



**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y
ARTES DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

T E S I S

**Influencia de la variación lumínica
en la fotosíntesis y en el metabolismo
de antocianinas de *Euphorbia hirta*
Linn.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

YESSICA DEL CARMEN PINEDA MAYO



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Agosto de 2022



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**Influencia de la variación lumínica
en la fotosíntesis y en el metabolismo
de antocianinas de *Euphorbia hirta*
Linn.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

YESSICA DEL CARMEN PINEDA MAYO



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Agosto de 2022



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**Influencia de la variación lumínica
en la fotosíntesis y en el metabolismo
de antocianinas de *Euphorbia hirta*
Linn.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

YESSICA DEL CARMEN PINEDA MAYO

Director

Dr. Iván de la Cruz Chacón

Asesora

Dra. Marisol Castro Moreno

Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Agosto de 2022





UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS
SECRETARÍA GENERAL
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN ESCOLAR
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas
Fecha: 16 de agosto de 2022

C. Yessica del Carmen Pineda Mayo

Pasante del Programa Educativo de: Licenciatura en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:

Influencia de la variación lumínica en la fotosíntesis y en el metabolismo de

antocianinas de *Euphorbia hirta*.

En la modalidad de: Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE


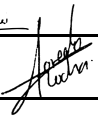

Revisores

Dra. Clara Luz Miceli Méndez

M. en C. Ana Guadalupe Rocha Loredo

Dr. Iván de la Cruz Chacón

Firmas:

Ccp. Expediente

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, gracias a Dios por permitirme vivir experiencias buenas dentro de mi universidad, y por los amigos de grupo con los cuales disfrute cada salida de campo, gracias a cada maestro que hizo parte de este proceso integral de formación.

Doy especial agradecimiento al Dr. Iván por su paciencia durante la realización de este proyecto, por guiarme e instruirme con sus enseñanzas. Es cierto, no ha sido fácil pese a la circunstancia de pandemia, sin embargo, gracias a su ayuda y su motivación todo el tiempo, esto parecía cada vez menos complicado.

A la Dra. Marisol por estar en constante revisión con mi trabajo, además de ayudarme en su momento a realizar mi trabajo de campo y por aportar sus ideas, conocimientos y correcciones que fueron una base importante para esta investigación.

Al laboratorio de Fisiología y química vegetal y a su equipo por abrirme las puertas y formar parte durante el tiempo de realización de este proyecto, por demostrarme que el amor y pasión de la química de las plantas es impresionante y que se requiere de esfuerzo y trabajo en equipo para descubrir cosas fascinantes del mundo vegetal.

DEDICATORIAS

A Dios quien me ha permitido culminar una de las etapas más importantes en mi vida, gracias a su fidelidad y amor he visto su respaldo en mi vida social y académica y desde luego porque me ha inspirado el amor y pasión hacia la naturaleza, su creación me refleja lo fantástico y asombroso que es el mundo natural.

A mis increíbles Padre y Madre por estar en continua comunicación conmigo para sentir con calidez un apoyo genuino e incondicional todo el tiempo, y por demostrarme que nunca hay imposibles para todo aquel que se esfuerza con determinación y confianza. Por estar dispuestos a confiar, creer en mí y mis expectativas.

A mis hermanos Geovanny y Lizbeth que con paciencia y sinceridad me soportaron y estuvieron siempre presentes para disfrutar juntos momentos de felicidad, enojo y también tristeza. Por enseñarme que no hay lazos más fuertes que el de los hermanos.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 <i>Euphorbia hirta</i> Linn.	3
2.1.1 Taxonomía y descripción botánica.....	3
2.1.2 Distribución.....	4
2.1.3 Nombres vernáculos de <i>Euphorbia hirta</i>	5
2.1.4 Usos tradicionales.....	5
2.2 Aspectos generales de la fotosíntesis	6
2.2.1 Respuestas de la fotosíntesis al ambiente	9
2.2.2 Respuesta de la fotosíntesis frente a distintos ambientes lumínicos	10
2.3. Antocianinas: pigmentos de significancia ecológica	11
2.3.1 Estructura química.....	12
2.3.2 Biosíntesis	13
2.3.3 Las antocianinas en la fotoprotección	13
III ANTECEDENTES.....	16
3.1 Estudios de metabolitos secundarios en Euphorbiaceae y <i>Euphorbia</i>	16
3.2 Estudios fitoquímicos y fisiológicos de <i>Euphorbia hirta</i>	17
IV OBJETIVOS E HIPÓTESIS	18
4.1 Objetivo General	18
4.2 Objetivos particulares.....	18
4.3 Hipótesis	18
V MÉTODO	19
5.1 Diseño general del estudio	19
5.2 Métodos	19
5.2.1. Caracterización aspectos fisiológicos y desarrollo foliar de las hojas de <i>E. hirta</i>	19
5.2.2 Extracción y análisis de antocianinas.....	20
5.2.3 Extracción y análisis de pigmentos fotosintéticos.....	20
5.2.4 Medición de fotosíntesis.....	21

5.2.5 Análisis estadísticos.....	21
VI RESULTADOS.....	23
6.1 Descripción de plantas de <i>Euphorbia hirta</i> crecidas en distintas condiciones lumínicas.....	23
6.2 Antocianinas durante el desarrollo foliar de <i>Euphorbia hirta</i>	26
6.3 Antocianinas de los tallos de <i>Euphorbia hirta</i> durante su desarrollo.....	27
6.4 Pigmentos fotosintéticos durante el desarrollo foliar de <i>Euphorbia hirta</i>	28
6.5 Actividad fotosintética durante el desarrollo foliar de <i>Euphorbia hirta</i>	31
VII DISCUSIÓN.....	34
VIII CONCLUSIONES.....	40
IX PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES.....	41
X.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Nombres vernáculos de <i>Euphorbia hirta</i> tomado de (Martínez, 1979).	6
Cuadro 2. Comparaciones estadísticas de la acumulación de antocianinas de <i>Euphorbia hirta</i> en dos condiciones lumínicas	27
Cuadro 3. Variables del intercambio gaseoso de <i>Euphorbia hirta</i> en condiciones de luz contrastantes. Concentración interna de CO ₂ (<i>C_i</i>), tasa de asimilación fotosintética neta (<i>A_{net}</i>), Tasa de transpiración (<i>E</i>), conductancia estomática (<i>G_s</i>)	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos morfológicos de <i>Euphorbia hirta</i> a) hojas maduras expuestas a luz directa. b) inflorescencia en forma de ciato. c) Tallo maduro rojizo.	4
Figura 2. Distribución actual de <i>Euphorbia hirta</i> tomado de (Steinmann <i>et al.</i> , 2002).....	5
Figura 3. Estructura y sustituyentes de las antocianinas (Durst y Wrolstad, 2001).....	12
Figura 4. Representación esquemática de la vía biosintética de las antocianinas. CHS, calcona sintasa; CHI, calcona isomerasa; F3H, flavanona 3-hidroxilasa; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilasa; F3'5'H, flavonoide 3', 5'-hidroxilasa; DFR, dihidroflavonol 4-reductasa; ANS, antocianidina sintasa; UFGT, flavonoide 3-O-glucosiltransferasa; FLS, flavonol sintasa. (Liu <i>et al.</i> , 2018).....	15
Figura 5. Diagrama de flujo del método a seguir durante el experimento	19
Figura 6. Aspectos foliares de tres secciones foliares de <i>Euphorbia hirta</i> silvestre crecidas en condiciones lumínicas contrastantes. A) bajo sol y B) bajo sombra.	23
Figura 7. Variación en la pigmentación foliar de plantas de <i>Euphorbia hirta</i> crecidas en condiciones lumínicas plena. Columnas de izquierda a derecha, inmaduras, maduras y senescentes.	24
Figura 8. Aspectos de la distribución de la pigmentación foliar de plantas de <i>Euphorbia hirta</i>	25
Figura 9. Abundancia de antocianinas en las hojas de <i>Euphorbia hirta</i> . Bajo a) sol pleno, b) sombra	27
Figura 10. Abundancia de antocianinas en los tallos de <i>Euphorbia hirta</i> . Bajo a) sol pleno, b) sombra	28
Figura 11. Cantidad de clorofila A bajo dos condiciones en <i>Euphorbia hirta</i> . Bajo a) sol pleno, b) sombra HS: Hojas senescentes, HM: Hojas maduras, HI: Hojas inmaduras.	30
Figura 12. Cantidad de clorofila B bajo dos condiciones en <i>Euphorbia hirta</i> . Bajo a) sol pleno, b) sombra HS: Hojas senescentes, HM: Hojas maduras, HI: Hojas inmaduras.	30
Figura 13. Cantidad de Carotenoides en las hojas de <i>Euphorbia hirta</i> . Bajo a) sol pleno, b) sombra HS: Hojas senescentes, HM: Hojas maduras, HI: Hojas inmaduras.	30

Figura 14. Actividad fotosintética señalada como asimilación neta de CO₂ (A net) durante el desarrollo foliar de *Euphorbia hirta* bajo condiciones de a) sol pleno y b) sombra. HS: Hojas senescentes, HM: Hojas maduras, HI: Hojas inmaduras. 32

RESUMEN

Una de las respuestas comunes de las plantas ante el estrés lumínico, es la producción de pigmentos fotoprotectores, llamados antocianinas. La presencia de estas moléculas en las hojas proporciona protección a la maquinaria fotosintética frente al exceso de radiación, incluyendo rayos ultravioleta.

En *Euphorbia hirta*, es común observar que las hojas de plantas que crecen bajo sol son más rojas que aquellas que crecen en la sombra que por lo general son más verdes, indicando una producción diferencial de clorofilas y/o de pigmentos rojos. La habilidad de *E. hirta* de crecer en diversos hábitats y variadas condiciones resultan de especial interés para estudiar aspectos básicos de su fisiología en situaciones de estrés lumínico, por lo que este estudio tuvo como objetivo evaluar si las respuestas del metabolismo de antocianinas y el sistema fotosintético de las hojas de *E. hirta* están condicionadas por la variación lumínica y si la mayor pigmentación por antocianinas podría ser un recurso fotoprotector. Para ello, se diseñó un estudio de cuatro etapas que consistió en: a) localización y recolecta de plantas creciendo en condiciones lumínicas plenas y bajo sombra; b) determinación espectrofotométrica de antocianinas; c) cuantificación espectrofotométrica de pigmentos fotosintéticos y d) toma *in situ* de lecturas fisiológicas de fotosíntesis por medio de un analizador de gases por medio de luz infrarroja (IRGA).

Los resultados señalan que las antocianinas son más abundantes en hojas maduras y senescentes en condiciones lumínicas directas que bajo sombra, los tallos presentaron una situación inversa, dado que las antocianinas son más abundantes en plantas bajo sombra que las crecidas a luz directa. Las clorofilas *a* y *b* y carotenoides fueron detectadas en ambas condiciones de lumínicas en los tres grados de desarrollo, particularmente en hojas maduras no hay diferencias en la abundancia de clorofilas, en hojas senescentes hay más clorofilas en sombra y en hojas jóvenes bajo luz directa. En relación a la capacidad fotosintética, las plantas bajo sol exhibieron tasas fotosintéticas (A_{net}) en hojas maduras y jóvenes, sin embargo, las hojas senescentes fueron inactivas; bajo sombra se detectó actividad en todas las hojas, en mayor proporción en hojas maduras. Otras variables

relacionadas del sistema fotosintético indican que la eficiencia de la carboxilación fotosintética fue mayor en hojas maduras expuestas a luz directa, la concentración intracelular (C_i) más altas en hojas maduras desarrolladas bajo dosel, la tasa de transpiración (E) y la conductancia estomática similar para ambas condiciones de iluminación.

Se deduce de lo anterior que la presencia de antocianinas en las hojas de *Euphorbia hirta*, muestran que esta hierba presenta un metabolismo secundario adaptable a las condiciones lumínicas en las que habita, lo que parece permitir que la capacidad fotosintética de la planta esté activa en situaciones variadas de luz.

Palabras clave: antocianinas, estrés lumínico, capacidad fotosintética, desarrollo foliar.

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas realizan procesos metabólicos que son esenciales para su ciclo de vida. Entre ellos, la biosíntesis de metabolitos secundarios mediante proteínas de especialización, estas moléculas están asociadas a estados específicos de desarrollo y son de distribución restringida entre las especies y entre los órganos de la planta, pueden ser agrupados en terpenos, fenoles, compuestos nitrogenados y policétidos (Taiz y Zeiger, 2006; Piñol *et al*, 2008).

Una de las respuestas comunes de las plantas ante el estrés lumínico, es la producción de antocianinas, estas moléculas son metabolitos secundarios, probablemente el grupo más importante de pigmentos visibles, además, de las clorofilas. Las antocianinas son fenoles del grupo de los flavonoides. La presencia de estas moléculas proporciona color a las flores y a los frutos que probablemente colabora en la atracción de polinizadores y dispersores de semillas; en las hojas protegen a la maquinaria fotosintética frente a radiación UV o como antioxidantes eliminando radicales libres oxidativos (Chalker-Scott, 1999).

Euphorbia hirta L. es una hierba tropical común de ambientes ruderales, como orillas de parcelas, caminos y canales (Vibrans, 2009). Estudios preliminares han señalado la capacidad de esta especie para crecer en suelos contaminados con metales pesados, ante la exposición de mercurio, sus hojas acumulan el metal y aumentan la producción de pigmentos fotosintéticos (clorofilas) y sus tallos acumulan pigmentos no fotosintéticos (antocianinas), lo cual indica una respuesta protectora y adaptativa a la toxicidad de metales pesados (Puzón *et al*, 2015).

Muchas veces la producción de metabolitos secundarios compromete el desarrollo y crecimiento de las especies, es decir, una planta que crece bajo algún tipo de estrés activa su metabolismo secundario y ralentiza su crecimiento (Huot *et al*, 2014). En *E. hirta*, observaciones preliminares señalan que las hojas de plantas que crecen bajo sol son más rojas que aquellas que crecen en la sombra que suelen ser más verdes, lo que señalaría, una producción diferencial de clorofilas y/o de pigmentos rojos (presuntamente de antocianinas), por tanto, ¿Qué tan complejo es

el perfil químico de antocianinas que se activa en *E. hirta* bajo condiciones lumínicas saturantes? ¿Está comprometida la capacidad fotosintética de las hojas rojas de esta hierba ante la aparente disminución de pigmentos fotosintéticos? Y por ende ¿Cuál es entonces la relevancia de las antocianinas para la capacidad de fotosíntesis de *E. hirta*?

