



Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas

Facultad de Química-Farmacia



# *Trabajo de diploma*

“Determinación de la tolerancia a la sequía de vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) MD-2”

**Autor:** Yida Chaviano Fernández

**Tutores:**

Dr. René Carlos Rodríguez Escriba

Dr. Oscar Martínez Santiago

**Curso 2016-2017**

*Resumen*



## **Resumen**

### **RESUMEN**

En la actualidad el cambio climático es uno de los principales impactos negativos al medio ambiente. Constituye un reto mitigar estos efectos y evitar la sobreexplotación de los recursos naturales. Una alternativa es la obtención de precursores derivados de biomasa vegetal, pero para ello es necesario inducir en las plantas mecanismos defensivos ante condiciones adversas de crecimiento. En este trabajo se estudiaron plantas crecidas durante 30 días en dos regímenes hídricos (plantas con riego y sin riego), después de este momento se restableció el riego por 15 días para ambos grupos. Se determinó el intercambio gaseoso, eficiencia en el uso del agua, porcentaje de captación de CO<sub>2</sub> en la noche y de reciclaje de CO<sub>2</sub>, niveles de ácidos orgánicos, contenido de proteínas y actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1). Al finalizar el experimento las plantas sin riego tuvieron una respuesta CAM de mayor intensidad sustentado con el 100% de captación de CO<sub>2</sub> durante la noche y su rápida recuperación con el establecimiento del riego hasta la saturación del sustrato, lo cual demostró alta tolerancia a la sequía y elevada flexibilidad metabólica.

*Abstract*



## **Abstract**

### **ABSTRACT**

At present climate change is one of the main negative impacts on the environment. It is a challenge to mitigate these effects and avoid overexploitation of natural resources. An alternative is to obtain precursors derived from plant biomass, but for this it is necessary to induce in the plants defensive mechanisms against adverse growth conditions. In this work, we studied plants grown for 30 days under water regimes (plants with irrigation and without irrigation), after this moment reestablished the irrigation for 15 days for both groups. It was determined the gas exchange, efficiency in the use of water, percentage of CO<sub>2</sub> uptake at night and CO<sub>2</sub> recycling, organic acid levels, protein content and enzyme superoxide disodium (SOD) activity (EC 1.15.1.1). At the end of the experiment, the non-irrigated plants had a higher sustained intensity CAM response with 100% CO<sub>2</sub> uptake during the night and their rapid recovery with the establishment of irrigation until substrate saturation, which demonstrated high tolerance to drought and High metabolic flexibility.

*Pensamiento*



## Pensamiento

### PENSAMIENTO

*"La ignorancia engendra más confianza de la que con frecuencia engendra el conocimiento: son aquellos que saben poco, y no aquellos que saben mucho, los que afirman positivamente que tal o cual problema jamás podrá ser resuelto por las ciencias."*

*Charles Darwin*

*Dedicatoria*



## Dedicatoria

### DEDICATORIA

A mi hermana, **Yilian** por darme la oportunidad de inspirarla y verla crecer.

A mis padres **Andrés A. y Yunia** por sus noches de desvelo y sus lecciones de vida, por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y que me han infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mis abuelos **Fernando y Digna** que aunque nunca entendieron qué estoy haciendo, nunca dudaron en darme ánimos y desearme lo mejor. Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por su motivación y apoyo constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mis bisabuelos que a pesar de la distancia física siguen en mi corazón y son partes también de este logro.

A mi familia por su ``tolerancia`` más que ``resistencia``.

A todos los quiero mucho.

# *Agradecimientos*



## Agradecimientos

### AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi tutor **Dr. René Carlos Rodríguez Escriba**, colaborador activo de este trabajo, por su asesoría y por el carácter científico con que sus conocimientos matizaron el ritmo del mismo. Por ser un ejemplo a seguir, por su comprensión y por su pericia en la búsqueda de alternativas para dar cumplimiento a las distintas fases de esta investigación. **Al Lic. Luis Manuel Peralta González y al Dr. Oscar Martínez Santiago** por el apoyo brindado para la culminación de la tesis, por su orientación científica y sus consejos.

Muchas gracias al **Dr. Justo Gonzales Olmedo** y **Dr. Romelio Rodríguez** por su asesoría para la realización de la tesis. Al **Centro de Bioplasmas** y todo su personal por brindarme los medios y equipos para la realización del trabajo.

Gracias a **Gustavo y Karel** por su buen humor, por hacer más placentera mi estancia y por brindarme sus conocimientos y apoyo desinteresado.

Quiero agradecer a mis padres por el soporte brindado en este trayecto corrigiendo mis errores, por el esfuerzo que hicieron día a día para que lograra terminar mi carrera y por no perder la paciencia.

A mis abuelos por ser mi sustento en todos los aspectos y por su amor infinito, por estar siempre ahí dándome aliento y ese voto de confianza que me ayudó a nunca renunciar.

Gracias a los profesores de la **Universidad Central de las Villas** que contribuyeron a mi formación como profesional y aún más a los que más que enseñarme, me educaron como persona.

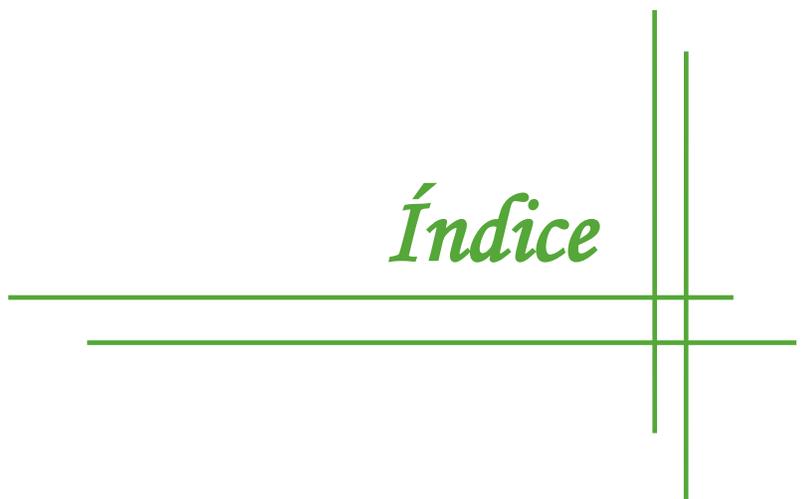
## **Agradecimientos**

Gracias a mis queridos **Emilio Viamonte** y **Ania Hernández**, gracias por ser parte de toda esta historia por aguantar mis quejas y darme los mejores consejos, por las enseñanzas y por todo el cariño que me brindaron.

Como no, agradecerle a mis mejores amigas, que me han enseñado el valor de la amistad y que son parte también de mi familia y de cada uno de los momentos especiales que he vivido. A mis compañeros de aula, que me acogieron y estuvieron presente cada vez que necesité. Sin ustedes nada hubiera sido igual. Gracias por los buenos y malos momentos.

Doy infinitamente gracias a todas las personas que me dieron fuerza y valor para culminar esta etapa de mi vida.

# *Índice*



## Índice

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>III</b>
<b>PENSAMIENTO</b> .....	<b>V</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>VII</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>IX</b>
<b>GLOSARIO</b> .....	<b>14</b>
<b>I.INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>7</b>
<b>2.1 Tecnología de micropropagación y aclimatización de la piña</b> .....	<b>7</b>
2.1.1 Micropropagación de la piña.....	7
2.1.2 Aclimatización de la piña.....	8
<b>2.2 Ecofisiología y bioquímica del Metabolismo Acido de las Crasuláceas</b> .....	<b>9</b>
2.2.1 Plantas con CAM. Genotipos y Fenotipos.....	10
2.2.2 Reloj circadiano y sincronización metabólica de plantas con CAM.....	11
2.2.3 Inducción y modulación de CAM mediante factores condicionantes.....	14
<b>2.3 Estrés oxidativo en la señalización de CAM</b> .....	<b>15</b>
<b>2.4 Vitroplantas de piña, desde fotomixotrófica y C3 hasta CAM facultativa</b> .....	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
<b>3.0 Procedimientos generales</b> .....	<b>19</b>
3.0.1 Obtención de las plantas mediante el cultivo <i>in vitro</i> .....	19
3.0.2 Aclimatización de las plantas micropropagadas.....	20
3.0.3 Diseño experimental.....	21
3.0.4. Procesamiento estadístico de los datos.....	23
<b>3.1. Efecto de la sequía sobre el estatus hídrico y la producción de biomasa</b> .....	<b>23</b>

## Índice

3.1.1. Determinación de la masa seca y el contenido de agua de la hoja D.....	23
<b>3.2. Efecto de la sequía sobre la eficiencia hídrica y metabólica para la asimilación de dióxido de carbono.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.1. Cuantificación del intercambio gaseoso en las hojas .....</b>	<b>24</b>
3.2.2. Determinación de los niveles de ácidos orgánicos .....	24
3.2.3. Eficiencia hídrica y metabólica .....	25
<b>3.3. Efecto de la sequía sobre la capacidad defensiva de las plantas contra el estrés oxidativo .....</b>	<b>25</b>
3.3.1 Extracción de Proteínas .....	25
3.3.2. Cuantificación de Proteínas Solubles Totales.....	26
3.3.3. Determinación de la actividad enzimática de superóxido dismutasa.....	27
<b><i>CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....</i></b>	<b><i>29</i></b>
<b>4.1. Efecto de la sequía sobre el estatus hídrico y la producción de biomasa .....</b>	<b>29</b>
4.1.1. Contenido de agua y masa seca .....	29
<b>4.2. Efecto de la sequía sobre la eficiencia hídrica y metabólica para la asimilación de dióxido de carbono.....</b>	<b>31</b>
4.2.1. Respuesta de los patrones de intercambio gaseoso y ácidos orgánicos .....	31
4.2.2. Eficiencia hídrica y metabólica .....	36
<b>4.3. Efecto de la sequía sobre la capacidad defensiva de las plantas contra el estrés oxidativo .....</b>	<b>41</b>
<b><i>CONCLUSIONES.....</i></b>	<b><i>46</i></b>
<b><i>RECOMENDACIONES.....</i></b>	<b><i>47</i></b>
<b><i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</i></b>	<b><i>48</i></b>

## Glosario

### GLOSARIO

ANA: Ácido naftalenoacético

AO: Ácidos Orgánicos

BAP: Bencil-aminopurina

BSA: Albúmina de suero bovino

C3: Indica plantas con metabolismo C3

C4: Indica plantas con metabolismo C4

CA: Contenido de agua

CAM: Indica plantas con Metabolismo Ácido de las Crasuláceas

CIRAS-2: Equipo portátil de fotosíntesis

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

CytC(oxid): Citocromo C oxidado

CytC(reduc): Citocromo C reducido

DO: Densidad óptica

DTT: Ditionitrosito

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetraacético

## **Glosario**

FFF: Flujo de fotones fotosintéticos

H<sub>2</sub>O: Agua

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno

HR: Humedad relativa

IRGA: Analizador infrarrojo de gases

KOH: Hidróxido de potasio

K<sub>2</sub>O: Óxido de potasio

LED: Diodo emisor de luz

MDH: Malatodeshidrogenasa

MF: Masa fresca

MP: Masa papel de aluminio

MT: Masa total

MS: Masa seca

Sales MS-Sales Murashige y Skoog

NADP-ME: Enzima málica dependiente de nicotiamin adenina dinucleótico fosfato oxidado

## **Glosario**

NADPH-ME: Enzima málica dependiente de nicotiamin adenina dinucleótico fosfato reducido

NaOH: Hidróxido de sodio

NL: Nitrógeno Líquido

NPK: Fertilizante

O<sub>2</sub>: dioxígeno

O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: Anión superóxido

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> : Oxígeno singlete

OAA: Oxalacetato

<sup>•</sup>OH: Radical hidroxilo

P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: Pentóxido de difósforo

PEP: Fosfoenolpiruvato

PEPC: Fosfoenolpiruvato-carboxilasa

PEPCK: Fosfoenolpiruvatocarboxi-quinasa

*p*<sub>i</sub> CO<sub>2</sub>: Presión parcial de CO<sub>2</sub>

PLC6 (U): Cubeta Universal acoplada a CIRAS-2

## **Glosario**

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PPCK: Fosfoenolpiruvatocarboxilasa-quinasa

