<i>Paulownia elongata</i> S. Y. Hu	25.6 ± 1.6	0.22 ± 0.005b*	0.20 ± 0.01 c	0.01 ± 0.014a
<i>Paulownia elongata</i>	13.6 ± 0.7	0.12 ± 0.012a	0.06 ± 0.00 a	0.05 ± 0.008b
<i>Paulownia elongata</i>	10.3 ± 1.3	0.25 ± 0.002c	0.14 ± 0.00 b	0.11 ± 0.006c
<i>Paulownia fortunei</i> (Seem.) Hemsl.	25.2 ± 0.8	0.05 ± 0.006a*	-	-
<i>Paulownia fortunei</i>	12.1 ± 1.2	0.09 ± 0.047a	-	-
<i>Paulownia fortunei</i>	7.4 ± 0.8	0.07 ± 0.049a	0.02 ± 0.01	0.06 ± 0.057
<i>Paulownia imperialis</i> Siebold & Zucc.	26.8 ± 1.5	0.14 ± 0.013a*	0.09 ± 0.01b	0.05 ± 0.021a
<i>Paulownia imperialis</i>	12.5 ± 0.6	0.12 ± 0.021a	0.06 ± 0.00a	0.06 ± 0.017a
<i>Paulownia imperialis</i>	10.2 ± 1.5	0.19 ± 0.075a	0.17 ± 0.01c	0.03 ± 0.088a

Las letras indican diferencias entre la humedad en el suelo de cada especie

\*Diferencias significativas estadísticamente entre cada especie

\*\* Los valores son el promedio ± S.D.

Letters mean significant statistical differences among soil moisture content of each species.

\* Statistical significant differences between each species.

\*\*Values are the ±S.D. average.

La proteína total aumenta significativamente en *P. elongata* y no existen diferencias significativas en *P. fortunei* y *P. imperialis*, al reducirse la humedad en el suelo (Cuadro 3). Brown *et al.* (1995) hallaron que el estrés hídrico no afectó los niveles de proteína en células de hojas de *Zea mays*. La proteína soluble en *P. elongata* disminuyó significativamente, en tanto que en *P. imperialis* aumentó significativamente al bajar la humedad en el suelo, en *P. fortunei* los valores de concentración fueron muy bajos. El incremento en la proteína soluble puede relacionarse con el aumento de las proteínas (*Late Embriogenesis Abundance*) LEA. Estas proteínas hidrofílicas globulares se sintetizan en mayor cantidad cuando hay déficit de agua (Bray, 1997). La insoluble creció significativamente en *P. elongata*; en tanto que, en *P. imperialis* no hubo diferencias significativas al disminuir la humedad en el suelo; así mismo no se detectaron en *P. fortunei*, por el contenido tan bajo de proteínas. El incremento en las proteína insoluble al bajar el contenido hídrico del suelo es posible que responda al aumento de proteínas (proteínas ricas en glicina) GRPs, ya que la glicina tiene una función importante en el efecto de sequía en las plantas (Jeffrey, 1987; Showalter, 1993).

Análisis en plantas en invernadero. Al igual que en las muestras tomadas en el campo, los resultados del contenido de clorofila

Analysis of greenhouse plants. As in samples taken in the field, results of a, b and total chlorophyll and  $\beta$ -carotene in leaves of greenhouse plants show a reduction when soil moisture concentration gets lower (Table 4). When the three *Paulownia* species are compared, it becomes evident that total chlorophyll in *P. imperialis* is higher than in the other taxa. Bourque and Naylor (1971) record in *Canavalia ensiformis* (L.) DC. a reduction in the accumulation of total chlorophyll, when there is a small amount of moisture in soil.  $\beta$ -carotene in *P. elongata* was lower in the lowest moisture condition, with significant differences; the opposite happened between *P. fortunei* and *P. imperialis*. Demmig *et al.* (1988) quote a decrease of  $\beta$ -carotene when soil moisture is low; it is involved in the absorption of radiation when chlorophylls do not get it (Hendry, 1999); it protects, as well, against oxygen radicals (Foyer *et al.*, 1994). Violaxanthin had no significant differences in the three studied species when soil moisture content went down. Lutein was lower in *P. elongata* and *P. imperialis* but not in *P. fortunei* under the same soil condition (Table 4). Munné and Alegre (2000) observed that variations in xanthophylls are due to radiation changes. Also, Demmig *et al.* (1988) probed that when soil moisture diminishes, it also does violaxanthin in *Nerium oleander* L.