Por lo que en este estudio se pretende conocer si el crecimiento de *E. hirta* en condiciones lumínicas diferentes afectan la fisiología de su aparato fotosintético y si de alguna manera la mayor pigmentación por antocianinas es un recurso fotoprotector.

Son escasos los estudios ecofisiológicos para especies consideradas malezas. La habilidad de *E. hirta* de crecer en diversos hábitats y variadas condiciones resultan de especial interés para estudiar aspectos básicos de su fisiología en situaciones de estrés lumínica y cómo se ve afectado el aparato fotosintético o cómo son las respuestas metabólicas para su fotoprotección. Quizá ello signifique una explicación a su exitosa supervivencia en ambientes rústicos.

Esta investigación proporciona información acerca de cómo una planta con potencial de fitoremediación y con usos medicinales, modula su metabolismo primario y secundario a condiciones de luz contrastante. El estudio forma parte de la línea de investigación Antocianinas y su relevancia ecofisiológica del Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal de la UNICACH, los resultados de esta investigación aportarán conocimiento al entendimiento de la fisiología de *E. hirta* y a la ecofisiología de los metabolitos especializados. Además, dada la naturaleza de las antocianinas que la planta acumula la señala como una fuente con potencial farmacológico (Gratti *et al*, 2007).

II. MARCO TEÓRICO

2.1 *Euphorbia hirta* Linn.

Euphorbia hirta es miembro del género más diverso de la familia Euphorbiaceae, el cual está conformado por 2,100 especies, con amplia distribución en regiones tropicales y templadas, ocupando diversos hábitats, y con una amplia diversidad de formas de crecimiento (Pahlevani y Riina, 2011). Por lo general, las plantas de este género están provistas de látex y sus flores compuestas se agrupan en estructuras llamadas ciatios (Schikorr *et al.*, 2017).

2.1.1 Taxonomía y descripción botánica.

Reino: Plantae

División: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malpighiales

Familia: Euphorbiaceae

Género: *Euphorbia*

Especie: *Euphorbia hirta*

Nombre botánico: *Euphorbia hirta* Linn.

Sinonimia: *Euphorbia capitata* Lam., *Euphorbia pilulifera* Jacq., *Chamaesyce hirta* (L.) Millsp (Ghosh *et al.*, 2019).

Fue descrita por primera vez para la ciencia en 1753 por Carl Vonn Linnaeus en el volumen 1 de *Species plantarum* (Trópicos, 2021).

Es una hierba anual con una longitud de 40-60 cm. Con un tallo macizo y peludo, de color rojizo o violáceo, con estípulas, erecto o postrado (Figura 1 c). Las hojas son simples, opuestas, elípticas, pilosas en ambas superficies, oblongas a oblongo-lanceoladas, agudas o subagudas, verde oscuro arriba, pálido debajo, 1-2.5 cm de largo, manchadas de púrpura en el medio y margen dentado (Figura 1 a). La inflorescencia de *Euphorbia hirta* tiene un monoceso, terminal o axilar racimo de flores, llamado como 'cyathium', y con varios "cyathia" finamente dispuestos en cima

(Figura 1 b). Las flores masculinas y femeninas se condensan en un involucre y ambos apetalados. Las flores son unisexuales; las flores masculinas son sésiles, las bractéolas son lineales, con flecos, el perianto está ausente y posee 1 estambre, las flores femeninas tienen un pequeño pedicelo, el perianto está bordeado, el ovario es superior, cubierto de pelos diminutos, 3 celdas, posee 3 estilos pequeños y el ápice es doble. La duración de la floración suele ser durante todo el año. Los frutos son cápsulas de color amarillo con tres valvas que contienen tres semillas diminutas, oblongas, rojas de cuatro lados, cápsulas peludas, con quillas, de 1-2 mm de diámetro, de color marrón, de cuatro lados, angulares y arrugadas. Raíz principal: blanca o marrón (descripción tomada de Baibado y Cheung, 2015).

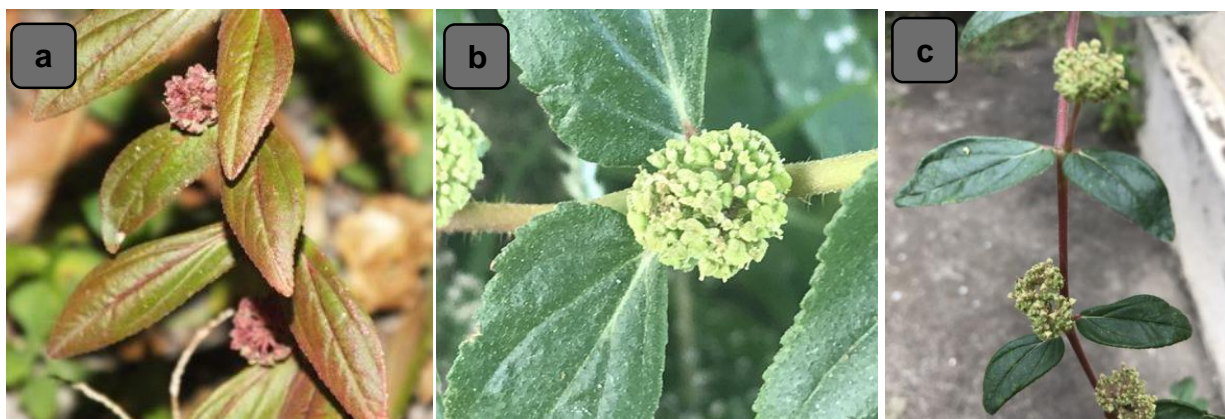


Figura 1. Aspectos morfológicos de *Euphorbia hirta* a) hojas maduras expuestas a luz directa. b) inflorescencia en forma de ciato. c) Tallo maduro rojizo.

2.1.2 Distribución

Euphorbia hirta es originaria de Centroamérica y del Sureste de México, su área de distribución nativa posiblemente se extienda desde América del Sur hasta el sur de los Estados Unidos, hay reportes de su introducción en países de Asia, Australia y África (Figura 2). Es una maleza que se distribuye por las zonas templadas, tropicales y subtropicales principalmente se encuentra en tierras bajas, arrozales, jardines, lugares baldíos y en los bordes de las carreteras. Prefieren condiciones secas y húmedas, desde el nivel del mar hasta los 2200 m de altitud (Steinmann *et al.*, 2002; Ghosh *et al.*, 2019).

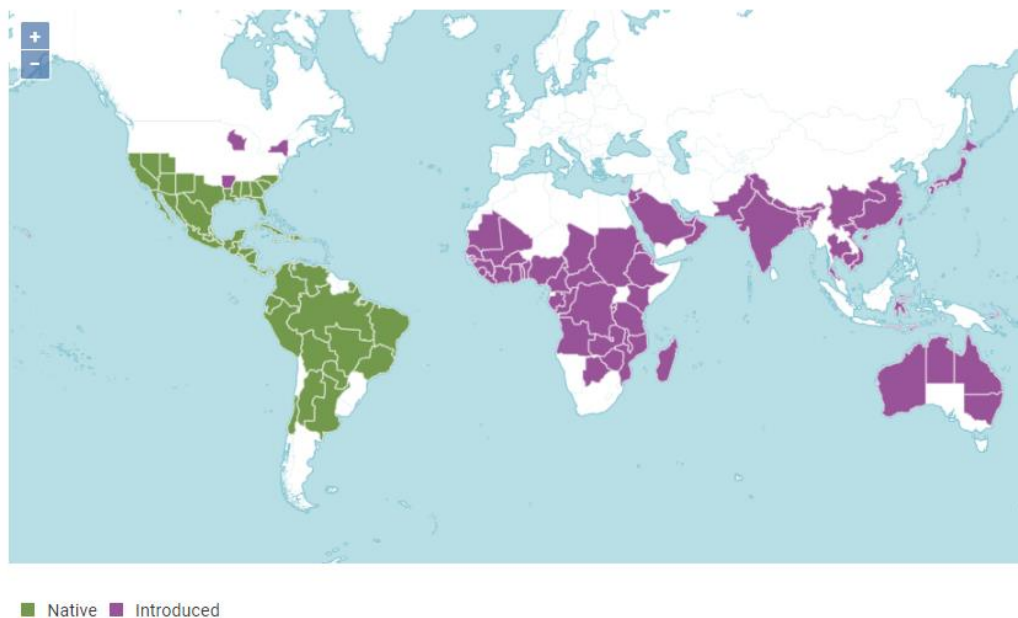


Figura 2. Distribución actual de *Euphorbia hirta* tomado de (Steinmann *et al.*, 2002).

2.1.3 Nombres vernáculos de *Euphorbia hirta*

E. hirta es una planta conocida con numerosos nombres (Cuadro 1) que aluden a su aspecto o a sus propiedades medicinales. En México es conocida como golondrina, jiotosa, riñonina, incluso se ha documentado sus nombres en varias lenguas indígenas, de este modo se le conoce como copatli y sabañoxihuit en lengua náhuatl, virush en tepehuano, xanab mukuy, xaway, xahauy, xjaaway en lengua maya y ja' ts'ojol, ja' uts'al en lengua tenek (BDMTM, 2009).

2.1.4 Usos tradicionales

Euphorbia hirta es una hierba muy popular entre los practicantes de la medicina tradicional se emplea para curar trastornos gastrointestinales (diarrea, disentería, parasitosis intestinal, molestias intestinales, problemas digestivos), enfermedades respiratorias (tos, resfriado, asma, bronquitis, fiebre del heno, enfisema) y en afecciones del aparato urinario (diurético y cálculos renales) (Asha *et al.*, 2014). Además, se usa para tratar afecciones de la piel y membranas mucosas, incluyendo verrugas, sarna, tiña, aftas, afecciones fúngicas, sarampión, gusano de Guinea y

como antiséptico para tratar heridas, llagas y conjuntivitis (BDMTM, 2009). La planta tiene la reputación de ser un analgésico para tratar el dolor de cabeza, el dolor de muelas, el reumatismo, los cólicos y también los dolores durante el embarazo. Se utiliza como antídoto y analgésico de las picaduras de escorpión y de serpientes. Es común el uso del látex para facilitar la eliminación de espinas de la piel (Kumar y Kumar, 2010). También tienen reportes como ansiolítico, antipirético, antiinflamatorio, antioxidante, anticancerígeno, inhibidor de aflatoxinas, antifertilidad, antihelmíntico, antiplasmodial, antiamebico, antipalúdico, actividades repelentes y antialimentarias contra *Plutella xylostella*. (Mohammad *et al.*, 2012).

Cuadro 1. Nombres vernáculos de *Euphorbia hirta* tomado de (Martínez, 1979).

País	Nombre
Arabia	Labeinah
Malasia	Ambin jantan
Estados Unidos	Asthma plant
Indonesia	Daun biji kacang
Sudán	Nanangkaan
Nueva Guinea	Sip
Nueva Bretaña	Gunantuna
Filipinas	Botobotonis
Laos	Mouk may
Tailandia	Nam nom raatchasee
Francia	Euphorbea fleusentete
India	Dudhi
Bangladesh	Boro Keruie
Japón	Gelang susu
Noruega	Demba sindji
Australia	Asthma herb
Vietnam	Corsuwra
Liberia	Tuagbono
Singapur	Moluccas, Sundan
China	Feiyangcao
México	Golondrina, hierba de sapo.

2.2 Aspectos generales de la fotosíntesis

La luz es la fuente primaria de energía para la vida sobre la tierra. La fotosíntesis, del griego antiguo (foto) "luz" y (síntesis) "unión", es el proceso por el cual las plantas utilizan la energía lumínica para transformar la materia inorgánica de su medio

externo en materia orgánica que utilizarán para su crecimiento y desarrollo. Consiste, básicamente, en la elaboración de azúcares a partir del CO₂ (dióxido de carbono) del aire, minerales y agua con la ayuda de la luz solar. En esta reacción se liberan moléculas de oxígeno (Labarthe y Pelta, 2009).

La fotosíntesis es el proceso bioquímico más importante de la Biosfera por varios motivos: a) permite la biosíntesis de materia orgánica a partir de la inorgánica que circulará de unos seres vivos a otros mediante las cadenas tróficas, para ser transformada en materia propia; b) produce la transformación de la energía luminosa en energía química, necesaria y utilizada por todos los organismos; c) libera oxígeno como subproducto, necesario para la respiración aerobia como oxidante; d) fue la causante del cambio producido en la atmósfera terrestre primitiva (anaerobia y reductora); e) la fotosíntesis generó la energía de los combustibles fósiles (carbón, petróleo y gas natural) y f) media el equilibrio necesario entre seres autótrofos y heterótrofos (Gil, 1995).

La fotosíntesis es importante para los vegetales como actividad primordial, Lo importante es el hecho de atrapar la energía luminosa y transformarla energía química disponible (Bidwell, 1990).

Para comprender de manera general cómo opera la fotosíntesis y cómo las plantas absorben la luz es necesario señalar que los pigmentos clorofílicos (los pigmentos más abundantes en la tierra) deben su color verde a su capacidad de absorber las fracciones roja y azul de la luz solar, transmitiendo los demás colores cuya mezcla se aprecia en diversos tonos de verde. En las plantas vasculares las moléculas de clorofila están organizadas en estructuras captadoras de luz, denominados complejos antena, constituidos por pigmentos unidos a proteínas y que a su vez están conectados por los fotosistemas (PS I y PS II) a través de un centro de reacción que contienen los aceptores y transportadores de electrones que llevan los electrones excitados por los fotones absorbidos hasta moléculas de NADP oxidado (aceptores) que se transforman en NADPH reducido (Manrique Reol, 2003).

Cuando una molécula de clorofila capta un fotón, uno de sus electrones se excita y pasa a un nivel de mayor nivel energética. Este estado excitado es estable por muy poco tiempo (~10 s) e inmediatamente sucede una de las tres transiciones siguientes:

- Transferencia de la energía a otra molécula de clorofila sucesivamente hasta que se alcanza el centro de reacción del fotosistema correspondiente (PS I o PS II) y el electrón pueda ser utilizado en el proceso fotoquímico,
- Retorno al nivel básico emitiendo la energía en forma de calor y no emitiendo ningún tipo de fotón
- Emisión de calor por la expulsión de un fotón con mayor energía que la absorbida en un proceso que se conoce como fluorescencia.