PVP: Polivinilpirrolidona

Pyr: Piruvato

ROS: Especies reactivas del oxígeno

RubisCO: ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa-oxigenasa

SOD: Superóxido-dismutasa

T(°C): Temperatura

UEA o WUE: Uso eficiente del agua

U: Unidad enzimática

XOD: Xantina-oxidasa

# *Introducción*



## **Introducción I**

### **I.INTRODUCCIÓN**

El cambio climático ocupa hoy uno de los primeros lugares entre los problemas que afectan a la humanidad, por sus efectos medioambientales y, sobre todo, porque su principal determinante es el incremento de los gases de efecto invernadero, resultantes de las actividades humanas. La aceleración de este en las últimas décadas, es una realidad social que amenaza gravemente a distintos ecosistemas. El incremento de la temperatura global ocasionada por el efecto invernadero es responsable del aumento del nivel del mar, de la disminución de las capas de hielo y nieve así como del cambio de tendencia en las precipitaciones y todo ello afectará a los sistemas naturales vinculados al hielo, a los sistemas hidrológicos y a la calidad de las aguas, a los sistemas biológicos marinos y de agua dulce y a la productividad agrícola y forestal(Fernández, 2013).Algunos ambientes ejercen cierta presión selectiva en las plantas en cuanto a la relación  $\text{CO}_2$  fijado vs.  $\text{H}_2\text{O}$  liberada. Puede demostrarse que incluso bajo condiciones ambientales favorables existen algunas plantas que pierden por los estomas aproximadamente 100 moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  por cada molécula de  $\text{CO}_2$  que entra por ellos(Thi, 2003).En zonas con aporte constante de agua este hecho no representa un problema pero en regiones áridas y semiáridas si llega a serlo, aquellas condiciones que lleven a un balance desfavorable como alta temperatura e intensidad lumínica, alto déficit de vapor o aporte limitado de agua tenderán al cierre estomático parcial o total. Sin embargo dicho cierre estomático puede comprometer su capacidad de crecimiento y reproducción o incluso de supervivencia (Lüttge, 2008).La ingeniería metabólica de plantas ha tenido un incremento global en años recientes, los

## **Introducción I**

científicos se preocupan por diseñar y rediseñar plantas capaces de crecer bajo condiciones climáticas adversas. Muchos estudios se realizan en la actualidad para obtener plantas que sobrevivan ante condiciones climáticas extremas y que además sean capaces de producir biomasa eficientemente. Algunas especies de plantas tienen de por sí características genéticas predeterminadas para crecer bajo condiciones drásticas. Estas plantas mantienen relaciones hídricas eficientes que les permiten captar el CO<sub>2</sub> con la mínima pérdida de agua, y lo logran activando rutas bioquímicas particulares. Tal es el caso de las plantas con Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (CAM, del inglés Crassulacean Acid Metabolism), que es un tipo de metabolismo que expresan un pequeño grupo de plantas. Se han descubierto principalmente tres tipos de metabolismos en plantas: C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y CAM. Los metabolismos C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub> ocurren respectivamente en el 89% y el 1% de todas las especies de las plantas conocidas, en estos metabolismos la captación del CO<sub>2</sub> ocurre durante el día, pero a un costo hídrico elevado, sin embargo, las plantas con CAM que representan solo el 10% pueden captar el CO<sub>2</sub> durante la noche a un costo hídrico despreciable respecto a las plantas C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>.

El metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) es una forma de asimilación de CO<sub>2</sub> que ocurre en aproximadamente 16000 especies de 328 géneros en 33 familias. La diversidad taxonómica de CAM se debe a un amplio rango de hábitats que incluye desde regiones áridas y bosques lluviosos hasta ecosistemas acuáticos (Borland et al., 2011). En su hábitat, las plantas CAM se clasifican de diferentes modos de acuerdo a su respuesta metabólica. Se han identificado diferentes tipos que son clasificadas como: CAM obligada o constitutiva,

## **Introducción I**

que pueden presentar fisiotipos fuertes o débiles; CAM facultativa, inducibles o C3/CAM, que pueden comportarse como C3 o CAM en dependencia de factores ambientales; CAM cíclica y CAM fútil (del inglés CAM “Idling”)(Herrera, 2009). La producción de biomasa para obtener precursores de bioproductos y polímeros sintéticos es una de las alternativas actuales para evitar la sobreexplotación de los recursos minerales (Borland et al., 2009), de ahí que propagar plantas que produzcan biomasa en un mundo cambiante se convierte en un reto para la ciencia. Se ha demostrado que las plantas con CAM pueden producir mayor cantidad de biomasa o masa seca que las plantas C3 y C4 bajo condiciones adversas de crecimiento (Zhu, 1996). Otra alternativa para producir biomasa es el cultivo de plantas bajo condiciones de crecimiento controladas. Existen tecnologías capaces lograr este objetivo, tal es el caso de la tecnología de micropropagación de plantas que permite obtener un gran número de plantas genéticamente iguales, con excelente calidad genética, en un reducido espacio y tiempo (González-Olmedo et al., 2005)

En Cuba, dentro de las plantas que presentan características genéticas óptimas para vivir en un ambiente drástico se encuentran las plantas de piña (*Ananas comosus (L.) Merr.*), que poseen metabolismo CAM como medio para la captación del CO<sub>2</sub> y producción de biomasa, además de las excelentes características nutricionales que posee su fruto fresco. El Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila desarrolló una tecnología completa de micropropagación de piña. Se ha propiciado una mejor calidad de plantas mediante estudios basados en la fisiología y bioquímica de la piña, con el fin de inducir cambios metabólicos que favorezcan el crecimiento (Aragón et al., 2012, Aragón et al.,

## **Introducción I**

2013, Rodríguez-Escriba et al., 2015). Se ha identificado que la piña posee una respuesta similar a plantas con fisiotipo CAM constitutiva fuerte en su hábitat (Bartholomew et al., 2003, Popp et al., 2003, Hong et al., 2004, Nelson and Sage, 2008, Lüttge, 2010, Prigge and Guriérrez-Soto, 2014. Sin embargo cuando las plantas de piña provienen del cultivo *in vitro* presentan una respuesta C3 y expresan CAM bajo condiciones adversas de crecimiento {Nievola, 2005 #1579, Lüttge, 2004, Aragón et al., 2012, Aragón et al., 2013).

Durante el proceso de la micropropagación y aclimatización, las plantas de piña transitan por diferentes comportamientos de acuerdo a las condiciones de cultivo y edad fisiológica: funcionan como organismos heterotróficos durante el cultivo *in vitro*, con dependencia de sacarosa como fuente de carbono; organismos fotomixotróficos en las últimas semanas del cultivo *in vitro*, con sacarosa como parte de fuente de carbono, pero con fotosistemas relativamente funcionales (González-Olmedo et al., 2005); organismos fotoautotróficos con metabolismo C3 en condiciones *in vitro* (Nievola et al., 2005, Freschi et al., 2009), y en las primeras semanas de aclimatización (Aragón et al., 2012, Aragón et al., 2013), con expresión CAM bajo condiciones estresantes.

Con los estudios anteriores se demostró que las plantas de piña micropropagadas poseen una flexibilidad metabólica superior a las plantas de piña en su hábitat, por lo que pudieran utilizarse como una alternativa viable para la producción de biomasa en poco tiempo y espacio. Por otra parte, uno de los efectos del cambio climático es la sequía que atenta contra el desarrollo agrícola de varios países, donde Cuba se encuentra inmersa en una etapa crítica que atenta contra la economía agroalimentaria nacional. Sin embargo, para

## **Introducción I**

poder utilizar las vitroplantas de piña como alternativa de producción de biomasa con el mínimo costo hídrico, es necesario evaluar la capacidad que poseen para sobrevivir y crecer bajo condiciones de sequía temporal, por lo que se define como problema científico:

**Problema:** ¿Cómo determinar la tolerancia a la sequía temporal de las plantas de piña obtenidas mediante el cultivo in vitro?

**Hipótesis científica:** Si las plantas de piña micropropagadas se exponen a condiciones de sequía temporal y se evalúan indicadores relacionados con la producción de biomasa, flexibilidad metabólica y primera línea defensiva contra la formación del radical superóxido se podrá determinar su tolerancia temporal para crecer en un ambiente seco.

**Objetivo general:** Evaluar el efecto de la sequía temporal sobre la respuesta metabólica de plantas de piña micropropagadas.

### **Objetivos específicos:**

1. Determinar el efecto de la sequía temporal sobre el estatus hídrico y la producción de biomasa.
2. Determinar efecto de la sequía temporal sobre la eficiencia hídrica y metabólica para la asimilación del dióxido de carbono ante condiciones adversas para el crecimiento.
3. Determinar el efecto de la sequía temporal sobre la primera línea defensiva de las plantas contra la formación del radical superóxido.

## *Capítulo II*



## **Capítulo II**

### **CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 Tecnología de micropropagación y aclimatización de la piña**

##### **2.1.1 Micropropagación de la piña**

La micropropagación es el conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos, es una alternativa viable para la multiplicación de la piña, se utiliza no sólo para la producción masiva de semillas, sino también para incrementar el número de plantas élites con las características deseables (Soneji et al., 2002). Además, pueden generarse plantas libres de virus a través del cultivo de meristemos (Daquinta and Benegas, 1997).

La micropropagación comercial eficaz depende de la rápida y extensa proliferación junto con el uso de medios de cultivos de gran potencia para la fase de multiplicación, además, el desarrollo de la planta normal durante la fase de aclimatización es obligatorio para asegurar un alto porcentaje de supervivencia después de trasladar las plantas a condiciones exteriores (Danso et al., 2008).

Se ha desarrollado un protocolo basado en la utilización del medio líquido y la tecnología de la inmersión temporal, unido a la implementación de un sistema semiautomatizado que ha reducido los costos de producción por el incremento de los coeficientes de multiplicación y la reducción de la manipulación del material vegetal (Escalona et al., 1999). Esto posibilita reducir el tiempo necesario para generar cantidades suficientes de vitroplantas destinadas a la creación de bancos de semillas básicas que permitan el fomento de plantaciones piñeras con plantas de alta calidad genética (González-Olmedo et al., 2005).

## **Capítulo II**

### **2.1.2 Aclimatización de la piña**

La aclimatización es el ajuste de un individuo a los factores ambientales cambiantes, generalmente las condiciones ambientales durante cultivo *in vitro* son diferentes a las *ex vitro* en cuanto a la calidad e intensidad de luz, temperatura y humedad relativa. La transferencia a ambientes *ex vitro* puede estar acompañada por un incremento o disminución en la fotosíntesis, dependiendo de las condiciones *in vitro* en las cuales las plantas se cultivaron (Preece and Sutter, 1991).

El cultivo de tejidos altera algunas características morfológicas de las plantas tales como la composición química de la capa epicuticular, la forma y distribución de los estomas, y la estructura de las hojas y los tallos. También afecta las características fisiológicas como la actividad estomática y la funcionalidad de las raíces y las hojas (Preece and Sutter, 1991).

Estos cambios dificultan la capacidad de adaptación de algunas plantas de piña a las condiciones externas, y por ello un número significativo no sobreviven la etapa de aclimatización (Villalobos et al., 2012a). Estas anomalías provocan en las plantas dificultades para controlar la excesiva transpiración epidérmica, que es considerada como la causa principal de la mortalidad cuando son transferidas a condiciones del suelo (Misalova et al., 2009, Villalobos et al., 2012b).

A partir de los años 90, se han desarrollado técnicas de aclimatización para aumentar la sobrevivencia de las plantas durante esta etapa. Estas buscan limitar la pérdida de agua que sufren las plantas al ser trasplantadas a las casas de cultivo, ya sea mediante la modificación del ambiente externo al cual son transferidas, o mediante tratamientos directos a las plantas

## **Capítulo II**

antes o después de su salida del cultivo *in vitro*, que normalicen su actividad fisiológica y su composición estructural (Preece and Sutter, 1991).