Cuadro 4. Resultados de clorofila a, clorofila b, clorofila total,  $\beta$ -caroteno, violaxantina y luteína en hojas de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y *Paulownia imperialis* bajo diferentes condiciones de humedad del suelo en el invernadero.Table 4. Results of a chlorophyll, b chlorophyll, total chlorophyll,  $\beta$ -carotene, violaxantine and lutein in *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* and *Paulownia imperialis* leaves under different soil moisture conditions in the greenhouse.

Especies	Humedad en el suelo %	Clorofila a ng $\mu\text{g}^{-1}$	Clorofila b ng $\mu\text{g}^{-1}$	Clorofila Total ng $\mu\text{g}^{-1}$	$\beta$ -Caroteno ng $\mu\text{g}^{-1}$	Violaxantina ng $\mu\text{g}^{-1}$	Luteína ng $\mu\text{g}^{-1}$
<i>Paulownia elongata</i> S. Y. Hu	47.8 ± 2.5	4.34 ± 0.52a	1.41 ± 0.28a	5.75 ± 0.76a	0.41 ± 0.01a	0.16 ± 0.05a	0.66 ± 0.08a*
<i>Paulownia elongata</i>	15.5 ± 0.9	3.47 ± 0.36ab	1.18 ± 0.06a	4.65 ± 0.40ab	0.34 ± 0.03ab	0.13 ± 0.01a	0.55 ± 0.04ab
<i>Paulownia elongata</i>	8.4 ± 0.7	2.47 ± 1.02b	0.84 ± 0.32a	3.31 ± 1.34b	0.24 ± 0.07b	0.10 ± 0.03a	0.42 ± 0.11b
<i>Paulownia fortunei</i> (Seem.) Hemsl	47.5 ± 2.4	5.14 ± 0.39a	1.53 ± 0.06a	6.68 ± 0.38a	0.53 ± 0.02a	0.17 ± 0.02a	0.80 ± 0.03a*
<i>Paulownia fortunei</i>	15.9 ± 0.6	4.19 ± 1.39a	1.24 ± 0.44a	5.43 ± 1.83a	0.36 ± 0.07a	0.15 ± 0.03a	0.62 ± 0.19a*
<i>Paulownia fortunei</i>	7.8 ± 0.5	4.04 ± 1.16a	1.27 ± 0.44a	5.31 ± 1.60a	0.36 ± 0.13a	0.17 ± 0.05a	0.58 ± 0.19a*
<i>Paulownia imperialis</i> Siebold & Zucc.	48.1 ± 1.8	5.80 ± 0.37a	1.81 ± 0.20a	7.61 ± 0.57a	0.54 ± 0.05a	0.20 ± 0.03a	0.83 ± 0.09a*
<i>Paulownia imperialis</i>	15.6 ± 0.9	3.87 ± 1.02ab	1.37 ± 0.24ab	5.24 ± 1.26ab	0.38 ± 0.08a	0.14 ± 0.04a	0.63 ± 0.14ab
<i>Paulownia imperialis</i>	8.3 ± 0.5	2.66 ± 0.61b	0.81 ± 0.23b	3.46 ± 0.84b	0.38 ± 0.19a	0.15 ± 0.01a	0.47 ± 0.09b

Las letras indican diferencias entre la humedad en el suelo de cada especie

\* Diferencias significativas estadísticamente entre cada especie

\*\* Los valores son el promedio  $\pm$  S.D.

Letters mean significant statistical differences among soil moisture content of each species.

\* Statistical significant differences between each species.