Estas transiciones disipan la energía absorbida. La mayor parte de la fluorescencia emitida proviene de la clorofila *a* del PSII. La cantidad de fluorescencia emitida es una medida de la eficiencia de la transferencia de los electrones; ésta incrementa si la transferencia o el proceso fotoquímico está limitado por algún factor o en condiciones de luz excesiva, produciéndose una sobrecarga de electrones excitados que puede ser dañino para la propia célula (Manrique-Reol, 2003).

La fotosíntesis comprende tres etapas básicas; las dos primeras están mediadas por la fase luminosa: 1) la absorción de cuantos, de luz por la clorofila o la transferencia de energía a la clorofila por otros pigmentos capaces de absorber la luz, que resulta en una transferencia de electrones a través de una serie de acarreadores o donadores aceptores como los citocromos (en este proceso están involucradas una serie de reacciones de óxido-reducción (Raven *et al.*, 1992). 2) la fotólisis y deshidrogenación del agua para liberar el oxígeno de ésta. En esta etapa, la energía de la luz absorbida por la clorofila, eleva el nivel energético de los electrones, y parte de esa energía se utiliza para producir ATP y NADPH (Raven *et al.*, 1992). 3) la última etapa de la fotosíntesis es la fase oscura o “reacción oscura”, en la que no se requiere directamente la luz del sol, en ella el CO₂ es reducido por el NADPH, formándose azúcares de 4,5,6 y/o 7 átomos de carbono (Raven *et al.*, 1992).

2.2.1 Respuestas de la fotosíntesis al ambiente

La fotosíntesis es un proceso complejo que funciona de manera integrada y eficiente en un medio en el que existe una enorme variabilidad natural de factores que la afectan, como la luz, temperatura, humedad del aire, disponibilidad hídrica y de nutrientes minerales en el suelo. A estos factores puede añadirse también la proporción del dióxido de carbono (CO_2), principal sustrato de la fotosíntesis, por el rápido aumento de la concentración de este gas en la atmósfera a consecuencia del cambio climático (Azcón y Talón, 2013).

Cada factor ambiental afecta a la tasa de la fotosíntesis de manera distinta, por ejemplo; una planta bajo iluminación baja es probable que muestre una intensidad de respiración mayor a su tasa fotosintética, liberando más CO_2 del utilizado en el intercambio de gases entre la planta y el ambiente, hasta alcanzar el "punto de compensación de luz", condición lumínica en la que se iguala la cantidad de CO_2 liberada por respiración con el CO_2 absorbido por fotosíntesis (Lallana y Lallana, 2003).

La temperatura de la planta también está estrechamente relacionada con la temperatura ambiental. Ello significa que la fotosíntesis sucede en un intervalo de temperaturas, así, se encontrará actividad fotosintética próxima a los $0\text{ }^\circ\text{C}$ en plantas alpinas y cercana a los $50\text{ }^\circ\text{C}$ en algunas especies de desiertos cálidos. El aumento de temperatura acelera las reacciones químicas de la fotosíntesis hasta alcanzar un máximo o llamado "temperatura óptima" de esa especie por encima del cual comienzan a cerrarse las estomas para no perder agua con lo que aumenta el O_2 y disminuye el CO_2 que paralizan la fotosíntesis, además de que las enzimas fotosintéticas se desnaturalizan con el calor, con lo que se paraliza o disminuye la fotosíntesis. En condiciones hídricas adecuadas, la tasa fotosintética de las plantas alcanza su valor máximo cuando se combinan condiciones óptimas de CO_2 , luz y temperatura. La capacidad fotosintética varía entre las especies y también como respuesta a otros factores, por ejemplo, la disponibilidad de nutrientes minerales, especialmente el nitrógeno y fósforo. El nitrógeno forma parte de las enzimas y la

clorofila, normalmente existe una fuerte correlación entre el contenido de nitrógeno de las hojas y los contenidos de clorofila. En cuanto al fósforo, este forma parte de la molécula de ATP, que se produce en la fotosíntesis mediante el acoplamiento de la ATP sintasa con el transporte electrónico en la membrana tilacoidal. Una deficiencia de fósforo reduce la fotosíntesis (Salisbury, 1994).

La capacidad fotosintética es también sensible al estrés hídrico, las infecciones por organismos parásitos, simbióticos o patógenos (hongos, bacterias, virus), y la presencia de contaminantes ambientales, tanto en el aire (dióxido de azufre, óxidos de nitrógeno, ozono) como en el suelo (metales pesados como el cadmio, el plomo o el arsénico; Sierra, 2006).

2.2.2 Respuesta de la fotosíntesis frente a distintos ambientes lumínicos

Entre los factores que afectan a las plantas, la radiación solar es quizás la más heterogénea en el espacio y el tiempo, es la que proporciona energía para la fotosíntesis y esta a su vez sirve como señales en la fotorregulación del crecimiento y desarrollo de la planta (Jaimes-Correa, 2015).

El tipo y cantidad de radiación influye en el desarrollo de muchos procesos fisiológicos de las plantas (Kohen *et al.*, 1995, Valladares, Aranda y Sánchez-Gómez, 2004), limita la supervivencia y crecimiento de las plantas en muchas especies tropicales ya que, aunque un incremento en la absorción de la radiación fotosintéticamente activa puede estimular el crecimiento y la supervivencia, la alta intensidad de luz puede ser estresante, provocando una limitación en su crecimiento y efectos negativos de fotoinhibición (Dávila, 2009). El término fotoinhibición fue definido originalmente por Kok en 1956 (Yordanov y Veleikova, 2000) como una reducción de la fotosíntesis por un exceso de radiación, es un tipo de estrés que al igual que la sombra afecta de modo importante el rendimiento de las plantas (Adir *et al.*, 2003).

Las plantas tienen la capacidad de responder a distintos niveles de exposición a la luz con cambios en la estructura interna del tejido fotosintético, como cantidad y distribución de parénquima en empalizada y esponjoso, así como de la estructura externa. La hoja y sus características fotosintéticas se adaptan a la irradiancia, en general, las hojas que se han desarrollado a una alta exposición de irradiancia poseen una mayor capacidad fotosintética por unidad de área en comparación con las hojas de sombra (Niinemets y Tenhunen, 1997).

En la sombra las plantas están más limitadas en la captación de luz (mayor inversión de nitrógeno en pigmentos). La respuesta a un incremento abrupto en los niveles de luz, como el que se da en la apertura de un claro del bosque, está determinada por la formación de nuevas hojas adaptadas a las nuevas condiciones lumínicas o bien por la aclimatación de las preexistentes. En las plantas tropicales, las especies pioneras son más resistentes a la fotoinhibición que las especies tolerantes a la sombra (Castro *et al.*, 1995). En general, las plantas de la sucesión temprana tienen puntos de compensación lumínica altos, así como tasas máximas de fotosíntesis altas, y bajas eficiencias cuánticas: presentan alta conductancia estomática, alto contenido de la enzima rubisco, baja resistencia al transporte de agua a través del sistema vascular y altas tasas de transpiración con relación a las plantas sucesionales intermedias y tardías. En contraste, las hojas de la parte interior de la copa, las plántulas del sotobosque y las especies de la sucesión tardía, presentan puntos de compensación y saturación bajos y altas eficiencias cuánticas, su capacidad fotosintética es menor, su crecimiento más lento y su madera más dura y pesada. Las altas tasas de regeneración y crecimiento de las especies pioneras tienden a coincidir con altas capacidades fotosintéticas (Adir *et al.*, 2003).

2.3. Antocianinas: pigmentos de significancia ecológica

Las antocianinas, del griego *anthos* = flores y *kianos* = azul, son una familia de metabolitos secundarios que pertenecen al grupo de los fenoles, son las responsables de los diferentes tonos rojos y azules de la mayoría de las flores y los frutos (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). También se pueden encontrar en las raíces,

hojas, cubiertas de semillas, tallos y bulbillos (Su-Ling y Celli, 2019). Son glucósidos de las antocianidinas, derivados flavonoides producidos a través de la vía fenilpropanoide; el color y la estabilidad de estos pigmentos está influenciada por el pH, la luz, la temperatura y la estructura (Mattioli *et al.*, 2020).

2.3.1 Estructura química

Las antocianinas están compuestas por una antocianidina y uno o más azúcares, la antocianidina consta de dos anillos aromáticos (A y B) unidos por otro anillo de 3 C. Las variaciones del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas (Figura 3; Garzón, 2008).

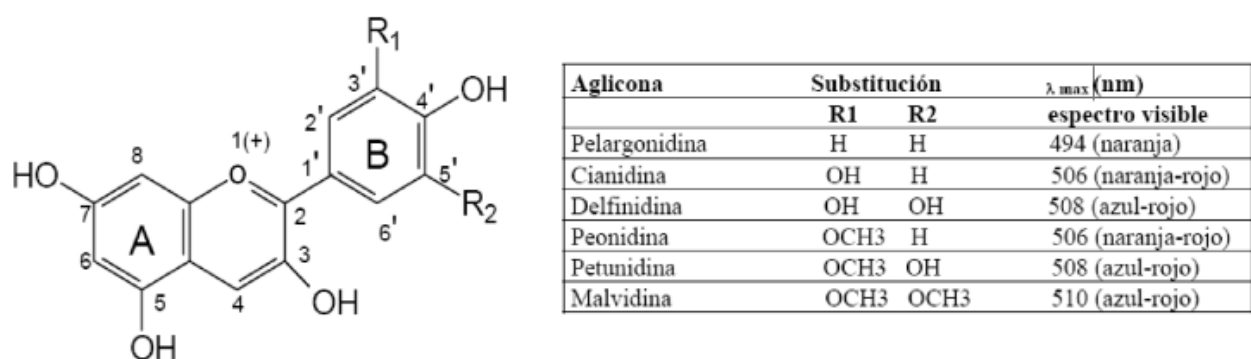


Figura 3. Estructura y sustituyentes de las antocianinas (Durst y Wrolstad, 2001).

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas. En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas (azúcares) en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Dentro de los sacáridos glicosilantes se encuentran la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, sofrorosa, sambubiosa y gentobiosa. Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos pueden ser alifáticos, tales como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: p-coumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico, o p-hidroxibenzóico. Stintzing *et al.*, 2002, demostraron que el tipo de sustitución glicosídica y de acilación producen efectos en el tono de las antocianinas; es así

como sustituciones glicosídicas en la posición 5 al igual que acilaciones aromáticas, acentúan las tonalidades púrpuras (Garzón, 2008).

2.3.2 Biosíntesis

La vía biosintética de las antocianinas esta bien caracterizada y es una red muy conservada en las plantas (Holton y Cornish, 1995; Tanaka y Ohmiya, 2008). La vía biosintética (Figura 4) es una extensión de la ruta general de los flavonoides, comienza con la síntesis de la chalcona a partir de 4-cumaroil-CoA y malonil-CoA mediada por la sintasa de chalcona (CHS). Luego, la chalcona es isomerizada por la chalcona isomerasa (CHI) a naringenina. La flavanona 3-hidroxilasa (F3H) convierte la naringenina en dihidrokaempferol que puede ser hidroxilada por el flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H) o flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) en otros dos dihidroflavonoles, dihidroquercetina o dihidromiricetina, respectivamente. A continuación, los tres dihidroflavonoles se convierten en leucoantocianidinas incoloras por la dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) y posteriormente en antocianidinas coloridas por la antocianidina sintasa (ANS). Finalmente, las moléculas de azúcar son unidas a las antocianidinas por enzimas glicosiltransferasas, por ejemplo, flavonoide 3-O-glucosiltransferasa (UFGT), y podría acilarse adicionalmente con grupos acilo aromáticos mediante aciltransferasas. CHS es la enzima clave inicial de la biosíntesis de flavonoides y F3'H y F3'5'H son las principales enzimas responsables de la diversificación de las antocianinas al determinar su patrón de hidroxilación del anillo B y, en consecuencia, su color (Tanaka y Brugliera, 2013).

2.3.3 Las antocianinas en la fotoprotección

Tanto en plantas como en animales, la absorción de la luz ultravioleta puede provocar un daño celular resultante de la dimerización de los ácidos nucleicos. Las intensidades excesivas de radiación visible también pueden inducir daño celular por foto-oxidación, como resultado de la simulación inducida por la luz de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las plantas han desarrollado dos estrategias básicas para minimizar los impactos fisiológicos del estrés inducido por la luz: a) prevenir la

ocurrencia de intensidades de luz dañinas (mecanismos de supresión o evitación) o b) invertir en mecanismos que respondan a los eventos desencadenados por la luz, daños provocados (mecanismos de recuperación o tolerancia). Debido a su capacidad para capturar fuertemente la luz visible, las antocianinas tienen el potencial de actuar como pigmentos fotoprotectores que bloquean la luz antes de que puedan dañar las células (Timmins *et al.*, 2002).

El exceso de luz para una planta sucede cuando la tasa de absorción de fotones excede su tasa de utilización en la fotosíntesis, ya que genera procesos que dañan significativamente al fotosistema II (centro de reacción), así como membranas y proteínas por la presencia oxígeno “singlete”, superóxido y otros radicales libres sensibilizados por la luz (Timmins *et al.*, 2002).

Existen numerosos mecanismos y sitios de vulnerabilidad del aparato fotosintético que pueden conducir a su autodestrucción. No es raro que las plantas hayan evolucionado una serie de defensas químicas contra el exceso de energía lumínica, que van desde procesos que disipan inofensivamente el exceso de fotones en forma de calor y otros que permiten el transporte de electrones fotosintéticos para continuar la rotación incluso ante una baja disponibilidad de CO₂ o una baja capacidad de la enzima rubisco (Timmins *et al.*, 2002).

Las antocianinas cumplen un rol importante para la protección de las plantas y son más comunes en los tejidos que se están expandiendo recientemente, en senescencia o aquellas que están experimentando estrés ambiental, en los dos primeros casos, prestan atención a un mecanismo fotoprotectivo que va más allá del de otros pigmentos directamente implicado en la fotoprotección a nivel de cloroplasto. Una serie de estudios ha proporcionado evidencias de cómo funcionan las antocianinas como protectores solares en hojas maduras, frutos en desarrollo y hojas en expansión. La característica común de estos estudios es la demostración de una fotoinhibición reducida en los tejidos que contienen antocianinas en comparación con los que carecen de antocianinas (Garzón, 2008).