### **2.2 Ecofisiología y bioquímica del Metabolismo Acido de las Crasuláceas**

El metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) es una forma de asimilación de CO<sub>2</sub> que ocurre en aproximadamente 16000 especies de 328 géneros en 33 familias. La diversidad taxonómica del metabolismo CAM se debe a un amplio rango de hábitats que incluye desde regiones áridas y bosques lluviosos hasta ecosistemas acuáticos (Borland et al., 2011).

En las plantas con CAM, la captación de CO<sub>2</sub> ocurre durante la noche, cuando los estomas están abiertos, luego el CO<sub>2</sub> se combina con fosfoenolpiruvato (PEP) por la acción de la enzima fosfoenolpiruvatocarboxilasa (PEPC) para rendir oxaloacetato (OAA) que es convertido en malato por la acción de la enzima malato deshidrogenasa. El malato es transportado pasivamente al interior de la vacuola seguido del transporte activo de protones y consigo la formación y acumulación de ácido málico durante la noche. La acumulación de ácidos orgánicos y la apertura estomática nocturna son el principal diagnóstico de las características del metabolismo CAM (Borland and Taybi, 2004, Borland et al., 2011).

Durante el día el malato es descarboxilado en el citoplasma abasteciendo a la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (RubisCO) con CO<sub>2</sub> durante la fotosíntesis C<sub>3</sub>. La descarboxilación del malato promueve el cierre estomático y concentra el CO<sub>2</sub> alrededor de la RubisCO, suprimiendo su actividad oxigenasa y por ende la fotorespiración. El efecto de este comportamiento en las plantas con CAM es que presentan relaciones de uso eficiente del agua (UEA) varias veces superior que en plantas con metabolismo C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>

## **Capítulo II**

bajo condiciones comparables (Drennan and Nobel, 2000). El resultado neto del funcionamiento del CAM es que el CO<sub>2</sub> es fijado con un ahorro significativo de agua respecto a la fotosíntesis C<sub>3</sub>, pues los procesos de asimilación ocurren en momentos de baja demanda evaporativa y con un elevado gradiente de concentración de CO<sub>2</sub> aire-hoja (Herrera, 2009).

### **2.2.1 Plantas con CAM. Genotipos y Fenotipos**

Las plantas CAM pueden operar de diferentes modos: **CAM obligada**, con alta acumulación de ácidos (H<sup>+</sup>) y acumulación de CO<sub>2</sub> durante la noche; **CAM inducible o facultativa**, conocidas también como C<sub>3</sub>-CAM con una forma C<sub>3</sub> de fijación de CO<sub>2</sub> y variación nula de H<sup>+</sup> en el estado no inducido; pero en el estado inducido presenta pequeñas fijaciones de CO<sub>2</sub> en el día y altos niveles de H<sup>+</sup> durante la noche; **CAM cíclica** con fijación de CO<sub>2</sub> durante el día y variación en los niveles de H<sup>+</sup> pero no presenta apertura estomática durante la noche; **CAM fútil (“Idling”)**, con cierre estomático y pequeñas variaciones de H<sup>+</sup> durante todo el día y la noche en plantas severamente estresadas (Herrera, 2009).

Dentro de estos comportamientos existen diferentes fisiotipos que pueden ser expresados dentro del metabolismo en sí como es el caso de las plantas CAM constitutivas, estas pueden ser fuertes o débiles. Los diferentes comportamientos y sus grados pueden ser limitados a especies diferentes o individuales tales como la familia *Bromeliaceae*, estos comportamientos constituyen diferentes fisiotipos dentro del metabolismo en sí (Crayn et al., 2004, Gehrig et al., 2005, Guralnick et al., 2008).

## **Capítulo II**

### **2.2.2 Reloj circadiano y sincronización metabólica de plantas con CAM**

En el sistema fotosintético del CAM operan las carboxilasas de las rutas C3 (RubisCO) y C4 (PEPC) en células comunes, con su actividad separadas temporalmente, a diferencia de la separación espacial en las plantas con metabolismo C4 (Aragón et al., 2012). Tradicionalmente el ciclo CAM ha sido definido en cuatro fases.

Estas fases se establecen atendiendo a varios criterios: de acuerdo a la asimilación de CO<sub>2</sub>, cambios en los niveles de metabolitos (ej. cambios en los niveles de ácido málico) y la activación y desactivación de enzimas relacionadas con la captación de CO<sub>2</sub> y con la descarboxilación del malato, RubisCO en la captación de CO<sub>2</sub> en la ruta C3, PEPC en la ruta C4, y la Enzima Málica o PEPCK en la descarboxilación del ácido málico.

#### **Fase I: Durante la noche**

Durante la noche cuando las tasas transpiratorias son bajas el CO<sub>2</sub> atmosférico es fijado por PEPC. El sustrato para la producción de fosfoenolpiruvato (PEP) es formado por la glucólisis de polisacáridos acumulados o azúcares solubles formados durante el día anterior. En el caso de la piña, los sustratos para la producción de PEP son principalmente azúcares solubles (Bartholomew et al., 2003).

En una hoja D de piña el CO<sub>2</sub> producido por la respiración representa aproximadamente el 10% del CO<sub>2</sub> total fijado en PEP durante la noche, y el CO<sub>2</sub> fijado durante la noche generalmente ocupa como mínimo las dos terceras partes (75%) de la fijación durante el día (Bartholomew et al., 2003, Nelson and Sage, 2008).

## **Capítulo II**

La actividad del CAM nocturna impone una demanda significativa de carbono además de requerimientos de crecimiento, esto se debe probablemente a que el flujo de metabolitos entre el día y la noche representa un punto de control significativo para esta ruta (Dodd et al., 2003). La PEPC es activada por la fosforilación de residuos de serina mediada por la enzima fosfoenolpiruvatocarboxilasa-quinasa (PPCK), la cual es reconocida como iniciadora del control circadiano y sintetizada de nuevo cada noche. Es por esto que se plantea que la activación de PEPC es regulada a nivel transcripcional y representa también un punto de control crucial en la regulación circadiana de CAM (Borland et al., 1999, Nimmo, 2000, Nimmo, 2003, Taybi et al., 2004, Bailey et al., 2007).

### **Fase II: Al amanecer**

Esta fase marca el cambio entre la carboxilación de las rutas C4 y C3. La PEPC es desactivada en la mañana por desfosforilación, lo cual aumenta la sensibilidad a la inhibición por malato (Wild et al., 2010). La coordinación de las carboxilasas es esencial para el funcionamiento eficiente de CAM. La fase II es a menudo caracterizada por un período de captación de CO<sub>2</sub>, que mayormente parece ser dominado por PEPC. La RubisCO permanece en estado de baja actividad antes que la PEPC sea descarboxilada (Maxwell et al., 1999, Lüttge, 2010, Ceusters et al., 2010, Herrera, 2013, Herrera et al., 2015).

### **Fase III: Durante el día**

La descarboxilación puede ocurrir a partir de acciones simples o combinadas de tres carboxilasas: Enzima málica (NADP-ME) dependiente de la

## **Capítulo II**

nicotinaminaadeninucleótido fosfato en su forma oxidada (NADP<sup>+</sup>); enzima málica (NAD-ME) dependiente de nicotinamina-adeninucleótido en su forma oxidada (NAD<sup>+</sup>) y fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa (PEPCK), un rasgo que depende de las diferentes especies (Borland and Taybi, 2004, Wild et al., 2010). En plantas de *Ananas comosus* el ácido málico es descarboxilado por la acción de PEPCK (Trípodi et al., 2002, Trípodi and Podestá, 2003).

La descarboxilación del ácido málico produce fosfoenolpiruvato (PEP) o piruvato (Pyr) y CO<sub>2</sub> lo cual eleva la presión parcial interna de este último ( $p_i$  CO<sub>2</sub>), esto es suficiente para inducir cierre estomático y además suprimir la fotorespiración. Los recobrados gluconeogénicos de acumulación de carbohidratos imponen un alto costo energético en la ruta, lo cual es sostenido por un incremento en la velocidad de transporte de electrones fotosintéticos durante el día, por lo que la rapidez de descarboxilación del ácido málico es estrictamente dependiente de la luz (Wild et al., 2010).

El CO<sub>2</sub> fijado vía ciclo de Calvin como triosas fosfatos está distribuido entre el crecimiento y la provisión de esqueletos carbonados para la fase I (Dodd et al., 2002, Borland and Taybi, 2004, Wild et al., 2010). Los carbohidratos que proveen los sustratos para las reacciones nocturnas son transportados al interior de los cloroplastos en forma de almidón, o dentro de la vacuola en forma de sacarosa (Borland and Taybi, 2004).

### **Fase IV: Al atardecer**

Esta fase se inicia cuando los niveles de malato comienzan a decrecer, por lo que la  $p_i$ CO<sub>2</sub> también decae, los estomas se pueden reabrir, se incrementa la conductancia estomática y

## **Capítulo II**

se reanuda la captación de CO<sub>2</sub> ambiental para la fijación directa mediante RubisCO. Al inicio de esta fase existe un cambio progresivo desde la fijación de CO<sub>2</sub> generado internamente hasta la asimilación desde el ambiente (Bartholomew et al., 2003).

El tiempo de duración de esta fase y las tasas de captación pueden diferir considerablemente entre especies y condiciones ambientales (Dodd et al., 2002, Wild et al., 2010). En la piña, esta fijación generalmente acumula entre 15% y 25% de la captación total de CO<sub>2</sub> (Bartholomew et al., 2003).

### **2.2.3 Inducción y modulación de CAM mediante factores condicionantes**

En las plantas con CAM, las acciones de la RubisCO y la PEPC determinan la regulación temporal de los procesos de carboxilación, esto evita la inútil recirculación de carbono (Ceusters et al., 2010). Sin embargo, la expresión y la modulación del CAM están íntimamente relacionadas con la acción de PEPC como vía de captación del CO<sub>2</sub> ambiental. Este proceso puede ser extendido durante varias horas en el inicio y final del fotoperíodo, como respuesta a un rango de condiciones ambientales que incluyen fundamentalmente: concentración ambiental de CO<sub>2</sub> (Cote et al., 1989, Borland et al., 1999, Bailey et al., 2007, Ceusters et al., 2008), disponibilidad de agua (Cushman and Borland, 2002, Nelson and Sage, 2008, Herrera, 2009, Freschi et al., 2010, Borland et al., 2014), luz y temperatura (Lüttge, 2004, Ceusters et al., 2008, Winter et al., 2008, Ceusters et al., 2009, Ceusters et al., 2010). De este modo, aparece una regulación temporal de los procesos de carboxilación, el cual se cree que está mediado por un reloj circadiano. Esto permite la flexibilidad metabólica necesaria para perfeccionar la ganancia de carbono y el uso eficiente del agua,

## **Capítulo II**

sobre todo, en plantas CAM que habitan bajo ambientes variables y potencialmente limitantes (Borland et al., 2009, Ceusters et al., 2010).

### **2.3 Estrés oxidativo en la señalización de CAM**

En condiciones normales, entre el 2 y el 4% del oxígeno consumido por las células vivas genera productos nocivos para ellas. La toxicidad del oxígeno es consecuencia de la aparición de las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Airaki, 2012). El término especies de oxígeno reactivo se refiere, tanto a los radicales libres del oxígeno, como son el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y el peróxido, como a otras moléculas que no son radicales, como el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El oxígeno molecular en estado basal triplete es un radical; ya que no tiene completamente apareados sus electrones. Este estado basal del oxígeno puede convertirse en diferentes ROS, ya sea por transferencia de energía formando el oxígeno singlete o de electrones resultando en la reducción secuencial a radicales superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Airaki, 2012).