\*\*. Values are the  $\pm$ S.D. average.

a, b, total y  $\beta$ -caroteno en las hojas muestran, una reducción, cuando disminuye el contenido de humedad en el suelo (Cuadro 4). La comparación entre las especies estudiadas, evidencia que la clorofila total en *P. imperialis* es mayor, que en los otros taxa. Bourque y Naylor, (1971) consignan en *Canavalia ensiformis* (L.) DC. una disminución en la acumulación de clorofila total, cuando hay poca humedad en el suelo. El  $\beta$ -caroteno en *P. elongata* fue menor en la condición de humedad más baja, con diferencias significativas. En *P. fortunei* y *P. imperialis* no hubo diferencias significativas. Demmig *et al.* (1988) citan un decremento de  $\beta$ -caroteno, cuando la humedad en el suelo es menor. El  $\beta$ -caroteno interviene en la absorción de la radiación, que no es captada por las clorofilas (Hendry, 1999), también protege contra los radicales de oxígeno que se producen (Foyer

Peroxidases did not have significant differences in *P. elongata* and *P. fortunei*; in *P. imperialis* there was a decrement of it when water stress was higher (Table 5). Navrot *et al.* (2006) reported an increment in peroxidase isoforms and a reduction in others as *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. When subjected to water deficit. On the other hand, Mehler reaction occurs when there is more electron transport than photosynthesis, which produces more hydrogen and peroxidase (Apel and Hirt, 2004).

When proline content is analyzed, significant differences were not found in the three studies species with the increment of water stress in soil (Table 5). However, it was observed that *P. fortunei* has a higher proline content that *P. elongata* and *P. imperialis*, while *P. elongate* has a higher content



et al., 1994). La violaxantina no tuvo diferencias significativas en las tres especies estudiadas al bajar el contenido de humedad en el suelo. La luteína disminuyó en *P. elongata* y *P. imperialis*, no así en *P. fortunei* bajo la misma condición del suelo (Cuadro 4).

than *P. imperialis*. Thus, there is a relation between the loss of chlorophyll and the proline content. Sofo et al. (2004) described proline increment in *Olea europea* L. in response to soil water stress.

Cuadro 5. Resultados de peroxidasa y prolina en hojas de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y *Paulownia imperialis* bajo diferentes condiciones de humedad en el suelo en el invernadero.

Table 5. Results of peroxidase and proline in *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* and *Paulownia imperialis* leaves under different soil moisture conditions in the greenhouse.

Especies	Humedad del suelo %	Peroxidasa U mg <sup>-1</sup>	Prolina μmoles peso seco <sup>-1</sup>
<i>Paulownia elongata</i> S. Y. Hu	47.8 ± 2.5	3.529 ± 1a	20.253 ± 0.90a
<i>Paulownia elongata</i>	15.5 ± 0.9	2.332 ± 1.30a	14.874 ± 4.13a
<i>Paulownia elongata</i>	8.4 ± 0.7	2.986 ± 1.98a	15.121 ± 3.47a
<i>Paulownia fortunei</i> (Seem.) Hemsl.	47.5 ± 2.4	1.991 ± 0.83a	27.192 ± 0.47a
<i>Paulownia fortunei</i>	15.9 ± 0.6	3.716 ± 2.41a	23.585 ± 2.11a
<i>Paulownia fortunei</i>	7.8 ± 0.5	0.998 ± 0.53a	24.608 ± 2.52a
<i>Paulownia imperialis</i> Siebold & Zucc.	48.1 ± 1.8	2.92 ± 1.18a	11.082 ± 0.29a
<i>Paulownia imperialis</i>	15.6 ± 0.9	1.441 ± 0.16ab	17.640 ± 4.1a
<i>Paulownia imperialis</i>	8.3 ± 0.5	0.522 ± 0.14b	12.411 ± 6.93a

Las letras indican diferencias entre la humedad en el suelo de cada especie

\* Diferencias significativas estadísticamente entre cada especie

\*\* Los valores son el promedio ± S.D.

Letters mean significant statistical differences among soil moisture content of each species.

\* Statistical significant differences between each species.

\*\* Values are the ±S.D. average.