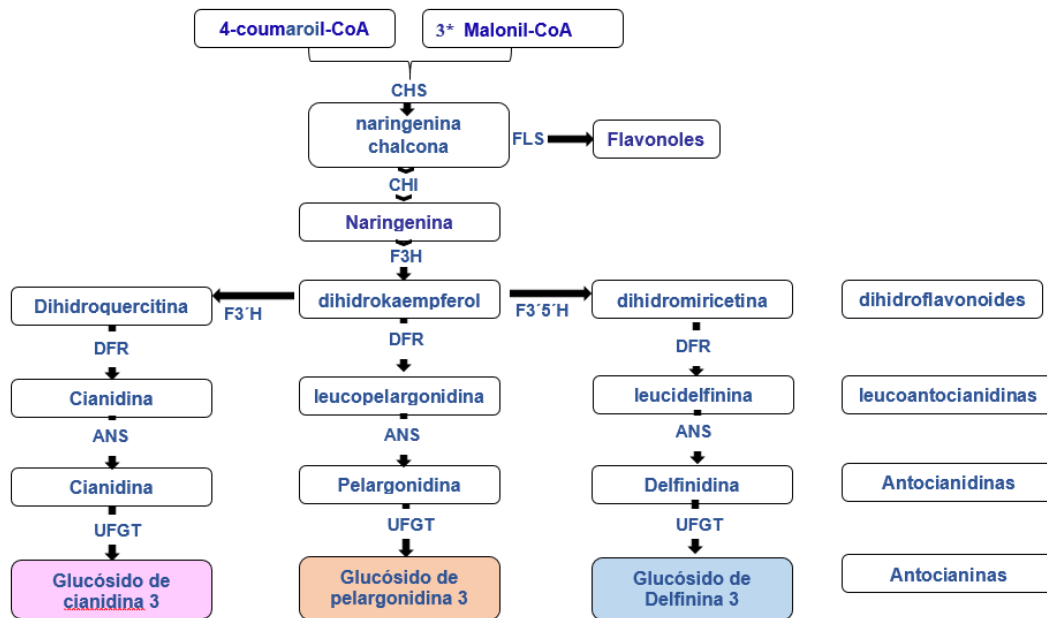


Figura 4. Representación esquemática de la vía biosintética de las antocianinas. CHS, calcona sintasa; CHI, calcona isomerasa; F3H, flavanona 3-hidroxilasa; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilasa; F3'5'H, flavonoide 3', 5'-hidroxilasa; DFR, dihidroflavonol 4-reductasa; ANS, antocianidina sintasa; UFGT, flavonoide 3-O-glucosiltransferasa; FLS, flavonol sintasa. (Liu *et al.*, 2018).

III ANTECEDENTES

3.1 Estudios de metabolitos secundarios en Euphorbiaceae y *Euphorbia*.

Muchas euforbiáceas poseen látex que contiene aceites, taninos, resinas y sustancias gomosas, varios de estas sustancias son productos de su metabolismo secundario. A esta familia pertenecen plantas bastante conocidas como el árbol del caucho (*Hevea brasiliensis*), la yuca (*Manihot utilissima*), el ricino (*Ricinus communis*) y la flor de noche buena (*Euphorbia pulcherrima*). Otras producen sustancias colorantes como la kamala (*Mallotus philippensis*), gomas como las especies de géneros *Hevea*, *Manihot* y *Sapium* (Bittner *et al.*, 2001).

Varios géneros de las euforbiáceas producen flavonoides, particularmente flavonas y flavonoles. También se presentan flavononas pero en relativamente pocas especies. Los flavonoides están en varias partes de las plantas, a excepción de las raíces. Flavonoles canferol y guercetina (y sus glicósidos) están más ampliamente distribuidos en la familia (Salamanca, 2018).

Particularmente en el género *Euphorbia* se han identificado como compuestos fenólicos (flavonoides, cumarinas, entre otros), esteroides, esfingolípidos, cerebrósidos, triterpenos y diterpenos; estos últimos se han centrado la mayor atención. Hasta ahora se han aislado alrededor de 400 diterpenos de *Euphorbia* con 23 tipos de esqueletos, entre los que destacan los casbanos, mirsinanos, dafnanos, tiglianos, abietanos; jatrofanos y latiranos. Algunos de este último tipo han mostrado actividad como moduladores de la resistencia a fármacos (Mogollón *et al.*, 2016).

Revisiones recientes han reportado el contenido de fenoles para el género. Gratti *et al.*, (2007) analizaron las partes aéreas de *Euphorbia* de la Patagonia mostrando que el contenido variable de antocianinas y fenoles totales estuvo asociado a la temperatura y la exposición a la luz solar. Espadero *et al.* (2019) realizaron un análisis de los compuestos extraídos en las hojas de *Euphorbia aff.*

viridis y confirmaron la presencia de fenoles, taninos, cumarinas, lactonas, quinonas, saponinas y catequinas.

3.2 Estudios fitoquímicos y fisiológicos de *Euphorbia hirta*.

Bhagwat *et al.*, (2008) obtuvieron extractos de las hojas de *E. hirta* mediante la técnica en soxhlet con éter de petróleo, cloroformo, acetona y el macerado en frío con agua y etanol. Los resultados revelaron la presencia de grasas, esteroides, alcaloides, carbohidratos, proteínas y compuestos fenólicos como flavonoides, taninos y saponinas. Además, se encontró que los extractos de acetona y etanol contenían mayor cantidad de compuestos fenólicos.

Pinto *et al.*, (2014) detectaron la presencia de flavonoides, cumarinas, mucílagos y resinas en hojas, tallo y raíz de *E. hirta*.

Otro estudio de interés farmacológico han sido el de Gopi *et al.*, (2015) que analizaron *in vitro* e *in vivo* en ratones el efecto de *E. hirta* y sus componentes contra el veneno de la serpiente *Naja naja*. Los autores encontraron que el extracto metanólico de *E. hirta* pudo inhibir los efectos del veneno.

Yadav y Singh (2011) determinaron que el polvo del latex de *E. hirta* es tóxico para los caracoles de agua dulce *Lymnaea (radix) acuminata* e *Indoplanorbis exustus*. Las combinaciones mostraron un efecto significativo dependiente del tiempo y de la dosis contra ambos caracoles.

En cuanto a estudios morfofisiológicos Puzón *et al.*, (2015) evaluaron la capacidad de *E. hirta* para trasladar y acumular el metal pesado mercurio (Hg). Mediante la técnica de hidroponía se cultivaron plantas con soluciones nutritivas de Hoagland y con 0.1 y 10 ppm de HgCl₂. Se observó que la longitud de los tallos jóvenes aumentó al aumentar la concentración de HgCl₂. Aunado, a ello el contenido de antocianinas en los tallos maduros fue mayor en las plantas tratadas con Hg, mientras que la tendencia inversa se observó en tallos jóvenes. Además, las

clorofilas totales y la clorofila b fueron mayores en hojas maduras de plantas expuestas al metal pesado. Por otro lado, el método de generación de vapor de hidruro por espectrofotometría de absorción atómica reveló la capacidad de *E. hirta* para translocar y acumular Hg en sus hojas.

IV OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4.1 Objetivo General

Evaluar las respuestas del metabolismo antocianínico y fotosintético de las hojas de *Euphorbia hirta* en condiciones de variación lumínica.

4.2 Objetivos particulares

- Determinar la composición de antocianinas foliares de *Euphorbia hirta* en lumínicas variables.
- Caracterizar los parámetros fotosintéticos de las hojas de *E. hirta* desarrolladas en luz variable.
- Relacionar el contenido de antocianinas con los parámetros fotosintéticos foliares de *E. hirta* en respuesta a situaciones de luz variable.

4.3 Hipótesis

La luz es un estímulo clave para la biosíntesis de antocianinas, la producción de estas moléculas coloridas requiere de exposiciones prolongadas a la luz, por lo que plantas de *Euphorbia hirta* crecidas en condiciones lumínicas altas deben acumular mayor cantidad de antocianinas que plantas crecidas en sombra, con posibles repercusiones en su metabolismo fotosintético.

V MÉTODO

5.1 Diseño general del estudio

El estudio se llevó a cabo en CU el cual comprendió cuatro etapas a) Localización y recolecta de plantas creciendo en condiciones lumínicas plenas y bajo sombra; b) Determinación espectrofotométrica de antocianinas; c) Cuantificación espectrofotométrica de pigmentos fotosintéticos y d) Toma *in situ* de lecturas fisiológicas de fotosíntesis con un analizador de gases por medio de luz infrarroja (IRGA) (Figura 5).



Figura 5. Diagrama de flujo del método a seguir durante el experimento

5.2 Métodos

5.2.1. Caracterización aspectos fisiológicos y desarrollo foliar de las hojas de *E. hirta*

Se localizaron ejemplares de plantas de *E. hirta* en el campus de ciudad universitaria de la UNICACH en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas creciendo en condiciones de luz y sombra. Las condiciones de sombra estuvieron provocadas por la sombra de árboles o edificios cercanos a ellos. Las plantas a luz fueron consideradas aquellas que estuvieran al escampado o fuera de cualquier sombra. Se seleccionaron 60 ejemplares en cada condición lumínica que se separaron para los análisis *in situ* y en el laboratorio. Cada planta se dividió en tres secciones foliares de acuerdo con

su madurez, hojas inmaduras, maduras y senescentes a los cuales se les tomaron registros visuales fotográficos (Figura 6).

5.2.2 Extracción y análisis de antocianinas

Los métodos de extracción y análisis de antocianinas se realizaron de acuerdo a la técnica de Lee, Durst y Wrolstad (2005). Para la extracción se pesó alrededor de 2 g hojas frescas de cada sección (inmaduras, maduras y senescentes) con 10 repeticiones y se dejó macerar durante 24-36 horas en una disolución amortiguadora de extracción (99:1; MeOH:HCl 1 N).

Para la cuantificación de antocianinas se utilizó el método de pH diferencial que tiene como fundamento determinar la absorbancia a dos longitudes de onda (520 y 700nm) en dos pH diferentes, a pH 1.0 y pH 4.5. Para ello se usaron dos alícuotas de 1ml de extracto de antocianinas y se diluyeron en 3ml en cada disolución amortiguadora y se registró la absorbancia de cada disolución a 520 y 700 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Genesys 10 UV espectral).

La concentración de antocianinas se calculó con la siguiente fórmula:

$$\frac{A \times PM \times FD \times 10^3}{\epsilon \times L}$$

Donde:

A= Diferencia de absorbancia a Ph y longitudes diferentes ($A_{520nm} - A_{700nm}$) Ph 1.0- ($A_{520nm} - A_{700nm}$) ph 4.5

PM= Peso molecular de la cianidina-3-glucósido ($449.2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), utilizada como referencia

FD: Factor de disolución

l= Grosor de la celda en cm

ϵ = 26 900 coeficiente de extinción molar en $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ de cianidina 3-glucósido

10^3 = Factor de conversión de g a mg.

5.2.3 Extracción y análisis de pigmentos fotosintéticos

La cuantificación de clorofilas y carotenoides se realizó con el método modificado de Rodés y Collazo (2006) y Hu, Tanaka y Tanaka (2013). La extracción de clorofilas se realizó con 0.1 g de hojas frescas de cada sección (inmaduras, maduras y senescentes) con 10 repeticiones, el tejido se colocó directamente en un mortero y se molió en mortero de porcelana a 4°C con 5 ml de acetona al 80% a 4°C y 0.5

gramos de carbonato de calcio y se dejó macerar durante 20-24 horas. Se centrifugó a (6000 rpm) dos veces, y después se filtró al vacío.

Para la cuantificación se tomó 0.7 ml del extracto obtenido y se diluyó a 2.8 ml con acetona al 95% (dilución 1:4). Para las clorofilas se midió la absorbancia a 663 nm y 665 nm y para carotenoides a 440 nm.

La concentración de clorofila a y b y c carotenoides (mg L^{-1}) se determinó con las fórmulas de Rodés y Collazo (2006).

$$C_a (\text{mg L}^{-1}) = 12.7 (A_{663})$$

$$C_b (\text{mg L}^{-1}) = 22.9 (A_{645})$$

$$C_{\text{car}} = 4.695 (A_{440}) - 0.268 (C_a + C_b)$$

Donde:

C_a : concentración de clorofila a A_{663} = Absorbancia a 663

C_b : concentración de clorofila b A_{645} = absorbancia a 645

C_{ca} : concentración de carotenoides A_{440} = Absorbancia a 440

5.2.4 Medición de fotosíntesis

El intercambio gaseoso se realizó con 10 plantas en cada condición y en cada tipo de hoja, en particular, se registro con un analizador infrarrojo de gases (IRGA) LI-COR, LI-6400 XT®, realizando mediciones puntuales entre las 10–11 A.M. (Castro-Moreno *et al.*, 2013). Se consideraron los valores de asimilación neta de CO_2 de las hojas de *E. hirta* (A_{net}), Concentración de carbono intracelular (C_i), Transpiración y Conduntacia estomática, con C_i y A_{net} se calculó la eficiencia de la enzima Rubisco.

5.2.5 Análisis estadísticos

Las pruebas se realizaron para cada fase empleada. La abundancia de antocianinas, clorofilas totales, a y b, y carotenos se comparó con un diseño aleatorio simple del mismo tejido en las fases de desarrollo foliar (inmaduras, maduras y senescentes) mediante análisis de Kruskal-Wallis y separación de grupos por la prueba de Mann-Whitney con 95% de confiabilidad.

Se realizaron gráficos estadísticos de Boxplot utilizando el programa estadístico PAST (Hammer y Harper, 2000) para representar el resumen y la varianza de abundancia de pigmentos de cada sección foliar para ambas condiciones.