Las ROS tienen un papel importante en los procesos de señalización en plantas, participando en el control de procesos fundamentales tales como el crecimiento, respuesta a estímulos medio-ambientales y muerte celular programada. Las ROS no solo son agentes dañinos para las células, también desempeñan un rol medular como mensajeros en cascadas de señalización en una gran variedad de procesos celulares (Borland et al., 2006). Por lo tanto, la función de las ROS en el metabolismo es dual; resultan tóxicos para la célula cuando se acumulan en exceso, pero a determinados niveles pueden funcionar como moléculas bio-señalizadoras. Debido a esa doble función de las ROS, las plantas necesitan,

## **Capítulo II**

al menos, dos mecanismos diferentes para regular sus concentraciones intracelulares: uno que permita una modulación fina de los niveles bajos de ROS con finalidad relacionadas con la señalización y otro que permita la detoxificación de excesos de ROS, especialmente bajo condiciones de estrés (Airaki, 2012).

En tejidos vegetales, el porcentaje de conversión a ROS a partir del oxígeno total consumido se incrementa cuando las plantas se someten a condiciones desfavorables como salinidad, sequía, estrés por frío o por altas temperaturas. Se conoce que los daños producidos en plantas sometidas a condiciones desfavorables, están mediados, en parte, por una incrementada generación de ROS a nivel subcelular (Cortes, 2013). Para hacer frente al exceso de producción de ROS las plantas presentan diferentes sistemas de defensa que incluye mecanismos enzimáticos y no enzimáticos denominados mecanismos antioxidantes (Cortes, 2013). Si la generación de ROS supera a los mecanismos de defensa antioxidantes se produce una situación de estrés oxidativo a nivel celular, tanto por un aumento de producción de especies tóxicas como por la disminución en los mecanismos de defensa. Cuando se pierde el balance entre la aparición de especies nocivas y la capacidad de la célula de evitar su acumulación, ocurre una situación conocida como estrés oxidativo. En estas condiciones las especies activas del oxígeno reaccionan con las macromoléculas de las células modificando su estructura y su función y dando lugar a alteraciones que pueden conducir a la muerte celular (Simontacchi, 2001).

### **2.4 Vitroplantas de piña, desde fotomixotrófica y C3 hasta CAM facultativa**

Durante la micropropagación, los brotes de piña transitan por diferentes estados metabólicos asociados a las condiciones ambientales en las que se cultivan. Durante el

## **Capítulo II**

cultivo *in vitro* se comportan como organismos fotomixotróficos, con una relativa funcionalidad de los fotosistemas pero dependen de la sacarosa como fuente de carbono (González-Olmedo et al., 2005).

Se ha demostrado que plántulas de piña en condiciones de cultivo *in vitro* presentan metabolismo C3 y cambian su metabolismo a CAM como respuesta al aumento de la temperatura (Nievola et al., 2005), ante déficit hídrico, y ante la aplicación de óxido nítrico combinado con medios enriquecidos con hormonas (Freschi et al., 2010). Además, estudios relacionados con el comportamiento de plántulas de piña ‘MD-2’ durante las primeras semanas de aclimatización, demostraron que también presentan metabolismo C3 y cambian su metabolismo a CAM como respuesta a una combinación de factores que incluyen: incremento de la temperatura, alta intensidad lumínica y déficit hídrico (Aragón et al., 2012, Aragón et al., 2013). En ambos casos, las plántulas, tanto en condiciones *in vitro*, como en las primeras semanas de aclimatización, presentaron un comportamiento similar a las plantas CAM facultativas.

Se ha demostrado que en especies CAM facultativas y CAM constitutivas, el grado de expresión CAM es superior cuando el tejido fotosintético es más adulto. En hojas de especies constitutivas, ocurre un desarrollo progresivo del metabolismo desde el comportamiento C3 hasta el comportamiento CAM, lo cual está relacionado con el aumento de la edad fisiológica de las hojas (Gehrig et al., 2005). Este efecto pudiera ocurrir en las plantas de piña micropropagadas durante la fase de aclimatización, las cuales pudieran incrementar su grado de expresión como respuesta del aumento de la edad fisiológica y/o existencia de condiciones ambientales estresantes.

## **Capítulo II**

Por otra parte, se ha demostrado que *Ananas comosus* en su hábitat natural o bajo condiciones de campo se comporta como CAM constitutiva fuerte (fisiotipo dentro de CAM constitutiva) (Moradshahi et al., 1977, Cote et al., 1989, Zhu et al., 1997, Bartholomew et al., 2003, Nelson and Sage, 2008, Prigge and Guriérrez-Soto, 2014). Además el comportamiento de las plantas de piña en condiciones de campo ha mostrado alta sensibilidad y plasticidad al estrés abiótico, provocado por la necesidad del control eficiente de la disponibilidad de agua y su aclimatación a las altas y bajas temperaturas (Bartholomew et al., 2003, Dopazo et al., 2009).

## *Capítulo III*



## **Capítulo III**

### **CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.0 Procedimientos generales**

La investigación se desarrolló en el área de aclimatización del Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila "Máximo Gómez Báez", Cuba (41°53'N, 78°41'W, 45 m a.s.l). Se realizó un experimento para estudiar el efecto de la sequía temporal sobre la respuesta metabólica de plantas micropropagadas de piña. El estudio consistió en aplicar déficit hídrico después de la exposición de plantas de 4,5 meses de edad a condiciones de alta intensidad lumínica durante 30 días para la aclimatación de sus fotosistemas. La aplicación de déficit hídrico controlado se realizó durante el mismo tiempo seguido de riego diario hasta la saturación del sustrato durante los 15 días posteriores. Se determinaron indicadores morfológicos relacionados con el desarrollo vegetativo de las plantas, además de indicadores fisiológicos y bioquímicos necesarios para la estimación de la flexibilidad metabólica de las y capacidad defensiva contra la formación del radical superóxido.

##### **3.0.1 Obtención de las plantas mediante el cultivo *in vitro***

Se utilizaron plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) 'MD-2', micropropagadas según el protocolo propuesto por (Daquinta and Benegas, 1997). Se tomaron yemas de la corona, se desinfectaron con hipoclorito de calcio al 0,5% y se cultivaron en condiciones *in vitro* hasta diez subcultivos. Para el establecimiento *in vitro* se utilizó un medio de cultivo con sales MS [10,0 ml·L<sup>-1</sup>], tiamina [1,0 mg·L<sup>-1</sup>], myo-inositol [100,0 mg·L<sup>-1</sup>], ANA [1,0 mg·L<sup>-1</sup>], sacarosa [30,0 g·L<sup>-1</sup>], BAP [1,0 mg·L<sup>-1</sup>] y agar [6,5mg·L<sup>-1</sup>]. Para la multiplicación de los explantes se utilizó un medio con sales MS [10,0 ml·L<sup>-1</sup>], tiamina [1,0 mg·L<sup>-1</sup>], myo-inositol [100,0 mg·L<sup>-1</sup>], ANA [0,3 mg·L<sup>-1</sup>], sacarosa [30,0 g·L<sup>-1</sup>] y BAP [2,1 mg·L<sup>-1</sup>]. En la

### **Capítulo III**

pre-elongación de las plántulas se preparó un medio de cultivo con sales MS [10,0 mg·L<sup>-1</sup>], tiamina [1,0 mg·L<sup>-1</sup>], myo-inositol[100,0 mg·L<sup>-1</sup>], ANA [0,5 mg·L<sup>-1</sup>] y sacarosa [30,0 g·L<sup>-1</sup>], y para el enraizamiento *in vitro* sales MS [10,0 mg·L<sup>-1</sup>], tiamina [1,0 mg·L<sup>-1</sup>], myo-inositol[100,0mg·L<sup>-1</sup>], ANA [0,5 mg·L<sup>-1</sup>], sacarosa [30,0 g·L<sup>-1</sup>]. Cada fase del cultivo *in vitro*: establecimiento, multiplicación, pre-elongación y enraizamiento tuvo una duración de 45 días.

Las plantas se cultivaron en magentas plásticas transparentes con 7,2 cm de diámetro inferior, 8,6 cm de diámetro superior y 9,2 cm de altura durante todas las fases del cultivo *in vitro*, a los cuales se añadieron 40,0mL de medio líquido a pH 5,7 previamente esterilizado en autoclave a 121,0°C y 118,0kPa. Se utilizó luz artificial con un flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de 40,0 – 60,0 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y una temperatura de 25,0 ±2°C. Todas las manipulaciones se realizaron bajo condiciones asépticas.

#### **3.0.2 Aclimatización de las plantas micropropagadas**

Las plantas se aclimatizaron según el Instructivo Técnico del Centro de Bioplasmas correspondiente al año 2012. Se seleccionaron plantas provenientes de la última fase *in vitro* (enraizamiento) de acuerdo a los parámetros de calidad descritos por (Escalona et al., 2003): más de 4,0 cm de longitud, de 7,0 a 8,0 g de masa fresca y entre cinco y seis hojas funcionales. Las plantas seleccionadas se sumergieron en una solución de PrevicurEnergy® (Bayer CropScience) [3,0 mL·L<sup>-1</sup>] durante cinco minutos y se plantaron en envases plásticos con un volumen de 256,26 cm<sup>3</sup>.

### **Capítulo III**

Se utilizó un sustrato previamente tamizado (5,0 mm de diámetro de partícula) en una relación 1:1 (v/v) entre suelo ferralítico rojo y cachaza (Villalobos et al., 2012b, Pino, 2014). La composición química del sustrato fue de 0,6% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 0,17% de K<sub>2</sub>O, 16,4 % de materia orgánica, pH de 6,2 y una relación 15:1 (m/m) carbono– nitrógeno.

La aclimatación de las plantas se realizó dentro de una casa de cultivo bajo condiciones de 80±3% de humedad relativa y 25,5±2 °C de temperatura (datos obtenidos utilizando un Termo Higrómetro digital TECPEL<sup>®</sup> modelo DTM- 303), luz y fotoperiodo natural con un FFF=250±30 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> y condiciones atmosféricas de concentración de CO<sub>2</sub> entre 375 y 400 μmolmol<sup>-1</sup>(datos obtenidos con un sistema portátil de fotosíntesis PP System, CIRAS-2). Las mediciones se realizaron a las 12:00 h y se corresponden con el valor promedio.

El riego se aplicó por micro-aspersión durante diez minutos a las 9:00 y 14:00 h y se fertilizó cada diez días con una mezcla de fertilizante foliar de N-P-K cristalino [1,0 g·L<sup>-1</sup>] y Multimicro Combi (Haifa Chemicals Ltd., Haifa Bay 26120, Israel) [62,5 mg·L<sup>-1</sup>].

#### **3.0.3 Diseño experimental**

Se seleccionaron 400 plantas homogéneas de cinco meses de edad en condiciones de aclimatación con 34 – 36 g de masa fresca, 13 – 14 hojas y 12 – 13 raíces funcionales. Se mantuvo el programa de fertilización del instructivo técnico de aclimatación descrito en el acápite 3.0.2. Las plantas se dividieron en dos grupos experimentales y se trasladaron al exterior de la casa de cultivo donde crecieron durante 30 días bajo las condiciones ambientales descritas en la mitad superior de la tabla 1. Transcurrido este periodo se modificaron las condiciones de riego y se procedió como se describe en la mitad inferior de

### **Capítulo III**

la tabla 1. El momento inicial del experimento (0 días) se correspondió con el día 31 del traslado de las plantas al exterior de la casa de cultivo.

**Tabla 1.** Condiciones ambientales y de riego de las plantas micropropagadas de piña ‘MD-2’ en la etapa final de aclimatización.