Munné y Alegre (2000) observaron que las variaciones en las xantofilas se deben a los cambios en la radiación. Así mismo, Demming et al. (1988) demostraron que al disminuir la humedad en el suelo, se reduce el contenido de violaxantina en la rosa laurel (*Nerium oleander* L.).

Las peroxididas no tuvieron diferencias significativas en *P. elongata* y *P. fortunei*; en *P. imperialis* si hubo un decremento de peroxidasa al aumentar el estrés hídrico en el suelo (Cuadro 5). Navrot et al. (2006) documentan un aumento en algunas isoformas de peroxidasa y disminución en otras como *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. sometida a déficit de agua. Por otro lado, la reacción de Mehler se presenta cuando se tiene más transporte de electrones que fotosíntesis, lo que produce más peróxido de hidrógeno y peroxidasa (Apel y Hirt, 2004).

Al analizar el contenido de prolina no se determinaron diferencias significativas en las tres especies estudiadas con el incremento del estrés hídrico en el suelo (Cuadro 5). Sin embargo, se observó que *P. fortunei* tiene mayor contenido de prolina que *P. elongata* y *P. imperialis*; mientras que, *P. elongata*

Results about total, soluble and insoluble protein are summarized in Table 6. A decrement of total protein is notorious in *Paulownia elongata* when soil moisture is low, while in *P. fortunei* and *P. imperialis* a total protein increment is observed. In these species, there were significant differences. Barnett and Taylor (1966) got a reduction of total protein in Bermuda grass (*Cynodon dactylon* L.) to a higher water stress. Soluble protein significantly increased in *P. elongata* while *P. fortunei* and *P. imperialis* behaved the same way that with total proteins. As in field plants, soluble proteins might be due to the increment of LEA proteins. These globular hydrophilic proteins rise when there is water deficit (Bray, 1977). Insoluble protein in *P. elongata* significantly diminished, there was no change in *P. fortunei* and *P. imperialis* increased significantly. The greater amount of insoluble protein might be a response to the GRP proteins, which are made up by type unions and are related to elasticity of cell walls, which allows a better adaptation of cells to water stress conditions (Showalter, 1993).

Cuadro 6. Resultados de proteína total, soluble e insoluble en hojas de *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* y *Paulownia imperialis* bajo diferentes condiciones de humedad en el suelo en el invernadero.Table 6. Results of total, soluble and insoluble proteins in *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* and *Paulownia imperialis* leaves under different soil moisture conditions in the greenhouse.

Especies	Humedad del suelo %	Proteína Total mg mL <sup>-1</sup>	Proteína Soluble mg mL <sup>-1</sup>	Proteína Insoluble mg mL <sup>-1</sup>
<i>Paulownia elongata</i> S. Y. Hu	47.8 ± 2.5	0.15 ± 0.003a	0.04 ± 0b	0.12 ± 0.00c
<i>Paulownia elongata</i>	15.5 ± 0.9	0.05 ± 0.025a	0.01 ± 0a	0.04 ± 0.03b
<i>Paulownia elongata</i>	8.4 ± 0.7	0.06 ± 0.016a	0.05 ± 0.01c	0.01 ± 0.00a
<i>Paulownia fortunei</i> (Seem.) Hemsl.	47.5 ± 2.4	0.02 ± 0.002a*	0.01 ± 0.01a	0.01 ± 0.01a
<i>Paulownia fortunei</i>	15.9 ± 0.6	0.03 ± 0.025b*	0.02 ± 0.01a	0.01 ± 0.03a
<i>Paulownia fortunei</i>	7.8 ± 0.5	0.10 ± 0.020b*	0.03 ± 0.02a	0.07 ± 0.03a
<i>Paulownia imperialis</i> Siebold & Zucc.	48.1 ± 1.8	0.03 ± 0.006a*	0.02 ± 0.01a	0.01 ± 0.02b
<i>Paulownia imperialis</i>	15.6 ± 0.9	0.03 ± 0.008a*	0.02 ± 0.02a	0.004 ± 0.02a
<i>Paulownia imperialis</i>	8.3 ± 0.5	0.12 ± 0.014b*	0.02 ± 0.02a	0.10 ± 0.01c

Las letras indican diferencias entre la humedad en el suelo de cada especie

\* Diferencias significativas entre cada especie

\*\* Los valores son el promedio ± S.D.