VI RESULTADOS

6.1 Descripción de plantas de *Euphorbia hirta* crecidas en distintas condiciones lumínicas.

Las plantas crecidas en los dos sitios de estudio en CU mostraron que las condiciones lumínicas contrastantes parecen haber influido en la coloración de las hojas de *E. hirta*, en general son visiblemente más verdes en plantas crecidas a la sombra, mientras que tonos más rojos son perceptibles en las plantas crecidas a pleno sol. También se observaron diferencias asociadas al grado de desarrollo de las plantas con condición lumínica completa: a) las hojas senescentes, ubicadas en la parte inferior de la planta, mostraron las tonalidades más rojizas debido a que en ocasiones la coloración llega a cubrir la lámina foliar completamente; b) las hojas maduras, ubicadas en la parte media de la planta, tenían láminas con manchas rojas irregulares que se distribuyeron siempre desde el ápice de la hojas hasta su base en el tallo; c) las hojas jóvenes ubicadas en el ápice de la planta exhibieron pocos manchones rojizos, principalmente en el ápice (Figura 7).

En los tallos también se percibía un tono rosa-rojizo constante en toda la planta en ambas condiciones lumínicas (Figura 6).



Figura 6. Aspectos foliares de tres secciones foliares de *Euphorbia hirta* silvestre crecidas en condiciones lumínicas contrastantes. A) bajo sol y B) bajo sombra.

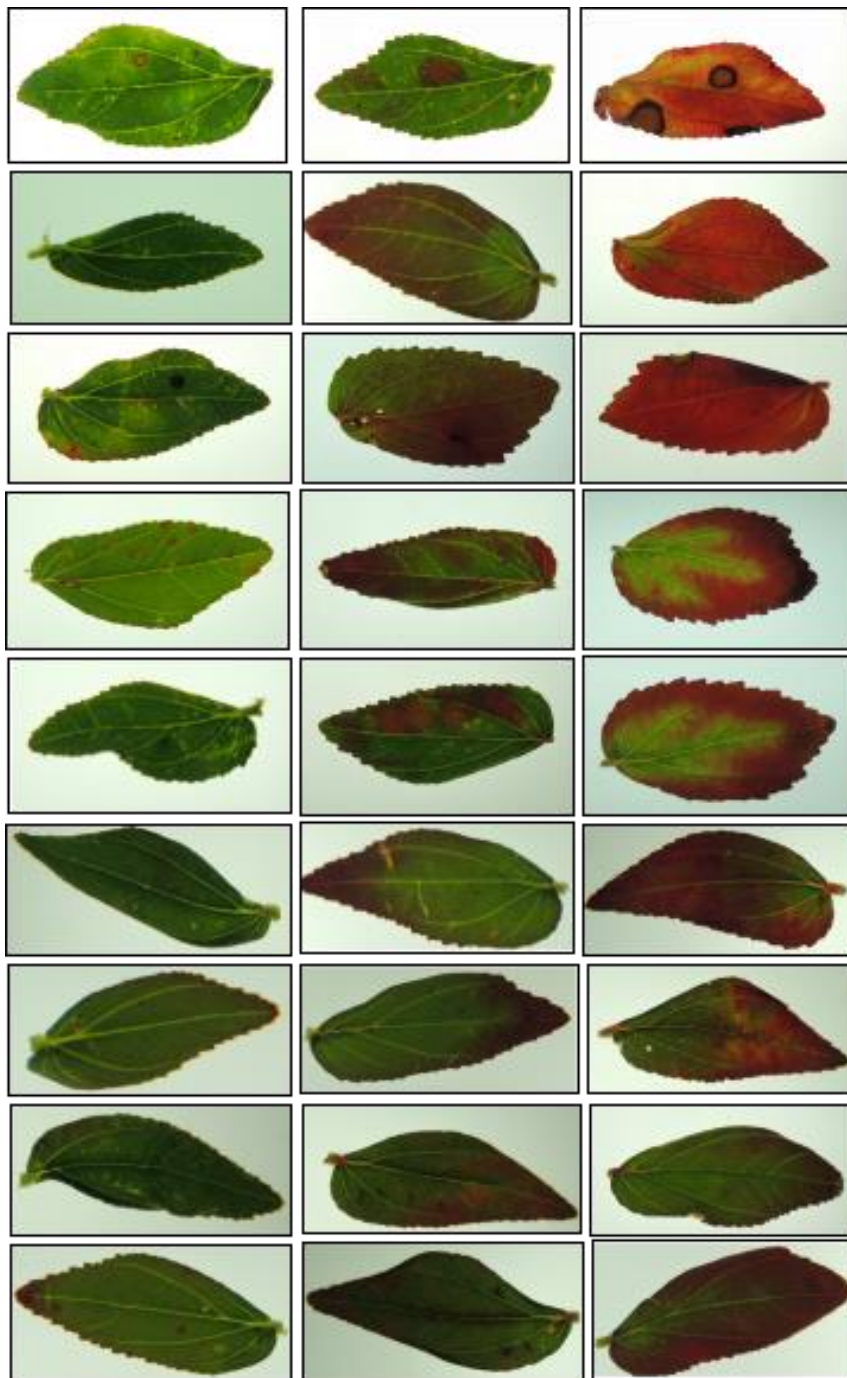


Figura 7. Variación en la pigmentación foliar de plantas de *Euphorbia hirta* crecidas en condiciones lumínicas plena. Columnas de izquierda a derecha, inmaduras, maduras y senescentes.

Aunque no fue planteado originalmente en el estudio, a partir de observaciones de las hojas en ambas condiciones de crecimiento y grado ontogénico, se puede señalar que la distribución de la pigmentación roja parece tener un patrón que podría ser estudiada con mayor profundidad (Figura 8).

En la mayoría de las hojas los ápices y los márgenes rojos, regularmente los peciolas también presentan pigmentación roja. En hojas con menos tonos rojos se pueden observar manchones rojos puntuales, que podría indicar que posteriormente se van agrandando en número y tamaño hasta tal vez abarcar grandes áreas de las hojas. También se observaron círculos blancos “vacíos” tal vez por herbivoría cuya periferia son rojas, como si la pigmentación sirviera para delimitar la zona dañada. Las venas foliares no parecen acumular estos pigmentos.



Figura 8. Aspectos de la distribución de la pigmentación foliar de plantas de *Euphorbia hirta*.

En alguna hoja (primer hoja superior derecha figura 7) se observan manchas necróticas, que podrían ser por efecto del sol o bien por hongos, la forma y coloración es diferente.

6.2 Antocianinas durante el desarrollo foliar de *Euphorbia hirta*.

Las diferencias coloridas visibles para ambos órganos de la planta crecidas en condiciones lumínicas contrastantes se describieron en función de las tres fases de desarrollo detectadas, considerando la cuantificación de pigmentos no fotosintéticos (antocianinas) y de algunos aspectos del metabolismo primario (abundancia de pigmentos fotosintéticos y tasa de asimilación de CO₂).

Plantas crecidas al sol tuvieron hojas que acumularon mayor cantidad de antocianinas (condición luz [$p=0.0196$] y sombra [$p=0.1331$]); las hojas senescentes o maduras de ejemplares que crecieron en condiciones de sol pleno tuvieron en promedio hasta siete veces más cantidad de antocianinas (177-221 mg Antocianinas.gHoja⁻¹) que sus contrapartes que crecieron bajo sombra (24-55 mg Antocianinas.g H⁻¹). Las hojas jóvenes en ambas condiciones lumínicas producen la misma cantidad de antocianinas (24.8 vs 27.5 mg Antos.g H⁻¹).

El grado de desarrollo foliar es un factor relevante en la producción de antocianinas frente a las condiciones lumínicas saturantes ($p=0.0196$), se observó que las hojas maduras y senescentes acumularon entre siete y nueve veces más pigmentos antocianínicos que las hojas jóvenes ($p<0.05$); sin embargo, entre hojas maduras y senescentes no hubo diferencia en la proporción de antocianinas que almacenaron ($p>0.05$). Las plantas de sombra no mostraron diferencias asociadas al grado de desarrollo ($p=0.1331$).

De manera particular, se observó que las plantas bajo sol tuvieron una mayor variación de la cantidad de antocianinas foliares que las que crecieron bajo sombra (Figura 9) (Cuadro 2). En un 25% de los ejemplares recolectados se detectaron hojas maduras y senescentes con 350 y 430 mg.g de antocianinas por g de material vegetal, es decir hay hojas “superacumuladoras” con entre 2 y 3 veces más que el promedio de los ejemplares.

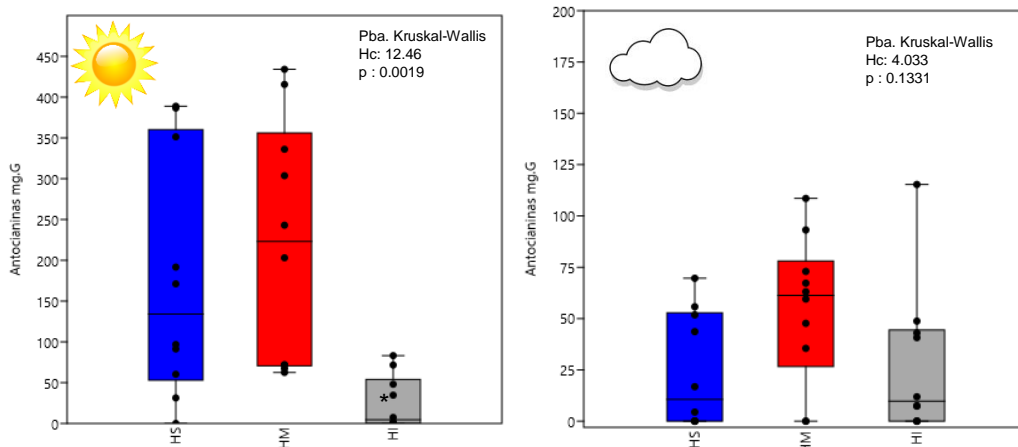


Figura 9. Abundancia de antocianinas en las hojas de *Euphorbia hirta*. Bajo a) sol pleno, b) sombra

Cuadro 2. Comparaciones estadísticas de la acumulación de antocianinas de *Euphorbia hirta* en dos condiciones lumínicas

	Hojas senescentes	Hojas maduras	Hojas inmaduras
Hojas senescentes		Luz: 0.4727 Sombra: 0.0718	Sol: 0.0900 Sombra: 0.9692
Hojas maduras	Luz: 0.4727 Sombra: 0.0718		Sol: 0.0011 Sombra: 0.1184
Hojas inmaduras	Luz: 0.009 Sombra: 0.9692	Luz: 0.0011 Sombra: 0.1184	

6.3 Antocianinas de los tallos de *Euphorbia hirta* durante su desarrollo

En la presencia y distribución de antocianinas en los tallos se presentó una situación a la inversa de lo observado en las hojas, ya que estas moléculas fueron detectadas en mayor abundancia en tallos desarrollados bajo sombra (con promedios de 11.0 a 11.6 mg Antocianinas.gHoja⁻¹) que en tallos de plantas crecidas a luz directa (1.5-4.7 mg Antocianinas.gHoja⁻¹).

La proporción de antocianinas en los tallos no presentó diferencias estadísticas asociadas al grado de desarrollo en ninguna de las condiciones (condición de sombra [p=0.5376] y luz [p=0.9612]), es decir la presencia de

antocianinas es uniforme en todo el tallo en contraste a lo descrito en las hojas (Figura 10). Sin embargo, es notorio que hay una variación en la distribución, ya que en ambas condiciones y en toda la extensión de los tallos, se detectaron fragmentos con cantidades trazas de antocianinas o ausencia de ellas, pero a su vez hay fragmentos con cantidades muy altas, por ejemplo, tallos inmaduros, maduros y senescente desarrollados bajo sombra acumularon respectivamente hasta 51, 53 y 41 mg.g de antocianinas por g de material.

Aun así, la cantidad de antocianinas es entre 2 y 5 veces menos entre tallos y hojas en condiciones de sombra y entre 47 y 118 veces menos en condiciones de sol.

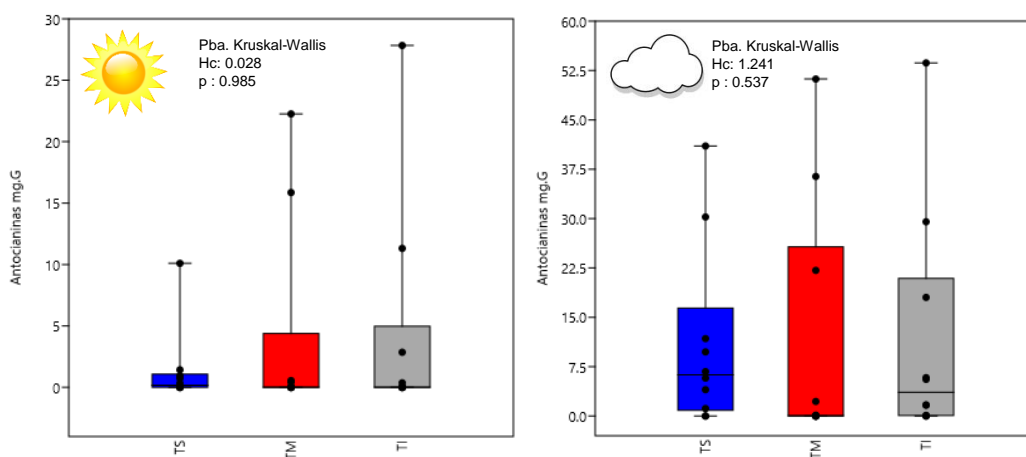


Figura 10. Abundancia de antocianinas en los tallos de *Euphorbia hirta*. Bajo a) sol pleno, b) sombra

6.4 Pigmentos fotosintéticos durante el desarrollo foliar de *Euphorbia hirta*.

Las clorofilas *a* y *b* y carotenoides fueron detectados en ambas condiciones decrecimiento y en los tres grados de desarrollo con diferencias marcadas en sus abundancias.

En condiciones de luz plena, se observaron diferencias en los grados de desarrollo para las clorofilas *a* y *b*, algo no detectado en plantas bajo sombra. Las diferencias señalan que las hojas inmaduras y maduras acumularon mayor cantidad de ambas clorofilas que las hojas senescentes (Figura 11 y 12).

Comparaciones particulares indicaron que las hojas inmaduras tuvieron una cantidad de clorofilas *a* y *b* más elevada en sol pleno (30 y 21 mg.g⁻¹ respectivamente) ($p < 0.05$) que aquellas desarrolladas bajo dosel (16 y 7 mg.g⁻¹, ($p > 0.05$). Las clorofilas *a* y *b* fueron cuantificadas en menor cantidad para las hojas maduras de plántulas bajo sol pero no difieren de aquellas en condición de sombra (4 y 1.5 vs 0.9 y 0.3 mg.g⁻¹). En las hojas senescentes también se detectaron valores bajos de clorofilas *a* y *b* para ambas condiciones, siendo mayores en sombra (3 y 0.2 vs 7 y 3 mg g⁻¹).