Variables ambientales	Luz (12:00 h)	Humedad relativa (%)		Temperatura (°C)	
	FFF ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	12:00 h	0:00 h	12:00 h	0:00 h
	$700 \pm 50$	$56 \pm 2$	$79 \pm 4$	$36 \pm 3$	$26 \pm 3$

Condiciones experimentales	Edad fisiológica de las plantas		
	Hasta 0 días	De 0 - 30 días	De 30 - 45 días
Riego	120 mL/planta <sup>(1)</sup>	120 mL/planta	240 mL/planta <sup>(3)</sup>
Déficit Hídrico	120 mL/planta	0mL/planta <sup>(2)</sup>	240 mL/planta

<sup>(1)</sup> Riego realizado cada 48 h; <sup>(2)</sup> Sin riego; <sup>(3)</sup> Riego diario a las 9:00 h. Los datos de las variables ambientales se corresponden con el promedio de mediciones realizadas durante el periodo experimental.

Dentro de cada grupo las plantas se ubicaron de modo que se entrelazaran las hojas entre las plantas vecinas (sin separación entre los envases de cultivo). A cada grupo se le aplicó fertilización foliar a las 9:00 h dentro de la cantidad de agua suministrada en el momento inicial de evaluación del experimento (N-P-K cristalino [1,0 g L<sup>-1</sup>] y Multimicro Combi (Haifa Chemicals Ltd., Haifa Bay 26120, Israel [62,5 mg L<sup>-1</sup>]).

El riego se realizó con una regadera manual, distribuyendo de manera homogénea 24 L de agua cada 48 h sobre la superficie foliar de las plantas. En el día 31 del experimento se aplicó fertilización foliar a las 9:00 h (N-P-K cristalino [1,0 g L<sup>-1</sup>] y Multimicro Combi (Haifa Chemicals Ltd., Haifa Bay 26120, Israel [62,5 mg L<sup>-1</sup>])).

## **Capítulo III**

### **3.0.4. Procesamiento estadístico de los datos**

Se utilizó el *software* “*Statistica*” versión 8.0 (“Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA”). Se comprobó el ajuste a la distribución normal aplicando “Shapiro-Wilk'stest”,  $p \geq 0,05$  y la homogeneidad de varianzas mediante “Levene's test”,  $p \leq 0,05$ . Se compararon las medias utilizando pruebas paramétricas “*t-Student's test*”,  $p \leq 0,05$  o “Factorial ANOVA” seguido por “*Tukey's test*”,  $p \leq 0,05$ . Cuando los datos no cumplieron los supuestos de normalidad u homogeneidad de varianzas se compararon las medianas utilizando “Mann-Whitney U Test”,  $p < 0,05$  o “Kruskal-Wallis test” seguido por “Multiplecomparisons's test”,  $p < 0,05$ . Cada tabloa figura del capítulo “Resultados y Discusión” incluye la información detallada de las pruebas estadísticas utilizadas en cada caso.

### **3.1. Efecto de la sequía sobre el estatus hídrico y la producción de biomasa**

#### **3.1.1. Determinación de la masa seca y el contenido de agua de la hoja D**

Se seccionaron 10 discos de hojas de  $0,785 \text{ cm}^2$  de la región media central de la hoja D de tres plantas colectadas cada tres horas durante un día completo, las muestras se envolvieron por separado en papeles de aluminio pesados e identificados previamente. La masa fresca (MF) se calculó por la diferencia entre la masa total y la masa del papel de aluminio, seguidamente las muestras identificadas se secaron en una estufa a  $170 \text{ }^\circ\text{C}$  y se pesaron cada 24 horas hasta obtener un peso constante. La masa seca (MS) se calculó mediante la diferencia entre la masa total seca y la masa del papel, y el contenido de agua (CA) con la diferencia entre las masas fresca y seca. Los resultados se expresaron como  $\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

### **3.2. Efecto de la sequía sobre la eficiencia hídrica y metabólica para la asimilación de dióxido de carbono**

## **Capítulo III**

### **3.2.1. Cuantificación del intercambio gaseoso en las hojas**

El intercambio gaseoso se cuantificó en la región media central de la hoja D de tres plantas, a intervalos de tres horas hasta completar un día completo. Se utilizó un analizador infrarrojo de gases “IRGA” (del inglés: “InfraRed Gas Analysers”) como parte de un sistema portátil de fotosíntesis “PP-systems, CIRAS-2” (del inglés: “Portable Photosynthesis Systems” [www.ppsystems.com](http://www.ppsystems.com)) acoplado a una cubeta (PLC6 (U) con un área de análisis de 1,7 cm<sup>2</sup>. La asimilación de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{molCO}_2\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y la transpiración ( $\text{mmolH}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) se cuantificaron bajo condiciones de temperatura y humedad relativa ambientales dentro del microambiente de la cubeta. La intensidad de la luz de la cubeta se ajustó mediante diodos emisores de luz “LED” (del inglés: “Light Emisor Diodes”) a un FFF de  $600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Aragón et al., 2012).

### **3.2.2. Determinación de los niveles de ácidos orgánicos**

Se tomó la hoja D de tres plantas colectadas cada tres horas hasta completar un día. Se seccionaron tres discos de 0,785 cm<sup>2</sup> correspondientes al área media central de dichas hojas y se conservaron en nitrógeno líquido (NL) hasta el momento de las determinaciones. Los discos se colocaron dentro de un tubo de ensayo, se añadieron 10 mL de Etanol al 50 % y se incubaron en un baño a 90 °C durante 20 minutos. Se separó la fase líquida y se realizó una valoración ácido-base con NaOH [20,0mM] y fenolftaleína [1,0 mg L<sup>-1</sup>] como indicador (Ceusters et al., 2014). Los resultados se expresaron como  $\mu_{\text{eq. H}^+}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

Se calculó tanto la asimilación de CO<sub>2</sub> como la transpiración neta que presentaron las plantas durante el día completo, para esto se utilizó el software “Graph” (Versión 4.2.2 <http://www.padowan.dk>), mediante el cual se calculó el área bajo la curva descrita por los

### **Capítulo III**

patrones de intercambio que presentaron las plantas durante el día completo.

#### **3.2.3. Eficiencia hídrica y metabólica**

Se calculó la eficiencia neta en el uso del agua ( $\text{mmol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ ) dividiendo la cantidad neta de  $\text{CO}_2$  captado entre la cantidad de agua transpirada por las plantas durante el día completo. También se calculó la fracción que representó la captación de  $\text{CO}_2$  de las plantas entre las 21:00 y las 6:00 h respecto a la captación de  $\text{CO}_2$  durante todo el día, y el porcentaje de reciclaje de  $\text{CO}_2$  durante la noche mediante la siguiente ecuación  $\% R \text{CO}_2 = 100 \times [(0.5 \times \Delta\text{H}^+) - \int A_N] / (0.5 \times \Delta\text{H}^+)$  (Griffiths et al., 1989), donde  $\Delta\text{H}^+$  = acumulación nocturna de ácidos y  $\int A_N$  = integración del patrón de intercambio de  $\text{CO}_2$  durante la noche. Por otra parte, se calculó el área negativa de los patrones para determinar la cantidad de  $\text{CO}_2$  liberado por las plantas durante el día. Tanto la relación de la captación de  $\text{CO}_2$  como la liberación de  $\text{CO}_2$  se determinaron a partir de la integración parcial o total de la curva descrita por los patrones de intercambio.

#### **3.3. Efecto de la sequía sobre la capacidad defensiva de las plantas contra el estrés oxidativo**

Tanto el contenido de proteínas como la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se determinaron a las 15:00 h en el momento inicial y a los 15, 30 y 45 días del experimento. Las determinaciones bioquímicas se realizaron a los 30 días de experimento. Se determinó el contenido de proteínas solubles totales y la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD).

##### **3.3.1 Extracción de Proteínas**

Las muestras se colectaron a las 15:00 h en el momento inicial del experimento y a los 15,

### **Capítulo III**

30 y 45 días, y se conservaron en nitrógeno líquido hasta el momento de las determinaciones. Para la extracción se pesaron 0,25 g de material vegetal congelado y se trituraron en un mortero en presencia NL hasta obtener un polvo fino. Se añadieron 2,0 ml de tampón de extracción con 50 mM fosfato de potasio pH 7,8; 1,0 mM EDTA; 0,1% Tritón X-100 (v/v); 1,0 % PVP (m/v); 1,0mM DTT y 1,0mM PMSF y se agitó con el pistilo hasta homogeneizar. La suspensión resultante se centrifugó a 15 000 g durante 20 minutos a 4°C (Wang and Jiang, 2007). Seguidamente se separaron los sobrenadantes y se purificaron mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando Sephadex G-25 cargado en columnas de 10 mL. Las columnas cargadas con la muestra se centrifugaron durante 5 minutos a 4000g y 4°C. Para el control de la calidad de la purificación se determinó el contenido de proteínas y la actividad de la enzima Superóxido dismutasa antes y después del procesado con Sephadex G-25. La centrifugación de las muestras se realizó utilizando una centrífuga refrigerada Healforce® modelo neofuge 15R. Los métodos de cuantificación de proteínas y actividad SOD se describen en el siguiente epígrafe.

#### **3.3.2. Cuantificación de Proteínas Solubles Totales**

Se empleó el método de Bradford (1976), que permite determinar espectrofotométricamente el contenido de proteínas mediante la unión directa de Azul de *Coomassie* a proteínas que contienen arginina, triptófano, tirosina, histidina y residuos de fenilalanina. Se utilizó BSA como proteína estándar para preparar la curva patrón de proteínas (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 y 17,5  $\mu\text{gBSA}$ ). Se adicionó 900  $\mu\text{L}$  de reactivo a 100  $\mu\text{L}$  de volumen compuesto por la muestra o BSA, convenientemente diluidas, y se midió la densidad óptica (DO) a 595 nm, a 20 min tras la adición del reactivo (período de estabilidad del complejo). Conocidos los valores de DO, se construyó una recta mediante

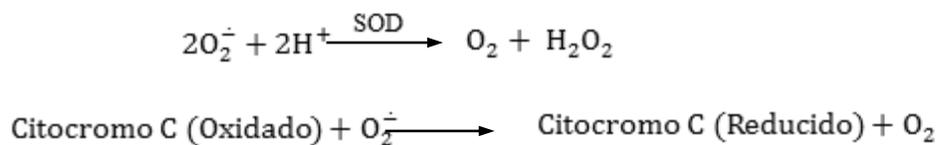
### **Capítulo III**

regresión lineal con los datos de la curva patrón de albúmina y se calculó la concentración de proteínas por interpolación de los valores de absorbancia de las muestras. Las mediciones de DO se realizaron utilizando un espectrofotómetro Rayleigh modelo VIS-7236. La concentración de proteínas se expresó como  $\mu\text{g mgMS}^{-1}$ .

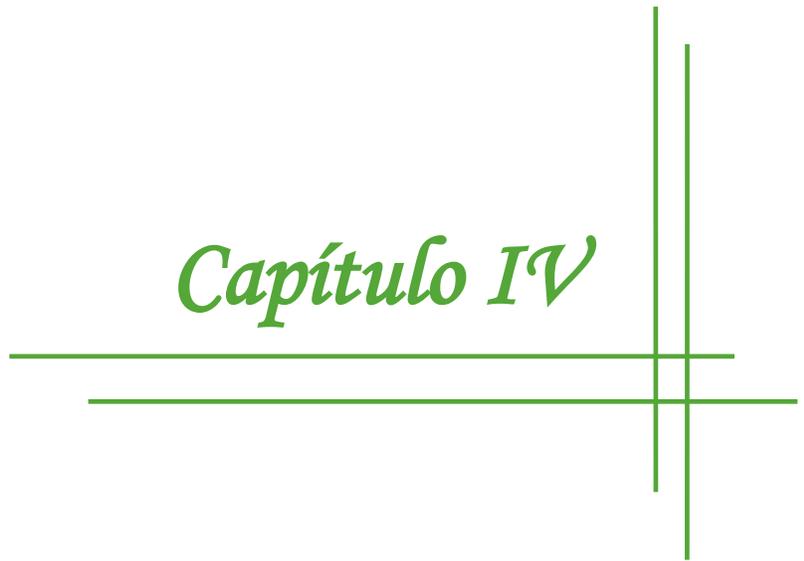
#### **3.3.3. Determinación de la actividad enzimática de superóxido dismutasa**

La actividad de la enzima SOD se cuantificó por el método de oxidorreducción del citocromo C utilizando xantina/xantina oxidasa como fuente de radicales superóxido (McCord and Fridovich, 1969). El medio de ensayo para 1,0 mL de mezcla de reacción contenía 50 mM de tampón fosfato de potasio ajustado con KOH a pH 7,6; 0,1 mM EDTA; 0,01 mM citocromo C; 0,05 mM de xantina y 0,03 unidades de xantina oxidasa (EC 1.1.3.22 Sigma Aldrich) para 20  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático crudo (Aragón et al., 2012).