Letters mean significant statistical differences among soil moisture content of each species.

\* Statistical significant differences between each species.

\*\* Values are the ±S.D. average.

contiene más prolina que *P. imperialis*, por lo que hay relación entre proporción de la pérdida de clorofila y el contenido de prolina. Sofo *et al.* (2004) describen el aumento de prolina en *Olea europea* L. en respuesta al estrés hídrico en el suelo.

Los resultados de proteína total, soluble e insoluble se resumen en el Cuadro 6. En *Paulownia elongata* es notorio un decremento de proteína total, al ser menor la humedad en el suelo; en tanto que, en *P. fortunei* y *P. imperialis* se observa el incremento de la proteína total, al bajar la humedad en el suelo. En estas dos especies, las diferencias son significativas. Barnett y Taylor (1966) obtuvieron una disminución de proteína total en pasto Bermuda (*Cynodon dactylon*, L.) a mayor estrés hídrico. La proteína soluble aumentó en *P. elongata* significativamente, mientras que en *P. fortunei* y *P. imperialis* no hubo diferencias significativas al reducirse la humedad en el suelo. Al igual que en las plantas desarrolladas en el campo, el aumento en la proteína soluble puede obedecer al incremento de las proteínas LEA. Estas proteínas hidrofílicas globulares se elevan cuando hay déficit de agua (Bray, 1997). La proteína insoluble en *P. elongata* disminuyó significativamente, en *P. fortunei* no hubo variación y en *P. imperialis* aumentó significativamente. La mayor cantidad de proteína insoluble es posible que responda al incremento de proteínas GRPs, las cuales están formadas por uniones tipo beta y se relacionan con la elasticidad de las paredes celulares, lo que permite una mejor adaptación de las células a las condiciones de estrés hídrico (Showalter, 1993).

The assessment of biochemical analysis of the response to water stress makes it evident that *P. imperialis* and *P. elongata* are more tolerant than *P. fortunei*, a result confirmed by Llano Sotelo *et al.* (2010) who analyzed physiological conditions under soil water stress, such as gas interchange, stomatal conductance, transpiration, water potential and water use efficiency, which suggests that they are species with good development under drought environment.

## CONCLUSIONS

There were significant differences in field and greenhouse conditions in regard to the biochemical analysis that were performed. Results about proline in *P. imperialis* presuppose a greater resistance to water stress compared to *P. elongata* and *P. fortunei*. There were non in peroxidase content when soil moisture diminished, in both field and greenhouse environments, which make peroxidases not fit indicators to measure the response to water stress of the species and conditions here described.


The scarce amount of pigments indicate that the luminous stage of photosynthesis is lightly affected in *P. elongata*, *P. fortunei* y *P. imperialis* when they are subjected to water stress. The higher total and soluble protein content of *P. elongata* and *P. imperialis* suggests that they are more efficient in water use compared to *P. fortunei*.

La evaluación de los análisis bioquímicos a la respuesta al estrés hídrico evidencia que *P. imperialis* y *P. elongata* son más tolerantes que *P. fortunei*; resultado que corrobora lo publicado por Llano-Sotelo *et al.* (2010) quienes analizaron condiciones fisiológicas bajo estrés hídrico en el suelo, como intercambio gaseoso, conductancia estomática, transpiración, potencial hídrico y eficiencia del uso del agua, lo que sugiere que son especies con desarrollo aceptable en suelos bajo sequía.

## CONCLUSIONES

Se obtuvieron diferencias significativas en las condiciones de campo e invernadero, con respecto a los análisis bioquímicos realizados. Los resultados de contenido de prolina en *P. imperialis* presuponen mayor resistencia al estrés hídrico en comparación con *P. elongata* y *P. fortunei*. No hubo diferencias significativas en el contenido de peroxidasa, al disminuir el contenido de humedad en el suelo, tanto en condiciones de invernadero como en campo, por lo que no se pueden considerar las peroxidases como indicadores de respuesta al estrés hídrico en las especies y condiciones estudiadas.