En relación a los carotenoides se detectaron contenidos más bajos para las en hojas inmaduras a plena luz (4.5 mg.g⁻¹) y hojas senescentes en sombra (6.6 mg.g⁻¹) ($p > 0.05$). En hojas maduras hay más carotenoides en sombra que bajo sol (9.3 vs 4.6 mg.g⁻¹) (Figura 13).

Particularmente, las clorofilas son más abundantes en hojas inmaduras y maduras donde se cuantificaron mayores cantidades mientras que los carotenoides fueron mayores en hojas maduras.

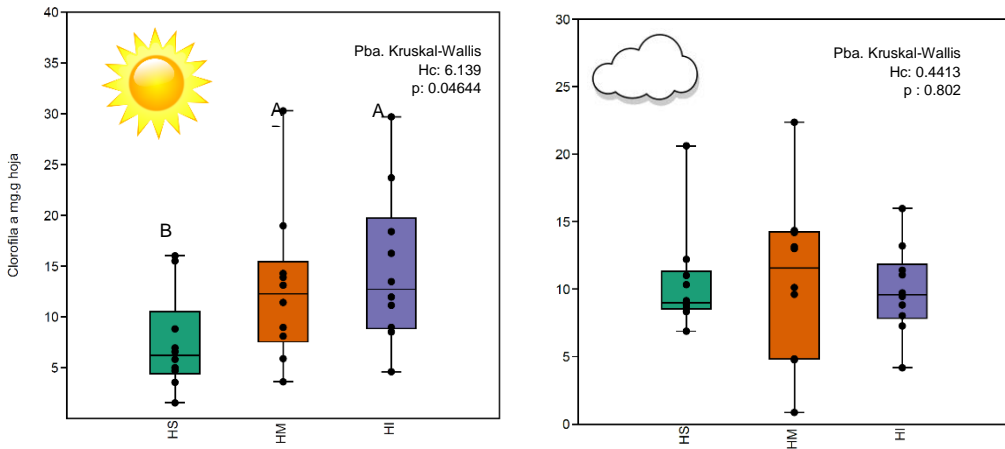


Figura 11. Cantidad de clorofila A bajo dos condiciones en *Euphorbia hirta*. Bajo a) sol pleno, b) sombra HS: Hojas senescentes, HM: Hojas maduras, HI: Hojas inmaduras.

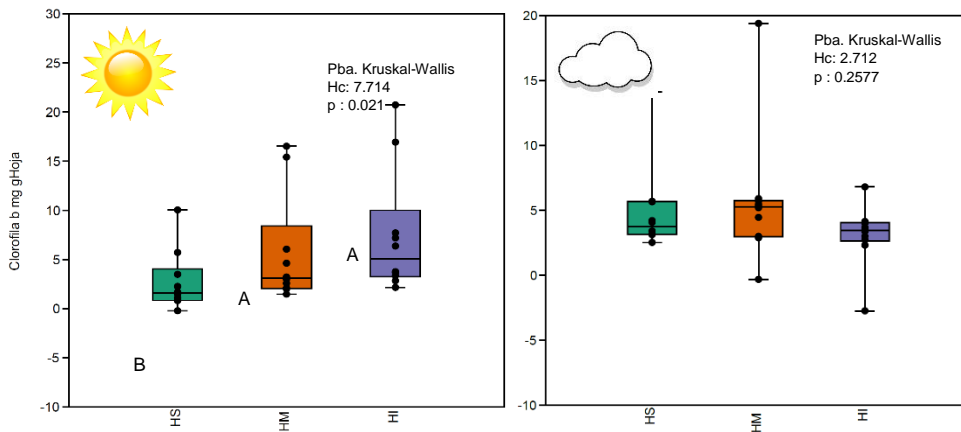


Figura 12. Cantidad de clorofila B bajo dos condiciones en *Euphorbia hirta*. Bajo a) sol pleno, b) sombra HS: Hojas senescentes, HM: Hojas maduras, HI: Hojas inmaduras.

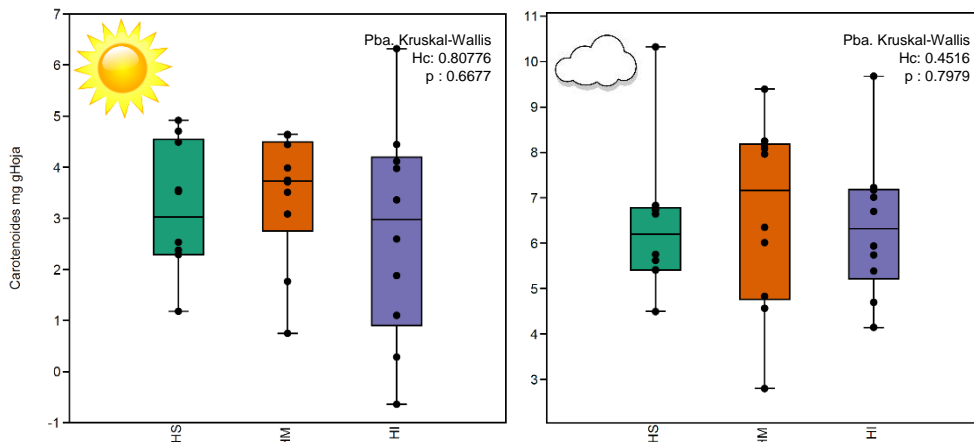


Figura 13. Cantidad de Carotenoides en las hojas de *Euphorbia hirta*. Bajo a) sol pleno, b) sombra HS: Hojas senescentes, HM: Hojas maduras, HI: Hojas inmaduras.

6.5 Actividad fotosintética durante el desarrollo foliar de *Euphorbia hirta*

La actividad fotosintética durante el desarrollo foliar de *E. hirta* se registró a través de la asimilación neta de CO₂ (A_{net}), y la eficiencia de la actividad de la enzima Rubisco (A_{net}/C_i), acompañado de las variables del intercambio gaseoso, tales como la concentración interna de CO₂ (C_i), tasa de transpiración (E) y conductancia estomática (G_s) que dan sustento a la fotosíntesis.

Las plantas bajo sol exhibieron tasas fotosintéticas (A_{net}) discrepantes entre los grados de desarrollo estudiados, se detectó inactividad en hojas senescentes y actividad baja en hojas maduras y brotes, en proporciones similares (0.59 y 0.54 $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), en estas últimas dos fases de desarrollo la A_{net} estaría asociado al consumo de energía necesario para que las hojas sustenten el crecimiento de ellas mismas y del organismo completo (Figura 14).

La actividad fotosintética en sombra fue contrastante en las plantas que estuvieron expuestas al sol pleno, por ejemplo, se detectó actividad en hojas senescentes (0.61 $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a diferencia de las hojas en sol pleno que casi mostraron nula asimilación. Las hojas maduras en esta condición fueron las que tuvieron la menor actividad fotosintética (0.44 $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y las hojas iniciales mostraron actividad máxima de hasta (0.93 $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), es decir, las hojas inmaduras asimilan carbono casi al doble de rapidez que las hojas maduras en sombra (Figura 14).

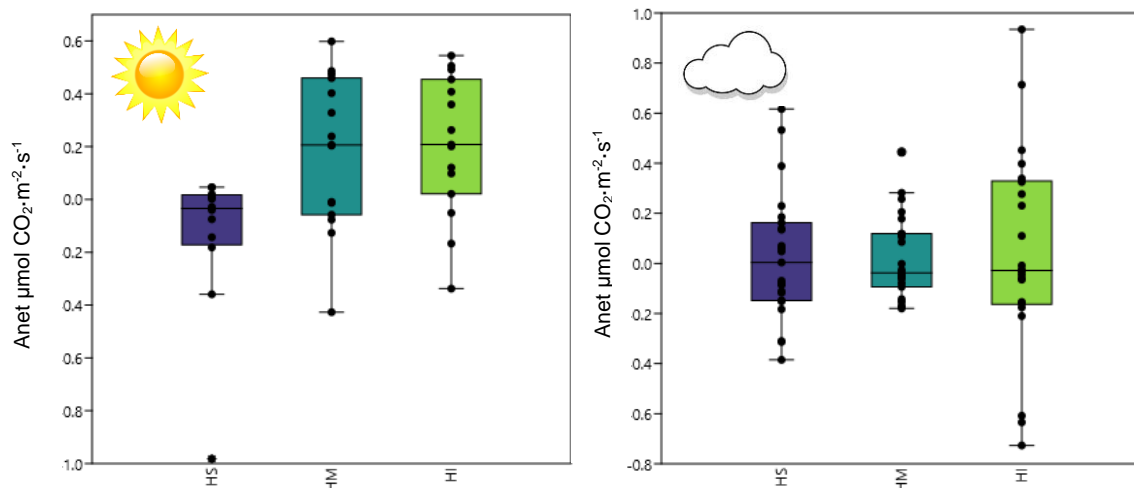


Figura 14. Actividad fotosintética señalada como asimilación neta de CO₂ (A net) durante el desarrollo foliar de *Euphorbia hirta* bajo condiciones de a) sol pleno y b) sombra. HS: Hojas senescentes, HM: Hojas maduras, HI: Hojas inmaduras.

La eficiencia de la enzima Rubisco (Anet/Ci) para metabolizar CO₂ señaló que las hojas maduras a luz directa tienen valores enzimáticos más altos que las hojas bajo sombra (0.0028 vs 0.0015 μmol m⁻² s⁻¹); que las hojas inmaduras en ambas condiciones tienen actividad enzimática muy cercana (0.0029 vs 0.0034 μmol m⁻² s⁻¹); y que, en hojas senescentes bajo sombra, aunque poca, hay actividad enzimática, no así en las expuestas a sol directo. (Cuadro 3).

Las estimaciones de concentración intracelular de CO₂ (Ci) (Cuadro 3) indicaron los valores más altos de contenido de carbono y captación de CO₂ fueron en condición de sombra (298.776 μmol·mol⁻¹ de CO₂) que aquellas que estuvieron sometidas a luz directa (211.822 μmol·mol⁻¹ de CO₂) [p=0.1001]; cabe señalar que los valores más altos para ambas condiciones fue en las hojas maduras, (211.822 μmol mol⁻¹) sol, y (298.776 μmol mol⁻¹) sombra [p=0.0832], por lo que la luz representa un factor importante que limita un poco la acumulación de CO₂, esto quiere decir que las hojas aclimatadas en sombra, en comparación con las que se desarrollan a pleno sol, tienen mayor asimilación de CO₂ y mayor punto de compensación.

La tasa de transpiración (**E**) de las hojas de *E. hirta* en las tres fases de desarrollo presentaron un comportamiento similar sol pleno [$p=0.9373$], sombra [$p=0.9429$] pero los valores más elevados fueron para las dos primeras etapas de desarrollo (Cuadro 3). La conductancia estomática (**G_s**) fue baja para ambas condiciones de iluminación con el evidente hecho que la cantidad de agua perdida fue notablemente bajo sol pleno [0.9374] y sombra [0.9207].

Cuadro 3. Variables del intercambio gaseoso de *Euphorbia hirta* en condiciones de luz contrastantes. Concentración interna de CO₂ (*C_i*), tasa de asimilación fotosintética neta (*A_{net}*), Tasa de transpiración (*E*), conductancia estomática (*G_s*).

Variables fotosintéticas					
	<i>C_i</i> intracelular μmol mol ⁻¹	<i>A_{net}</i> / <i>C_i</i> Eficiencia Rubisco μmol m ⁻² s ⁻¹	E Tasa de Transpiración mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹	G_s Conductancia estomática mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹	<i>C_i</i> / <i>C_a</i>
Sol pleno					
H. inmaduras	167.594	0.0029	0.179	0.0036	0.653
H. maduras	211.822	0.0028	0.197	0.0039	0.823
H. senescentes	343.41	0	0.187	0.0035	1.218
Bajo sombra					
H. inmaduras	271.861	0.0034	0.228	0.0074	1.098
H. maduras	298.776	0.0015	0.226	0.0073	1.205
H. senescentes	267.353	0.008	0.219	0.0072	0.987

VII DISCUSIÓN

La cantidad de antocianinas en *E. hirta* es un rasgo metabólico que respalda las características visibles de su desarrollo foliar, pues demuestra las variaciones en las condiciones de crecimiento y en las etapas de desarrollo documentadas a detalle en este estudio.

La presencia de antocianinas en *E. hirta* señala que la ruta de biosíntesis que origina estas moléculas es muy sensible a la luz y que basta pocos fotones ambientales para su activación, ya que en las hojas de plantas bajo sombra, con apariencia solo de color verde fue detectada cierta cantidad de antocianinas. La radiación fotosintéticamente activa (PAR) medida en los sitios de estudio mostró los valores más bajos con 137.80 $\mu\text{mol mol de fotones m}^2$ en condiciones de sombra, mientras que bajo sol se alcanzó una fotosaturación máxima de 884.97 $\mu\text{mol de fotones m}^2$. Es claro que la proporción de estas moléculas es dependiente a la condición lumínica en la que crece la planta, ya que en general hay más antocianinas en plantas bajo luz plena, esto también está asociado al grado de madurez, hojas senescentes en general fueron más rojizas, inicialmente porque van siendo un reflejo de la acumulación desde fases iniciales o quizás porque una vez que las antocianinas son producidas son difíciles de metabolizar. Chen *et al.*, (2012) indican que en la planta de mora (*Rubus* spp. cv. Arapoho) la concentración de antocianinas es baja en estados iniciales de desarrollo y se incrementa drásticamente cuando los frutos alcanzan la madurez.

Por otro lado (Pinter *et al.*, 2007) mencionan que, en diferentes líneas de maíz híbrido, la radiación UV-B incrementa el contenido de antocianinas en respuesta al estrés ocasionado, esto concuerda con los resultados de este estudio ya que las plantas sembradas en lugares con mayor nivel de radiación presentaron contenidos de antocianinas 45% mayores en comparación con los crecidos con menor radiación. Díaz, 2019 señala que las antocianinas luego de ser biosintetizadas son transportadas y guardadas en las vacuolas celulares, además,

en algunas ocasiones estas elaboran copigmentos con algunos compuestos orgánicos como el cobre, aluminio y hierro que generan cambios en la intensidad y coloración, que son difíciles de metabolizar una vez producidos (Whittaker *et al.*, 2009).