La reacción se inició con la adición de xantina oxidasa y se monitoreó la DO a 550 nm durante tres minutos a intervalos de 10 segundos. Se preparó un medio de reacción patrón como blanco, y otro sin la muestra experimental para determinar la velocidad de reducción del citocromo C. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima capaz de inhibir en un 50% la velocidad de reducción del citocromo C. Las mediciones de DO se realizaron utilizando un espectrofotómetro Rayleigh modelo VIS-7236. Los resultados de actividad enzimática se expresaron como  $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \text{MS}$ .



## *Capítulo IV*



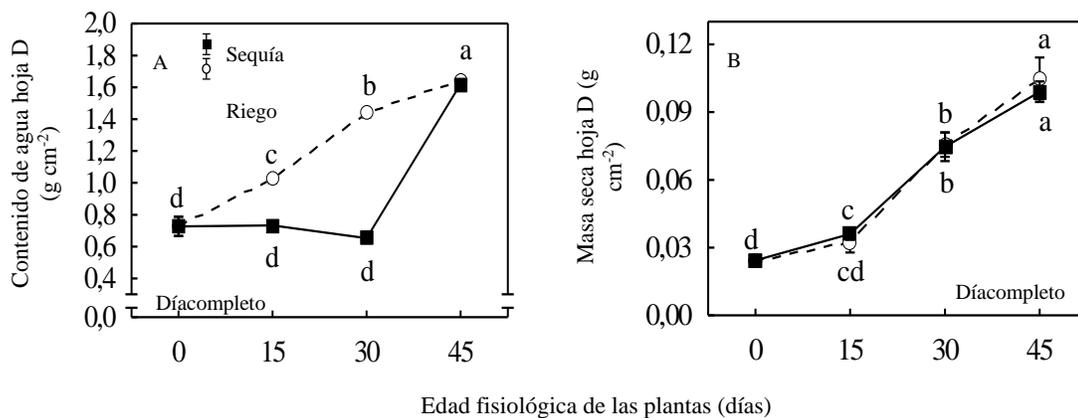
## Capítulo IV

### CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

#### 4.1. Efecto de la sequía sobre el estatus hídrico y la producción de biomasa

##### 4.1.1. Contenido de agua y masa seca

Las plantas que se expusieron a déficit hídrico durante 30 días presentaron una disminución continua de su contenido de agua durante este periodo, sin embargo cuando se regaron hasta la saturación del sustrato durante los 15 días posteriores presentaron un aumento significativo (Figura 1.A). En contraste las plantas que se mantuvieron bajo condiciones de riego presentaron un incremento continuo durante todo el periodo experimental, se observaron diferencias significativas entre grupos en los momentos de déficit hídrico (15 y 30 días) pero no cuando se regaron hasta la saturación del sustrato durante los 15 días posteriores (45 días).



**Figura 1.** Respuesta del contenido de agua (A) y masa seca (B) de la hoja D de plantas micropropagadas de piña 'MD-2' crecidas durante 30 días bajo condiciones de riego (120 mL/planta cada dos días) y déficit hídrico (0 mL/planta). A partir de los 30 días ambos grupos se regaron diariamente durante 15 días hasta la saturación del sustrato. Cada punto se corresponde con el valor de la media  $\pm$  error estándar. Letras distintas representan diferencias entre grupos después de aplicar "Factorial ANOVA" y "Tukey's test"  $p \leq 0,05$  para  $n = 36$  plantas.

## **Capítulo IV**

Por otra parte, ambos grupos presentaron valores similares de la masa seca de la hoja D en cada momento de evaluación y mostraron un incremento continuo en la medida que aumentó su edad fisiológica.

Las plantas SR se mantuvieron 30 días bajo condiciones de déficit hídrico severo, por lo que la desecación del sustrato en el tiempo debió interferir en el contenido de agua de las hojas. Sin embargo este indicador se incrementó considerablemente en las plantas SR a los 45 días de evaluación, momento que coincide con la exposición de ambos grupos a condiciones de saturación del sustrato durante 15 días.

Es importante señalar que el contenido de agua en las hojas de las plantas SR alcanzó valores similares a las plantas CR a los 45 días de evaluación, esto debió corresponderse con la síntesis de tejidos de reserva de agua en las plantas SR durante el periodo de déficit hídrico, soportado con que es característico en plantas CAM terrestres un aumento del contenido de agua como una respuesta adaptativa de las plantas a condiciones limitantes de humedad, lo cual está relacionado fundamentalmente con la síntesis de tejidos de reserva de agua y con el aumento del potencial osmótico de las células provocado por una mayor acumulación de ácido málico (Borland et al., 2006).

En cuanto a los valores de MS, ambos grupos presentaron tendencias similares en todos los momentos de evaluación, a pesar de las condiciones de estrés a las que fueron sometidas las plantas del grupo SR ante la exposición al déficit hídrico. Esto pudo deberse a la síntesis de otros compuestos impermeables de mayor peso molecular como las ceras y polímeros, que permiten aumentar el potencial osmótico o a la síntesis de tejidos de reserva de agua. La

## **Capítulo IV**

capacidad de producir biomasa eficientemente que mostraron las plantas SR, es otra evidencia de su capacidad adaptativa y tolerancia a la sequía.

### **4.2. Efecto de la sequía sobre la eficiencia hídrica y metabólica para la asimilación de dióxido de carbono**

#### **4.2.1. Respuesta de los patrones de intercambio gaseoso y ácidos orgánicos**

En la figura 2 se muestran los patrones de intercambio gaseoso (intercambio de CO<sub>2</sub> (A) y transpiración (B) y niveles de ácidos orgánicos (AO) (C) que presentaron las plantas micropropagadas de piña ‘MD-2’ bajo condiciones de riego y déficit durante 30 días, momento a partir del cual ambos grupos se regaron diariamente hasta la saturación del sustrato durante 15 días consecutivos.

En todos los momentos de evaluación excepto a los 30 días los dos grupos de plantas presentaron tendencias similares de intercambio de CO<sub>2</sub> (Figura 2. A), transpiración (Figura 2. B) y niveles de ácidos orgánicos (Figura 2. C) con valores superiores entre las 0:00 y las 9:00 h y menores entre las 12:00 y 21:00 h. Presentaron máximos de intercambio gaseoso y de niveles de ácidos orgánicos entre las 6:00 y las 9:00 horas, además de valores próximos a cero de intercambio de CO<sub>2</sub> a las 12:00 y 21:00 h y negativos entre estas horas.

Independientemente de las similitudes, las plantas que se expusieron a déficit hídrico presentaron desviaciones en sus patrones sobre todo a los 30 días (Figura 2) pero más acentuado en el intercambio gaseoso y transpiración que en los niveles de ácidos orgánicos, sin embargo ya a los 15 días las plantas expuestas a déficit hídrico mostraron desviaciones, tuvieron menores valores de captación de CO<sub>2</sub>, transpiración y niveles de ácidos orgánicos

## **Capítulo IV**

entre las 0:00 y 9:00 h (Figura 2A, 2B y 2.C respectivamente), menor liberación de CO<sub>2</sub> y transpiración entre las 12:00 y 21:00 h y valores inferiores de niveles de ácidos orgánicos entre las 15:00 y 21:00 h.

A los 30 días las plantas que se expusieron a déficit hídrico no presentaron la respuesta típica observada en el resto de los momentos de evaluación, su patrón de intercambio gaseoso fue prácticamente invariable durante todo el día, con una ligera desviación a las 3:00 h en el caso de la captación de CO<sub>2</sub> (Figura 2. A), además a las 21:00 h tuvieron niveles de ácidos orgánicos por debajo de los niveles observados en el resto de los patrones, a esta hora estos valores siempre fueron marcadamente superiores a los observados a las 15:00 y 18:00 h.

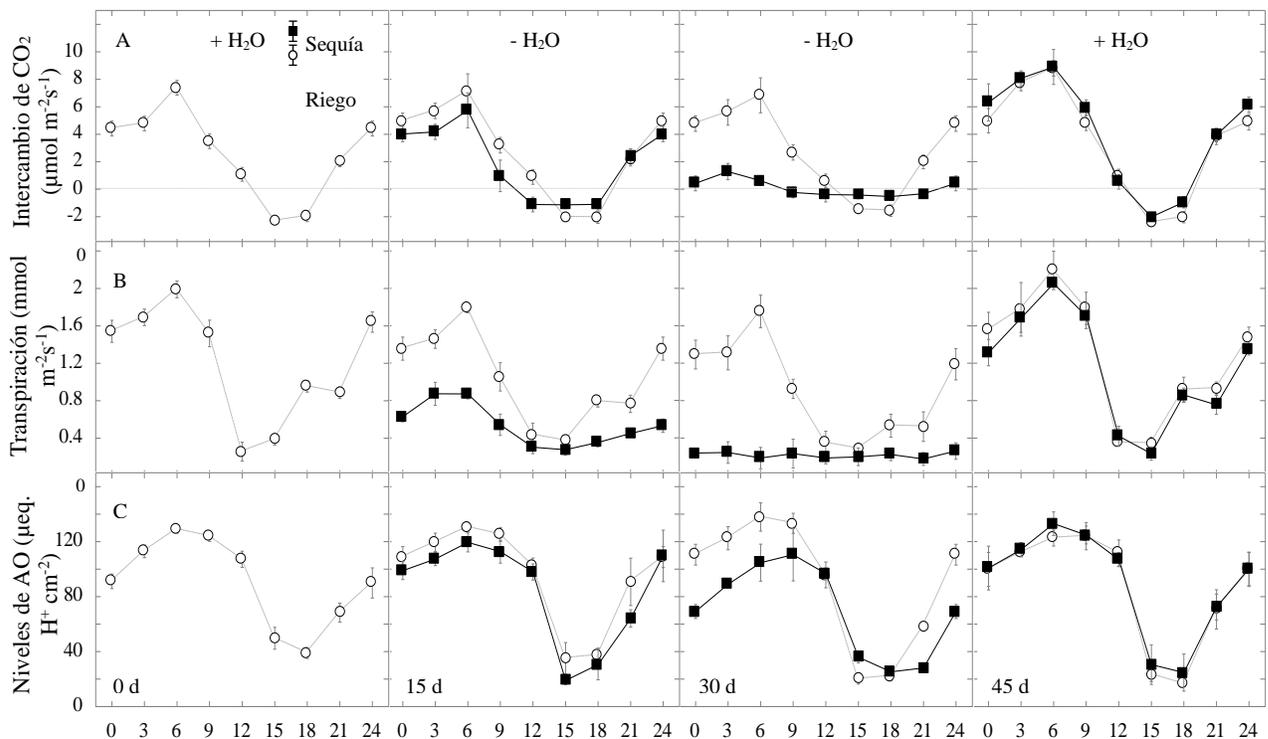
Cuando se regó diariamente hasta la saturación del sustrato los patrones de intercambio gaseoso y de niveles de ácidos orgánicos presentaron una similitud considerable tanto en la tendencia como los valores entre ambos grupos de plantas durante todo el día, excepto en los valores de intercambio gaseoso que tuvieron las plantas a las 9:00 y 12:00 h, con valores superiores al resto de los momentos evaluados. Sin embargo las plantas que se expusieron a déficit hídrico entre las 0:00 y las 9:00 h presentaron valores de transpiración ligeramente inferiores a las plantas que se mantuvieron con riego, además de valores de intercambio de CO<sub>2</sub> ligeramente superiores a las 15:00 y 18:00 h.