La escasa cantidad de los pigmentos indica que la fase luminosa de la fotosíntesis es poco afectada en *P. elongata*, *P. fortunei* y *P. imperialis* al ser sometidas a estrés hídrico. El mayor contenido de proteína total y soluble en *P. elongata* y *P. imperialis* sugiere que estas son más eficientes en el uso del agua, que *P. fortunei*.


La evaluación de la respuesta al estrés hídrico entre las especies considera que *P. imperialis* y *P. elongata* son más tolerantes que *P. fortunei*, lo que corrobora lo publicado en otros trabajos con estas especies. 

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) por el apoyo otorgado con el proyecto CONAFOR-2002-C01-5327. Se agradece a personal del CIBNOR, especialmente al M. en C. Margarito Rodríguez y Tec. Sergio Real por el apoyo técnico en invernadero y campo, al Dr. Francisco E. Hernández Sandoval por la colaboración en la cuantificación de los pigmentos, a la M. en C. Diana Dorantes por su apoyo en la traducción al inglés del Resumen; al Dr. Alejandro Castellanos del DICTUS de la Universidad de Sonora, por su apoyo.

## REFERENCIAS

- Apel, K. and H. Hirt 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.
- Barnett, N. M. and A. W. Naylor 1966. Amino acid and protein metabolism in Bermuda grass during water stress. *Plant Physiology* 41:1222-1230.
- Bates, L., R. P. Waldren and I. D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.
- Bergmeyer, H. U. 1974. *Methods of enzymatic analysis*. Ed. Verlag Chemie Int. Ciudad y estado. USA. Vol. 2. pp. 685-689.

The assessment of the response to water stress in these species considers that *P. imperialis* and *P. elongata* are more tolerant than *P. fortunei*, which confirms what has been previously reported. 

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) for the financial support provided to CONAFOR-2002-C01-5327 project. They also thank the personnel of CIBNOR, to M. en C. Margarito Rodríguez and Tec. Sergio Real in particular, for their technical help in the greenhouse and field stages of this research study; to Dr. Francisco E. Hernández Sandoval for his involvement in pigment quantification; to M. en C. Diana Dorantes for the translation into English of the Abstract; to Dr. Alejandro Castellanos del DICTUS of Universidad de Sonora, for his support.

End of the English version

- Bourque, D. P. and A. W. Naylor. 1971. Large effects of small water deficits on chlorophyll accumulation and ribonucleic acid synthesis in etiolated leaves of Jack bean (*Canavalia ensiformis* [L.] DC.). *Plant Physiology*. 47: 591-594.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Bray, E. A. 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103:1035-1040.
- Bray, E. A. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Sci.* 2(2):48-54.
- Brown, P. S., D. P. Knievel and E. J. Pell. 1995. Effects of moderate drought on ascorbate peroxidase and glutathione reductase activities in mesophyll and bundle sheath cells of maize. *Physiologia Plantarum*. 95(2): 274-280.
- Demmig, B., K. Winter, A. Kruger and F. Czygan. 1988. Zeaxanthin and the heat dissipation of excess light energy in *Nerium oleander* exposed to a combination of high light and water stress. *Plant Physiology*. 87: 17-24.
- Foyer, C. H., P. Descourvieres and K. J. Kunert. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment*. 17: 507-523.
- Fukutoku, Y. and Y. Yamada. 1984. Sources of proline-nitrogen in water-stressed soybean (*Glycine max*). II. Fate of <sup>15</sup>N-labelled protein. *Physiol. Plant*. 61: 622-628.
- Gibon, Y., R. Sulpice and F. Larher. 2000. Proline accumulation in canola leaf discs subjected to osmotic stress is related to the loss of chlorophylls and to the decrease of mitochondrial activity. *Physiologia Plantarum*. 110: 469-476.
- Handa, S., R. A. Bressan, A. K. Handa, N. C. Carpita and P. M. Hasegawa. 1983. Solutes contributing to osmotic adjustment in cultured plant cells adapted to water stress. *Plant Physiology*. 73: 834-843.
- Hendry, G. A. 1999. Plant pigments. In: Lea, P. J. and R. C. Leegood (Ed.). *Plant biochemistry and molecular biology*. 2nd Edition. John Wiley and Sons. Ciudad. England. pp. 219-234.
- Jeffrey, D. W. 1987. *Soil-plant relationships. An ecological approach*. CrommHelm. London, UK. pp. 50-62.
- Killingbeck, K. T. and W. G. Whitford. 2001. Nutrient resorption in shrubs growing by design, and by default in Chihuahuan Desert arroyos. *Oecologia*. 128: 351-359.
- Llano-S., J. M., L. Alcaraz-M. y A. E. CastellanosV. 2010. Gas exchange in Paulownia species growing under different soil moisture conditions in the field. *J. Environ. Biol.* 31: 497-502.
- Matsubara, S., T. Morosinotto, C. Barry and R. Bassi. 2007. Short- and long-term operation of the lutein-epoxide cycle in light-harvesting antenna complexes. *Plant Physiology*. 144: 926-941.