El grado de desarrollo determina la presencia de MS, en particular, se ha documentado que la presencia de antocianinas en las hojas pueden tener dos dinámicas, estar presentes al inicio del desarrollo foliar como en las hojas de *Pseudobombax ellipticum* cuya cantidad de antocianinas rojas disminuyen gradualmente conforme las hojas van madurando (Toledo-Matus, 2015) o de forma contraria como en *Liquidambar styraciflua* que activa la biosíntesis de estas moléculas coloridas durante la senescencia foliar (Mendoza, 2012).

Para *E. hirta* en este estudio las antocianinas se detectaron en mayor cantidad en la fase final de desarrollo ya que las hojas maduras y senescentes acumularon entre siete y nueve veces más pigmentos antocianínicos que las jóvenes, respecto a ello Murray *et al.*, (1994) mencionan que las antocianinas se acumulan cuando los cambios ambientales o de desarrollo hacen que las plantas sean más sensibles al medio ambiente, además, de que las hojas jóvenes en expansión, así como las senescentes, son más susceptibles a la fotoinhibición del aparato fotosintético. En otro estudio realizado con hojas de *Prunus* se pudo registrar que las antocianinas se acumulan fuertemente en las hojas jóvenes y senescentes cuando existe la necesidad tanto de fotoprotección como de mantener una alta capacidad de sumidero de carbono (Piccolo *et al.*, 2018).

Valladares *et al.*, 2000 indican que la capacidad de las antocianinas para retardar la senescencia de las hojas, podría entenderse como una ventaja ecofisiológica que permite extender así la vida útil de las hojas, sugiere que ello es una “estrategia de uso conservador” adoptado por especies con “órganos de larga vida”.

La influencia lumínica es relevante ya que en condiciones saturantes de luz fue mayor la acumulación de antocianinas para *E. hirta*. De acuerdo con lo anterior, trabajos realizados en vid (*Vitis vinifera*), confirmaron que las altas radiaciones lumínicas incidentes en los racimos provocaron un incremento en la concentración total de antocianinas monoméricas y flavonoles posiblemente en respuesta metabólica al estrés ocasionado (Steyn *et al.*, 2000).

Lida *et al.*, (2000) describieron un gen (*rhl41*) en *Arabidopsis* aparentemente involucrado en la aclimatación al estrés por luz visible, este gen se indujo rápidamente en proporción a la intensidad y duración del estrés por irradiación. La sobreexpresión del gen resultó en una tolerancia constitutiva a la luz alta, que condujo a la acumulación de antocianinas y cambios fenotípicos adaptativos, como hojas más gruesas que generalmente están asociadas con la aclimatación a la luz alta, lo que sugiere que la acumulación de antocianinas es parte de la respuesta general de la planta al estrés por luz.

Las hojas de *E. hirta* en sombra, registraron contenidos antocianínicos aunque en menor cantidad, de lo anterior Pietrini *et al.*, (2002) sostienen que la pigmentación rojiza es de gran importancia en plantas adaptadas a la sombra, ya que las antocianinas protegen el frágil aparato fotosintético de los destellos de alta intensidad que se producen al mediodía. En este caso pareciera que aun en bajas condiciones lumínicas la especie activa la biosíntesis de estas moléculas rojizas.

Las antocianinas en los tallos tuvieron un comportamiento interesante y diferente al de las hojas, debido a que estas fueron más abundantes bajo sombra que a luz directa, diferencias en el grado de desarrollo foliar, en relación con esto (Gould *et al.*, 2010) en su estudio con *Cornus stolonifera* en tallos bajo condiciones lumínicas estresantes sugieren que las antocianinas ayudan a la fotoprotección del PSII más en la subsaturación de la luz difusa que en la luz directa. Por lo tanto, la fotodepuración por antocianinas pueda ser más útil para tallos bajo luz difusa. Esto podría indicar que los tallos rojos bajo sombra o con poca luz están mejor equipados

para lidiar con fotones incidentes excedentes, elevando su rendimiento fotoquímico al de las hojas verdes.

Al cuantificar los pigmentos fotosintéticos revelaron que las plantas expuestas bajo luz directa contenían mayor cantidad de clorofilas a y b. Un estudio realizado con *Pinus pseudostrobus* en diferentes ambientes de desarrollo mostraron que la disminución en la cantidad de radiación solar, y en general bajo cualquier tipo de estrés se reduce la actividad fotosintética al disminuir el contenido de clorofila (Cambrón-Sandoval *et al.*, 2011) por lo que esto fue notable en la menor producción de clorofilas en sombra. Además, la acumulación de estas fue mayor en aquellas hojas de etapa temprana de crecimiento y madurez, Zhang *et al.*, (2007) encontraron una fuerte variación estacional en el promedio del contenido total de clorofila en hojas de *Acer saccharum*, ya que en la época temprana de crecimiento y durante la expansión de las hojas, el contenido de clorofilas incrementó.

Como se mencionó anteriormente la intensidad lumínica influyó, ya que en hojas de la parte baja del dosel (con menor iluminación), la concentración de clorofilas fue menor. Con esto es notable que las hojas de *E. hirta* expuestas a una intensidad lumínica directa se acondicionan a este factor. Sin embargo, durante las etapas finales, éstas no alcanzan a producir la misma cantidad de clorofilas ya que las modificaciones extremas en la intensidad luminosa causan los cambios en el contenido de clorofilas y se induce a la fotoinhibición, estimulando así la producción de MS (Coelho *et al.*, 2007).

La producción de clorofila fue baja para las condiciones de sombra, pero no pasó lo mismo con las hojas senescentes, ya que a pesar de ser menor la producción de clorofilas, esta resultó ser la más alta para aquellas bajo condición de sombra. Posada *et al.*, (2012) mencionan que esto pudo ser una consecuencia de que el fotosistema II es rico en clorofila b, además, bajo condiciones de exceso de iluminación, este fotosistema es más inestable que el fotosistema I.

La cantidad de carotenoides fue mayor para las etapas en expansión, estudios realizados por Acuña *et al.*, (2017) con lechuga (*Lactuca sativa* L.) reportaron que para el caso de los carotenos los contenidos corresponden al estado

de madurez de la hoja, ya que las hojas maduras y nuevas contienen mayor cantidad. Posada *et al.*, (2012) indican que estos pigmentos son abundantes en etapas jóvenes de desarrollo ya que cumplen con la función de ser colectores de fotones y actúan también como pigmentos accesorios en los fotosistemas y como agentes protectores que limitan los efectos dañinos de la irradiación.

El análisis fotosintético mostró que las hojas maduras y aún más las inmaduras presentaron la actividad máxima de asimilación de carbono, respecto a ello Sívori *et al.*, 1993, mencionan que este tipo de comportamiento es atribuible a que las hojas jóvenes tienen altas tasas metabólicas y son en las que el mayor consumo de energía se ocupa para que las hojas efectúen crecimiento, mientras que las maduras solo hacen respiración de mantenimiento. Por otro lado (Franks *et al.*, 2013) señalan que el aumento de la actividad fotosintética durante la expansión foliar está relacionado con el desarrollo de tejido foliar interno y de los estomas, la edad de la hoja, la biosíntesis de clorofila, la capacidad de transporte de electrones puede corresponder a su vez a factores externos como la radiación recibida por las hojas. Algo interesante fue el hecho de que la mayor asimilación de carbono fue mayor en aquellas plantas crecidas bajo dosel, quizá debido a que las condiciones de luz plena son demasiado intensas para la especie. La eficiencia de la enzima Rubisco resultó ser mayor en aquellas hojas maduras en plantas expuestas a sol pleno, mientras que la eficiencia más baja de esta enzima fue para las hojas senescentes, Marín, (2004) menciona que la enzima se acumula alcanzando su máxima concentración poco después de que se complete la expansión de los órganos. Sin embargo, durante la senescencia, la biosíntesis se detiene y la Rubisco se degrada de forma rápida y específica ya que sufre una serie de alteraciones como la oxidación de diversos residuos, la polimerización en forma de agregados de alto peso molecular y la asociación a la fracción membranosa, que parecen conducirla, de forma regulada, hacia la degradación final.

La exposición lumínica también juega un rol importante en la eficiencia de la enzima ya que de acuerdo a Portis, *et al.*, (2007) el estado de la actividad y eficiencia de la Rubisco responde a cambios mediados por la luz en el estado redox del

estroma del cloroplasto y el potencial de fosforilación determinado por la relación ATP/ADP por lo que resulta más alta, dando como resultado una actividad mayor.

Finalmente, las variables obtenidas del intercambio gaseoso en donde las estimaciones para la concentración intracelular CO_2 (C_i) fueron mayores para la condición de sombra en las hojas maduras, la tasa de transpiración resulto ser similar para ambas condiciones, mientras que la conductancia estomática fue baja, por lo que no hubo mucha pérdida de agua, Otero (2005) observó en un estudio de plantas jóvenes de ilama (*Annona diversifolia* Saff.) que el movimiento estomático regula la absorción de CO_2 y la pérdida de agua, siendo la humedad, el estado hídrico de la planta, la concentración de CO_2 , la luz y la temperatura los principales factores que intervienen en la apertura y cierre de los estomas (Nava *et al.*, 2009). Señalan que el valor de C_i depende de la demanda de CO_2 en los cloroplastos de la hoja y de la tasa de suministro de CO_2 al interior de la hoja, está determinada a su vez por la conductancia estomática; por tanto, sería de esperarse que con una mayor conductancia haya mayor disponibilidad de este gas en los espacios intercelulares de la hoja, que para el caso de *E. hirta*, sería en aquellas hojas más jóvenes. Además, mencionan que la alta radiación incidente trae consigo un aumento de temperatura y posible disminución de la humedad relativa, y en consecuencia una disminución de E y G_s como mecanismo de la planta para minimizar la pérdida de agua y mantener el balance hídrico.

Esto último señalaría que *E. hirta* tiene plasticidad fisiológica en sus procesos fotosintéticos y de fotoprotección que le permiten crecer tanto en condiciones de sombra como en exposición a sol directo, en las que el microambiente es totalmente diferente.

VIII CONCLUSIONES

La capacidad de *Euphorbia hirta* de biosintetizar antocianinas es responsable de las pigmentaciones rojizas de sus hojas y tallos

Euphorbia hirta biosintetiza antocianinas en diferentes condiciones lumínicas.

La variación lumínica es un estímulo importante en *E. hirta* para la producción o acumulación variable de antocianinas en las hojas, plantas bajo condición lumínica completa acumulan más pigmentos rojos que las que están en sombra.

La proporción de antocianinas foliares está directamente asociado al grado de desarrollo foliar, de tal manera que hojas maduras y senescentes poseen más antocianinas.

Las hojas visiblemente verdes de forma completa poseen antocianinas, aún en proporciones bajas

La actividad fotosintética y variables fisiológicas asociadas se conserva en ambas condiciones lumínicas, lo que sugiere que las antocianinas juegan un papel relevante al proteger a las hojas en condiciones de luminosidad intensa, evitando la posible fotoinhibición.

Euphorbia hirta es una hierba que presenta un metabolismo de antocianinas adaptable a las condiciones lumínicas en las que persiste, lo que pudiera explicar su capacidad de crecer en situaciones variadas de luz y hábitos extremos.

IX PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES

Para fortalecer el presente estudio se debería caracterizar y señalar morfológicamente la distribución de la pigmentación roja durante el desarrollo foliar

Es necesario señalar la identidad de las antocianinas que biosintetiza *E. hirta* para saber el número de moléculas responsables del color.

Es importante conocer el estado oxidativo de las hojas en ambas condiciones lumínicas, lo que podría asociarse a la biosíntesis de antocianinas oxidantes.

Algunos trabajos fuera del ámbito de este estudio podrían ser en determinar las capacidades de biorremediación de esta planta y si las hojas más rojas que presentan algún tipo deterioro externo están relacionadas con algún tipo de herbivoría.

X.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña, R., Jara, C., Hen, A. y Mathias, K. 2017. Contenido y estabilidad de clorofilas y carotenoides en el zumo de lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Special issue on food science*. 45 (3): 11-20.
- Adir N., Zer H., Shochat S. y Ohad I. 2003. Photoinhibition a historical perspective. *Photosynthesis Research*. 76: 343-370.
- Asha, S., Deevika, B. y Sadiq, M. 2014. *Euphorbia hirta* linn - a review on traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 3 (1): 180-205.
- Azcón, B. J. y Talón, M. 2013. Fundamentos de fisiología vegetal; 2ª ed. España: Mcgraw-Hill interamericana de España.
- Baibado, J. y Cheung, H. 2015. Biological functions of the metabolites from *Euphorbia hirta* L. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Science Archive*. 3 (1): 27-29.
- Bhagwat, G. G., Chaulang, G., Ghodke, D. y Suresh, K. 2008. Pharmacognostic study of plant *Euphorbia hirta* L. *Journal of pharmacy research*.
- Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana (BDMTM). 2009. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=euphorbia-hirta>
- Bidwell, R.G. 1990. *Fisiología vegetal*. México: AGT Editor.
- Bittner M., Alarcón J., Aqueveque P., Becerra J., Hernández V., Hoeneisen M., y Silva M. 2001. Estudio químico de especies de la familia euphorbiaceae en Chile. *Bol. Soc. Chil. Quím.* (46) 4.
- Cambron- Sandoval, V., Boquera, M.L., Vargas, N., Romero, C.S., Hernández, J. Y Herrerías, Y. 2011. Producción de clorofila en *Pinus pseudostrobus* en etapas