En el caso de los valores obtenidos por las plantas sometidas a déficit hídrico, se observó una disminución significativa durante la noche en la asimilación de CO<sub>2</sub> de las plantas SR a los 15 días, esta disminución es un indicio del aumento de la expresión de CAM. Sin embargo a los 30 días disminuyó considerablemente la asimilación en las plantas SR, esto

## Capítulo IV

apoya los resultados obtenidos en el contenido de agua de las hojas, donde se observó una disminución en este indicador provocado por el déficit hídrico (figura 1A). Es importante señalar que las plantas SR no asimilaron  $\text{CO}_2$  durante toda la noche, solo a las 3:00 h y a las 6:00 h, lo cual constituye un beneficio debido a las condiciones ambientales favorables a esas horas.

Tanto el intercambio de  $\text{CO}_2$  como la transpiración de ambos grupos fueron superiores durante las horas de oscuridad e inferiores y/o negativos durante las horas de luz (Figs. 1A y B respectivamente), además presentaron una respuesta similar del patrón de ácidos



**Figura 2.** Respuesta de los patrones de intercambio de  $\text{CO}_2$  (A), transpiración (B) y niveles de ácidos orgánicos (AO) (C) de hojas D de plantas micropropagadas de piña ‘MD-2’ crecidas bajo condiciones de riego (120 ml/plantas cada dos días) y déficit hídrico (0 ml/plantas). Después de 30 días ambos grupos se regaron hasta la saturación del sustrato (120 mL/planta diariamente). Cada punto se corresponde con el valor de la media  $\pm$  error estándar para  $n=4$  plantas. Las mediciones se realizaron cada tres horas hasta completar un día.

## **Capítulo IV**

orgánicos implicando incremento de acidez durante las horas de noche. La acumulación de estos ácidos y la apertura estomática durante la noche son el principal diagnóstico de la ocurrencia de CAM (Borland et al., 2011), generalmente las plantas con este metabolismo captan el CO<sub>2</sub> ambiental en horas de oscuridad, cuando las condiciones climáticas favorecen el gradiente mínimo para la evapotranspiración (Nobel, 2009), el incremento en la humedad relativa del aire durante la noche (Tabla 1.) debió favorecer la apertura estomática nocturna en respuesta al decrecimiento del gradiente para la transpiración y al incremento en la presión parcial del vapor de agua en el ambiente (Drennan and Nobel, 2000, Nobel and Edward, 2002, Nobel, 2009). La apertura estomática durante la noche debió ser la respuesta de procesos metabólicos con ocurrencia en especies con CAM, teniendo en cuenta que la transpiración cuticular de plantas de piña es despreciable dada la superficie cerosa que poseen (Bartholomew et al., 2003), esto demuestra que tuvieron una respuesta CAM.

Los cambios en los niveles de ácidos observados entre el día y la noche (Figura. 1C) debieron corresponderse principalmente con los cambios de los niveles de ácido málico. Las plantas con CAM captan el CO<sub>2</sub> durante la noche mediante la acción coordinada de enzimas de la ruta C<sub>4</sub>, como producto intermedio se obtiene el ácido málico que se acumula en el interior de la vacuola durante la noche y se descarboxila durante el día, además se ha demostrado que las variaciones de ácidos se corresponden fundamentalmente con los cambios de los niveles de malato, citrato e isocitrato (Herrera, 2009), pero en *Ananas comosus* los niveles de citrato e isocitrato permanecen prácticamente invariables (Popp et al., 2003, Chen and Nose, 2004), de esta forma se puede establecer una relación más o

## **Capítulo IV**

menos directa entre los niveles de ácido málico y los niveles de ácidos orgánicos, consecuentemente ambos grupos presentaron tales variaciones de acidez y por ende debieron acumular ácido málico durante las horas de noche y su seguida descarboxilación durante el día, tal como ocurre en las plantas con CAM. Esto indica que los valores significativamente mayores de los niveles de ácidos orgánicos en las plantas SR a los 15 días están estrechamente relacionados con una mayor fijación de CO<sub>2</sub> en fosfoenolpiruvato (PEP) vía PEPC en la ruta C<sub>4</sub>, rindiendo mayor cantidad de ácido málico. Sin embargo a los 45 días las variaciones de ácidos entre el día y la noche alcanzan valores similares en ambos grupos lo que muestra una recuperación del estrés hídrico.

Por otra parte ambos grupos mostraron máximos de intercambio de CO<sub>2</sub> al amanecer (Figura 1A). La mayoría de las plantas con CAM presentan máximos de intercambio gaseoso durante este momento, esto se debe a que se deben encontrar activas las dos enzimas principales captadoras de CO<sub>2</sub> en plantas, fosfoenolpiruvatocarboxilasa (PEPC, EC 4.1.1.31) comenzando a desactivarse por la acción del reloj circadiano y la Ribulosa 2,6-bisfosfato Carboxilasa/Oxigenasa (RubisCO, EC 4.1.1.39) a activarse por la acción de la luz (Borland and Taybi, 2004), ambas pueden captar directamente el CO<sub>2</sub> ambiental y por ende incrementarse la captación de CO<sub>2</sub> mientras permanezcan activas simultáneamente (Ceusters et al., 2014), en este experimento tanto RubisCO como PEPC debieron encontrarse activas a las 6:00 h, lo cual se relaciona con el incremento de la captación de CO<sub>2</sub> en este momento (Figura. 1A).

Ambos grupos respondieron como plantas con CAM dada la similitud de la respuesta de los patrones de intercambio gaseoso y de niveles de ácidos, además de su correspondencia con

## **Capítulo IV**

los que presentan las plantas con este metabolismo, sin embargo las plantas que se expusieron a la sequía temporal presentaron una desviación respecto a las plantas con riego.

En el caso de la transpiración las plantas CR mantuvieron valores similares a partir de los 30 días, sin embargo en los primeros 15 días mostraron valores superiores en esta variable.

En las plantas SR se observó una disminución de la transpiración con el aumento del déficit hídrico y luego un aumento considerable a los 45 días. Las plantas sin riego mostraron disminución de la transpiración a los 30 días, en este momento también disminuye la asimilación de CO<sub>2</sub> y el contenido de agua de las hojas, por lo que se puede decir que en este momento el déficit hídrico provocó desecación en las hojas.

La disminución significativa en todos los indicadores de intercambio gaseoso a los 30 días, indica estrés hídrico severo, sin embargo se observó una recuperación en estas variables a los 45 días con la restauración del riego, lo que demuestra que las plantas de piña micropropagadas al final de la etapa de aclimatización presentaron una gran flexibilidad metabólica y una elevada tolerancia a la sequía.

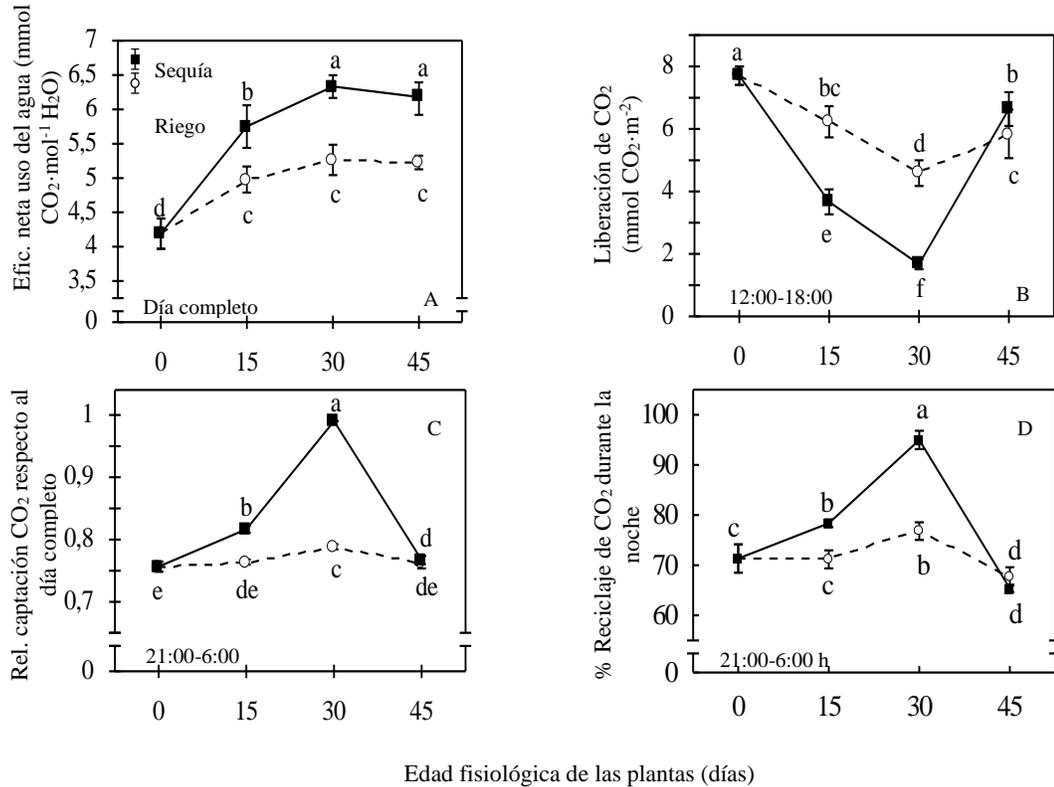
### **4.2.2. Eficiencia hídrica y metabólica**

En el caso de la eficiencia hídrica, ambos grupos presentaron tendencias similares en todos los momentos de evaluación, observándose un aumento progresivo con el aumento de la edad fisiológica de las plantas. En todos los casos, las plantas sin riego tuvieron valores marcadamente mayores a las plantas con riego, sobre todo a los 30 días de evaluación.

En el caso de la liberación de CO<sub>2</sub> se observó una tendencia similar en los dos grupos de plantas, los cuales presentaron una disminución de los valores durante el periodo de sequía,

## Capítulo IV

seguido de un aumento al restablecer el riego. Sin embargo las plantas que se expusieron a estrés hídrico mostraron menor liberación de CO<sub>2</sub> hasta los 30 días. En contraste a los 45 días las plantas SR alcanzaron valores mayores que las plantas con riego.



**Figura 3.** Respuesta de la eficiencia en el uso del agua (A), liberación de CO<sub>2</sub> durante el día (B) relación de captación de CO<sub>2</sub> (C), y porcentaje de reciclaje de CO<sub>2</sub> durante la noche (C) de plantas micropropagadas de piña 'MD-2' crecidas durante 30 días bajo condiciones de riego (120 mL/planta cada dos días) y déficit hídrico (0 mL/planta). A partir de los 30 días ambos grupos se regaron diariamente durante 15 días hasta la saturación del sustrato. Cada punto se corresponde con el valor de la mediana ± error estándar. Letras distintas representan diferencias entre grupos después de aplicar "Kruskal-Wallis's test" "MultipleComparisons's test" p<0,05 para n=4 plantas.

## **Capítulo IV**

Por otra parte tanto la relación de asimilación de CO<sub>2</sub> entre la noche y el día entero y el porcentaje de reciclaje de CO<sub>2</sub> (% R) de ambos grupos de plantas aumentó durante el período de déficit hídrico y disminuyó con el restablecimiento del riego. Las plantas en condiciones de déficit fueron más significativas. La proporción de asimilación de CO<sub>2</sub> de las plantas sin riego aumentó a los 30 días de sequía, sin embargo, a los 15 días después del restablecimiento del riego decreció considerablemente y no difirió de las plantas con riego. Al igual que la tasa de captación de CO<sub>2</sub>, el % R de las plantas bajo condiciones de estrés hídrico aumentó durante el período de sequía y disminuyó después de 15 días de restablecer el riego, momento en el que los valores obtenidos por el grupo de plantas sometidas a estrés hídrico fueron similares al grupo de plantas con riego.