- Munné-B. S. and L. Alegre. 2000. The xanthophyll cycle is induced by light irrespective of water status in field-grown lavender (*Lavandula stoechas*) plants. *Physiologia Plantarum*. 108: 147-151.
- Navrot, N., V. Collin, U. Gualberto, E. Gelhaye, M. Hirasawa, P. Rey, D. B. Knaff, E. Issakidis, J. P. Jacquot and N. Rouhier. 2006. Plant Glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology*. 142: 1364-1379.
- Number Cruncher Statistical System (NCSS) 12000. Statistical Software. Kaysville, UT. USA.
- Parsons L., R. 1987. Respuestas de la planta a la deficiencia de agua. In: Christiansen, M. N. y Ch. F. Lewis (Eds.). Mejoramiento de plantas en ambientes poco favorables. Editorial LIMUSA. México, D.F. México. pp. 211-231.
- Randall, S. A., J. T. Philip and E. L. Fiscus. 1977. Water stress effects on the content and organization of chlorophyll in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize. *Plant Physiology*. 59(3): 351-353.
- Rincones, C. 1997. Variación del contenido de prolina en ocho variedades de caña de azúcar a cuatro niveles de humedad en el suelo. *Caña de Azúcar*. 15(1): 3-16.
- Sairam, R. K. and D. C. Saxena. 2000. Oxidative stress and antioxidants in Wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. *J. Agronomy & Crop Science*. 184, 55-61.
- Showalter, A. M. 1993. Structure and function of Plant cell wall proteins. *The Plant Cell* 5:9-23.
- Sofo, A., B. Dichio, C. Xiloyannis and A. Masia. 2004. Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress. *Physiologia Plantarum*. 121: 58-65.
- Stewart, C. R., S. F. Boggess, D. Aspinall and L. G. Paleg. 1977. Inhibition of proline oxidation by water stress. *Plant Physiology*. 59: 930-932.
- Stuart, T. D., S. Wilkinson, M. A. Bacon and W. J. Davies. 1997. Multiple signals and mechanisms that regulate leaf growth and stomatal behaviour during water deficit. *Physiologia Plantarum*. 100: 303-313.
- Tezara, W., V. J. Mitchell, S. D. Driscoll and D. W. Lawlor. 1999. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*. 401:914-917.
- Vidussi, F., H. Claustre, J. G. Bustillos, C. Cailliau and J. C. Marty. 1996. Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: separation of chlorophyll a from divinyl-chlorophyll a and zeaxanthin from lutein. *Journal of Plankton Research*. 18(12): 2377-2382.
- Yao, G. X. 1990. Final technical report of *Paulownia* project (Phase II). International Development Research Centre (IDRC). Canada. The Chinese Academy of Forestry, Ottawa, Canada. Páginas.
- Zar, J. H. 1974. *Biostatistical Analysis*. Ed. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs. NJ. USA. pp. 162-183.