- juveniles bajo diferentes ambientes de desarrollo. *Revista Chapingo*. 17 (2): 253-260.
- Castañeda-Ovando, A., Pachecho- Hernández, M.L., Pérez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A. y Galán-Vidal, C.A. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *ELSEVIER*. 113: 859-871.
- Castro- Moreno, M. 2013. Respuesta fisiológica y biosíntesis de liriodenina frente al estrés hídrico en *Annona lutescens* Saff. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Castro, Y., Fetcher N., Fernández D. 1995. Chronic photoinhibition in seedlings of tropical trees. *Physiologia Plantarum* 94: 560-565.
- Chalker-Scott, L. 1999. Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Responses. *Photochemistry and Photobiology*, (70): 1-9.
- Chen, Q., Yu, Haowei., Tang, H. y Wang, X. 2012. Identification and expression analysis of genes involved in anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in the fruit of blackberry. *Scientia horticulturae*. 141 (15): 61-68.
- Coelho, G.C., Rachwal, M.F.G., Dedecek, R.A., Curcio, G.R., Nietsche, K. y Schenkel, E.P. 2007. Effect of light intensity on methylxanthine contents of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. *Biochem. Syst. Ecol.* 35:75-80.
- Dávila, Y. (2009). Efecto borde y respuestas funcionales en el establecimiento de *Alchornea triplinervia* y *Myrcia acuminata* en un fragmento de selva nublada andina. Instituto de Ciencias Ambientales y Ecológicas (ICAE). Universidad de Los Andes, Mérida. Venezuela. pp.5-6.
- Delgado, L. 2015. Mecanismos de acción implicados en la bioactividad de flavonoides. *Caenorhabditis elegans* y líneas celulares como sistemas modelo. Tesis de licenciatura. Facultad de farmacia. Universidad de Salamanca.
- Díaz, K.J. 2019. Estandarización del proceso de obtención de antocianinas a partir de callos de mora (*Rubus glaucus* Benth) mediante la técnica de

- suspensiones celulares. Tesis de licenciatura. Universidad de Santander. Facultad de ciencias exactas, naturales y agropecuarias.
- Durts, R. & Wrolstad, R. 2001. Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. In: *Handbook of Food Analytical Chemistry*. 33-45.
- Espadero, M., Avilés, H., Armijos, L., Ávila, L., Idrovo, L., Idrovo, M. y Oyola, C. Evaluación microbiológica y composición química de extractos orgánicos de *Euphorbia aff. Viridis*. LA GRANJA. *Revista de Ciencias de la Vida*, vol. 29, 1: 1-15.
- Franks, P.J., Beerling, B.D., y Arzani, A. 2013. Maximum leaf conductance driven by CO₂ effects on stomatal size and density over geologic time. 106:10343-10347.
- Garzón, G.A. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta biológica Colombiana*. (13) 3:27-36.
- Ghosh, P., Ghosh, C., Das, S., Das, C., Mandal, S. y Chatterjee, S. 2019. Botanical Description, Phytochemical Constituents and Pharmacological Properties of *Euphorbia hirta* Linn: A Review. *International Journal of Health Sciences & Research*, 273 (9): 273-286.
- Gil, M.F. 1995. *Elementos de fisiología vegetal. Relaciones hídricas, nutrición mineral, transporte y metabolismo*. México: Ediciones Mundi-prensa.
- Gopi K., Renu, K., Sannanaik. B. y Jayaraman, G. 2015. Protective effect of *Euphorbia hirta* and its components against snake venom induced lethality. *Ethnopharmacol*. 13.
- Gould, K., Dudle, D., y Neufeld, H. 2010. Why some stems are red: Cauline anthocyanins shield photosystem II against high light stress. *Journal of experimental botany*. 61:2707-17.

- Gratti, A., Ricco, R. y Gurni, A. 2007. Estudio fitoquímico preliminar en especies patagónicas del género *Euphorbia* (Euphorbiaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 6 (5): 248-249.
- Hu, X., Tanaka, A., y Tanaka, R. 2013. Simple extraction methods that prevent the artifactual conversion of chlorophyll to chlorophyllide during pigment isolation from leaf samples. *Plant methods*, 9:19.
- Huot, B.Y. y Montgomery, H.2014. Growth-Defense Tradeoffs in plants: A Balancing Act to optimize fitness. *Molecular plant*. 7(8): 1267-1287.
- Jaimes-Correa, J.C. 2015. Dinámica de la aclimatación del aparato fotosintético a cambios en el ambiente de luz en individuos juveniles de especies arbóreas de la sucesión temprana en la Selva Nublada Andina. Facultad de ciencias. Universidad de los Andes. Mérida.
- Kohen, E., Santus, R. y Hirschberg, J.G. 1995. *Photobiology*. Elsevier.
- Kumar, S., Malhotra, R. y Kumar, D. 2010. *Euphorbia hirta*: Its chemistry, traditional and medicinal uses, and pharmacological activities. *Pharmacognosy Reviews*. 4 (7): 58-61.
- Labarthe, F. S. y Pelta, H.R. 2009. Introducción básica a la fotosíntesis y características de especies forrajeras megatérmicas. *INTA Estación experimental agropecuaria Bordenave, (0291)*: 452-6506.
- Lallana, V.H. y Lallana, M. 2003. Manual de prácticas de fisiología vegetal. http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/fisiologiaveg/m_didactico/manual_practicas/FactoresFotosED.pdf. (consultado:26agosto2021).
- Lee, J., Durst W. R. y Wrolstad, E. R. 2005. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*. 88: 269– 1278.

- Lida, A., Kazuoka, T., Torikai, S., Kikuchi, H. y Oeda, K. 2000. A zinc finger protein RHL41 mediates the light acclimatization response in *Arabidopsis*. *The plant Journal*. 24: 191-203.
- Liu, Y., Che, F., Wang, L., Meng, R., Zhang, X., & Zhao, Z. 2018. Fruit coloration and anthocyanin biosynthesis after bag removal in non-red and red apples (*Malus x domestica* Borkh.). *Molecules*, 18(2): 1549–1563.
- Manrique Reol, E. 2003. Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. *Ecosistemas*, 12(1). Disponible en: <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/250> (consultado: 26agosto2021).
- Marin, J.V. 2004. Contribución de residuos conservados de cisteína a la regulación redox del catabolismo de la rubisco. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.
- Martínez, M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de cultura Económica. México, D.F.
- Mattioli, R., Francioso, A., Mosca, L. & Silva, P. 2020. Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. *Molecules*. 25,3809. doi:10.3390/molecules25173809. 1-42.
- Mendoza, C.G. 2012. Las antocianinas del maíz; su distribución en la planta y producción. Postgrado de recursos genéticos y productividad genética. Montecillo, México.
- Mogollon, J. Rondón, M.E. y Morales, A. 2016. Estudio fitoquímico y actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de *Euphorbia laurifolia* Juss. Ex. Lam. *Revista de la Facultad de Farmacia*, vol. 58, 1: 23.
- Mohammad, A.R., Ping, Y., Zakaria, Z., Latha, L.Y. Jothy, S.L. y Sasidharan, S. 2012. Acute toxicity impacts of *Euphorbia hirta* L. extracto in behavior, organs body weight index and histopathology of organs of the mice and *Artemia salina*. *Pharmacognosy Research*. 4 (3): 170-177.

- Murray, J.R., Smith, A.G. y Hackett, W.P. 1994. Differential dihydroflavonol reductase transcription and anthocyanin pigmentation in the juvenile and mature phases of ivy (*Hedera helix* L.). *Planta*. 194:102-109.
- Nava, A.D., Ramírez, I., Peña, C.B., Villaseñor, G. y González, V.A. 2009. Características del intercambio de gases en hojas de Guayabo (*Psidium guajava* L.). *Rev. Chapingo. Ser. Hortic.* 15 (2): 1-8.
- Niinemets U. y Tenhune J.D. 1997. A model separating structural and physiological effects on carbon gain along light gradients for the shade-tolerant species *Acer saccharum*. *Plant Cell Environ.* 20: 845 – 866.
- Otero, M.A., Ruiz, L.M. Becerril, A.E. Tijerina, L. y Castillo, A. 2005. Crecimiento, relaciones hídricas e intercambio gaseoso de plantas jóvenes de ilama (*Annona diversifolia* Saff.) en condiciones de estrés hídrico. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11(1): 57-63.
- Pahlevani A.H. y Riina R. 2011. A synopsis of Euphorbia subgen. Chamaesyce (Euphorbiaceae) in Iran. *Annales Botanici Fennici.* (48): 304-316.
- Piccolo, E., Landi, M., Pellegrini, E., Agati, G., Giordano, C., Giordani, T., Lorenzini, G., Malorgio, F., Massai, R., Nali, C., Rallo, G., Remorini, D., Vernieri, P. y Guidi, L. 2018. Multiple Consequences Induced by Epidermally-Located Anthocyanins in Young, Mature and Senescent Leaves of *Prunus*. *Front Plant Sci.* 2 (9): 917.
- Pietrini, F., Lannelli, M.A. y Massacci, A. 2002. Anthocyanin accumulation in the illuminated surface of maize leaves enhances protection from photoinhibitory risks at low temperature, without further limitation to photosynthesis. *Plant Cell Environ* 25:1251–1259.
- Piñol, T., Plazón, J. y Cusidó, R.M. 2008. Fundamentos de fisiología vegetal. 2ª Ed. McGraw-hill Interamericana de España. p. 669.

- Pinter, J., Kósa, E., Hadi, G., Hégyi, Z., Spitko, T., Toth, Z., Szigeti, Z., Paldi, E. y Marton, C. 2007. Effect of increased uvradiation on the anthocyanin content of maize (*zea mays* l) leaves. *Acta agr. Hung.* 55(1):7-17.
- Pinto, M.V., Nogueira, J.C., Tresvenzol, L.M., Fiuza, T.S. y Bara, M.T. Botanical, phytochemical and physicochemical study of *Euphorbia hirta* L. 2014. *Rev. bras. Plantas medicinales.* 16 (1).
- Portis, A.R., Li, C., Wang, D., y Salvucci, M.E. 2007. Regulation of rubisco activase and its interaction with Rubisco. *Journal of experimental botany.* 59 (7): 1597-1604.
- Posada, F., Ávila, O., y Riascos, D.H. 2012. Cambios diarios en el contenido de pigmentos fotosintéticos en las hojas de caléndula bajo sol y sombra. *Temas agrarios.* 17 (1). 60-71.
- Puzón, J.J., Tabayoyong, E. y Jumawan, H.J. 2015. Morpho-Physiological Changes in *Euphorbia hirta* L. in response to mercury exposure. *Philippine Journal of Science.* 144 (2): 161-170.
- Puzón, J.J., Tabayoyong, E. y Jumawan, H.J. 2015. Morpho-Physiological Changes in *Euphorbia hirta* L. in response to mercury exposure. *Philippine Journal of Science.* 144 (2): 161-170.
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichorn, S.E. 1992. Biología de las plantas. España: Editorial Reverté.
- Rodés, G. R. y Collazo, O. M. 2006. Manual de Practicas de Fotosíntesis. Editorial Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias, México. Pp.15-26.
- Salisbury, F. y Ross, C. 1994. Fisiología vegetal. México: Grupo editorial Iberoamérica.

- Schikorr, F., Duno, R. y Cetzal, W. 2017. Una Euphorbia olvidada en la península de Yucatán. *Centro de Investigación Científica de Yucatán*. http://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/ ISSN: 2395-8790.
- Sierra, M.A. 2006. Factores que determinan el rendimiento de la fotosíntesis. Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.
- Sívori, E. M., Montaldi, E. R. y Caso, O. 1993. Fisiología Vegetal. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.
- Steinmann, V. W. 2002. Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botánica mexicana*, 61: 61-93. <https://doi.org/10.21829/abm61.2002.909>.
- Steyn, W.J., Holcroft, D.M., Wand, S.J.E., Cooks, N.C. y Jacobs, G. 2000. Dating Rosemarie: How to make her blush?. Proceedings of the cape Pomological association Symposium. *South Africa*. 55-62.
- Stintzing, F, C. Stintzing, A.S., Carle R., Frei, B. y Wrolstad, R.E 2002. Color and Antioxidant Properties of Cyanidin-based Anthocyanin Pigments. *J Agric Food Chem*. 50:6172-81.
- Su-Ling, M. y Celli, G. 2019. Anthocyanins from Natural Sources Exploiting Targeted Delivery for Improved Health. *The Royal Society of Chemistry*. 1 (2): 1-42.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2006. Fisiología vegetal. Publicaciones de la universidad Jaume. Vol 2. p.1340.
- Tanaka, Y. y Brugliera, F. 2013. Flower colour and cytochromes P450. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 368:20120432.. doi: 10.1098/rstb.2012.0432
- Tanaka, Y., & Ohmiya, A. 2008. Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19: 190–197. doi: 10.1016/j.copbio.2008.02.015

- Timmins, G., Holbrook, M. & Field. T. 2002. Le Rouge et le Noir: Are Anthocyanins plant melanins?. En: *dvances in Botanical research, anthocyanins in leaves*. Vol.37. California. 21-23.
- Toledo- Matus. 2015. Antocianinas y fotosíntesis durante el desarrollo foliar de *Pseudobombax ellipticum* (Kunth) Dugand. Tesis de licenciatura. Universidad de ciencias y artes de Chiapas. Chiapas, México.
- Trópicos. 2021. *Euphorbia hirta*. Missouri Botanical Garden. Disponible en: <http://legacy.tropicos.org/NamePublicationDetail.aspx?nameid=12800155>
- Valladares, F., Martínez-Ferri, E., Balaguer, L., Pérez-Corona, E. y Manrique, E. (2000). Bajo nivel de respuesta de la hoja a la luz y los nutrientes en robles mediterráneos de hoja perenne: ¿una estrategia conservadora de uso de recursos? *Fitol nuevo*. 148, 79–91.
- Vibrans, H. (ed.). 2009. *Euphorbia terracina* (L.). Malezas de México. Consultado en julio de 2016 en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/euphorbiaceae/euphorbia>
- Whittaker, A., Vazzana, C., Vecchio, V. y Benedettelli, S. 2009. Evaluation of direct and indirect effects of flavonoids, mineral elements and dry weight on antiradical scavenging activity in leaf material of field-grown *Trifolium pratense* cultivars using Path Analysis. *Field Crops Res*. 113:1-11.
- Yadav, R. y Singh, A. 2011. Efficacy of *Euphorbia hirta* latex as plant derived molluscicides against freshwater snails. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 53 (2): 101.106.
- Yordanov I., Veleikova V. 2000. Photoinhibition of photosystem I. *Bulg. J. Plant Physiol*. 26 (1-2): 70-92.
- Zhang, Y., Chen, J.M. y Thomas, S.C. 2007. Retrieving seasonal variation in chlorophyll content of overstory and understory sugar maple leaves from leaflevel hyperspectral data. *Can. J. Remote Sensing*. 33(5):406-415.