Un incremento en la eficiencia hídrica está estrechamente relacionado con un incremento grado de expresión en plantas CAM terrestres (Lüttge, 2004). Además, respecto al tamaño de los órganos de las plantas CAM, los estomas aparecen en bajas densidades y presentan bajas conductividades al vapor de agua, reflejando una alta capacidad de almacenaje de agua en las hojas y tallos, disminución de la relación área-volumen y elevada eficiencia hídrica (Borland et al., 2009). Esto apoya el incremento del contenido de agua de las hojas en las plantas SR a los 45 días (figura 1A), y el aumento de la eficiencia hídrica de las plantas sin riego a los 15 y 30 días de evaluación (figura 3A).

A modo de resumen las plantas SR presentaron una menor asimilación que las plantas CR a los 15 días de déficit hídrico y valores de transpiración significativamente menores que las plantas CR, por ende mayor eficiencia hídrica ya que la relación de asimilación de CO<sub>2</sub>-transpiración es mayor.

## **Capítulo IV**

La disminución de la liberación de CO<sub>2</sub> entre las 12:00 y las 18:00 h que presentaron las plantas expuestas a sequía fue una respuesta de aclimatación a estrés hídrico, durante estas horas las plantas debieron activar rutas bioquímicas defensivas para evitar la pérdida de agua y consigo evitar la pérdida del CO<sub>2</sub> liberado tanto en el proceso respiratorio como en la descarboxilación del ácido málico. Generalmente en las plantas con CAM la liberación del CO<sub>2</sub> en horas de la tarde tiende a disminuir ante condiciones estresantes, sobre todo ante sequía. Como tendencia, se activan mecanismos defensivos para lograr una mayor eficiencia en la regulación de apertura y cierre de estomas, además sintetizan compuestos que incrementan el potencial osmótico celular con el fin de retener mayor cantidad de agua y por consiguiente CO<sub>2</sub> (Rodríguez-Escriba et al., 2015). Durante estas horas se encuentra activa la enzima RubisCO que es una de las enzimas claves para la captación de CO<sub>2</sub> en las plantas (Herrera, 2009).

En las plantas con CAM RubisCO capta directamente el CO<sub>2</sub> liberado por los procesos respiratorios, por la descarboxilación del malato y directamente del ambiente cuando los estomas están abiertos (Rodríguez-Escriba et al., 2014). En este experimento durante las 12:00 y las 18:00 h los estomas de las plantas expuestas a sequía debieron estar completamente cerrados dado que la transpiración fue despreciable entre estas horas (fig. 2B). La semipermeabilidad de las membranas celulares al agua y la permeabilidad a las moléculas de CO<sub>2</sub>, indicaron que los mecanismos de concentración de CO<sub>2</sub> debieron ser más eficientes para que RubisCO captara mayor cantidad de CO<sub>2</sub> producido por la respiración y descarboxilación del malato y por ende disminuir el CO<sub>2</sub> liberado a la atmósfera (Rodríguez-Escriba et al., 2014).

## **Capítulo IV**

El incremento en la asimilación durante la noche a los 15 días (Figura 3C) apoya directamente los valores de los niveles de ácidos orgánicos en las plantas SR observados en este momento (figura 2C). Un incremento en los niveles de ácidos orgánicos se explica por el aumento de la expresión y grado de fosforilación de PEPC, y consigo un incremento de la expresión de CAM, ya que además se conoce que existe una relación directa entre la expresión de enzimas relacionadas con la ruta C4 y el aumento de la expresión de CAM (Nimmo, 2003).

Plantas de *Ananas comosus* provenientes del cultivo *in vitro* en los primeros días de aclimatización se comportan como C3 y presentan cambios graduales a CAM bajo condiciones estresantes (Aragón et al., 2012), por otra parte se ha establecido que *Ananas comosus* es clasificada como “CAM constitutiva fuerte” bajo condiciones naturales de desarrollo (Bartholomew et al., 2003, Nelson and Sage, 2008), sin embargo el grado de expresión del metabolismo CAM es respuesta de procesos adaptativos a condiciones estresantes (Lüttge, 2004, Herrera, 2009, Lüttge, 2010).

Anteriormente se discutía que a los 30 días de evaluación, las plantas sin riego solo asimilaban CO<sub>2</sub> a las 3:00 y 6:00 h lo cual indica estrés hídrico severo. En este momento el CO<sub>2</sub> captado durante la noche representó aproximadamente el 100% de la asimilación durante todo el día. (Figura 3C) De acuerdo a los criterios de clasificación establecidos por(Herrera, 2009) este grupo mostró un comportamiento similar a plantas “CAM Idling” en lugar de “CAM facultativa” (Nievola et al., 2005, Freschi et al., 2010, Aragón et al., 2012, Aragón et al., 2013), o “CAM constitutiva” (Rodríguez-Escriba et al., 2014) como se ha demostrado para plantas de piña micropropagadas. La respuesta “CAM Idling” se

## **Capítulo IV**

corresponde con plantas severamente estresadas, con cierre estomático durante el ciclo diario y pequeñas variaciones en los niveles de ácidos orgánicos entre el día y la noche (Herrera, 2009), de modo que las plantas SR a los 30 días de déficit hídrico debieron reciclar aproximadamente el 100% del CO<sub>2</sub> liberado durante la respiración (Figura 3D).

Además se ha discutido por varios autores el efecto del estrés en la expresión y modulación de CAM (Nelson and Sage, 2008). Se ha demostrado que plantas de piña ‘MD-2’ de cuatro semanas en condiciones de aclimatización expuestas a condiciones estresantes FFF de 260  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 50 % humedad relativa (HR) y 28 °C presentaron expresión de genes que codifican para PEPC y PPCK así como un aumento de la captación de CO<sub>2</sub> durante la noche (Aragón et al., 2013), esto explica que las plantas SR mostraran mayor asimilación durante la noche a los 15 días de evaluación, (Figura 3D) además un aumento en la asimilación nocturna es una respuesta adaptativa de las plantas CAM, ya que constituye un beneficio captar mayor cantidad de CO<sub>2</sub> en momentos donde las condiciones ambientales son menos drásticas, y de esta forma evitar una pérdida excesiva de agua (Lüttge, 2004), esto indica que las plantas SR a los 30 días de déficit hídrico mostraron mayor tolerancia a la sequía.

### **4.3. Efecto de la sequía sobre la capacidad defensiva de las plantas contra el estrés oxidativo**

El contenido de proteínas de las plantas con riego disminuyó durante el período de secado y mantuvo valores similares después del restablecimiento de riego (figura 4A). Al igual que las plantas con riego pero más agravado el contenido de proteínas en el grupo de plantas sin riego disminuyó, pero aproximadamente tres veces más que el otro grupo de plantas

## **Capítulo IV**

durante el período de sequía, sin embargo después de 15 días al restablecer el riego aumento significativamente y no se observó diferencias significativas entre ambos grupos.

La figura 4B muestra el comportamiento de la actividad de la enzima Superóxido dismutasa (SOD). Se observaron diferencias significativas entre grupos a los 15 y 30 días.

En el caso de las plantas CR se observó un aumento continuo de la actividad SOD hasta los 30 días seguido de una disminución con el restablecimiento del riego hasta las condiciones de saturación del sustrato, sin embargo, en las plantas SR se observó un aumento significativo a los 15 días de evaluación sin diferencias significativas entre los valores obtenidos a los 30 días, luego mostraron una disminución en la actividad de SOD a los 45 días.

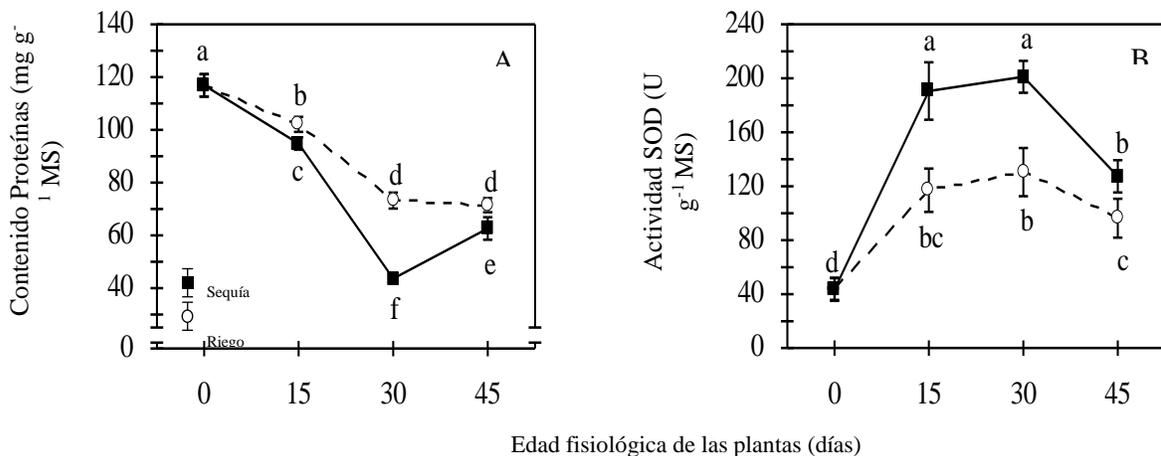
Comúnmente la sequía afecta la asimilación de los nutrientes de las plantas a través de la absorción de las raíces al disminuir el gradiente transpiracional aire-suelo. Las plantas en condiciones de sequía tenían menos transpiración por la disminución de la disponibilidad de agua en el suelo, lo que podría afectar la absorción de N. Ecofisiológicamente es importante considerar el factor N en relación con la disponibilidad de agua, en general, los contenidos de clorofila y tasas de fotosíntesis disminuyen bajo la limitación de N y esto también es válido para algunas combinaciones de factores en las plantas CAM (Lüttge, 2004).

La sequía afecta el contenido de proteínas solubles de las hojas tal vez por la disminución de la absorción de nitrógeno (N) del suelo. Sin embargo, debido a que las plantas sin riego no tuvieron emisión de hojas durante el periodo de sequía, la disminución del contenido de

## Capítulo IV

proteína soluble también podría estar relacionado con una degradación de RubisCO que se utilizaría como fuente de nitrógeno.

Las plantas de CAM pueden necesitar menos de N que las plantas C3, y por lo tanto tienen una mayor eficiencia de uso de nitrógeno (Griffiths et al., 1989, Lüttge, 2004). En las plantas C3, RubisCO puede representar el 50% o más de la proteína soluble total de hojas (Terashima and Hikosaka, 1995), pero las plantas CAM podrían necesitar menos RubisCO debido a su mecanismo de concentración de CO<sub>2</sub> (Lüttge, 2004). De este modo, debido al aumento de la expresión de la CAM, las subunidades RubisCO grandes podrían ser utilizadas como fuente N por las células para sintetizar compuestos metabólicos para funcionar como reguladores osmóticos o enzimas relacionadas con la respuesta defensiva contra el estrés oxidativo.



**Figura 4.** Respuesta del contenido de proteínas (A) y de la actividad de la enzima superóxido dismutasa de plantas micropropagadas de piña 'MD-2' crecidas durante 30 días bajo condiciones de riego (120 mL/planta cada dos días) y déficit hídrico (0 mL/planta). A partir de los 30 días ambos grupos se regaron diariamente durante 15 días hasta la saturación del sustrato. Cada punto se corresponde con el valor de la mediana  $\pm$  desviación estándar. Letras distintas representan diferencias entre grupos después de aplicar "Kruskal-Wallis's test" "MultipleComparisons's test"  $p < 0,05$  para  $n=4$  plantas.

## **Capítulo IV**

Por otra parte el déficit hídrico aplicado a las plantas SR provocó un aumento de la actividad SOD, esto indica que durante los momentos de déficit hídrico (15 y 30 días) las plantas SR debieron incrementar el grado de expresión ya que se ha demostrado que la expresión de CAM está estrechamente relacionado con rutas de estrés oxidativo (Ślesak et al., 2003, Aragón et al., 2013).

A partir de los 30 días se restableció el riego hasta condiciones de saturación del sustrato y consigo se observó una disminución significativa de la actividad de SOD en las plantas SR, esto implica una disminución de la expresión de CAM en este grupo.

Las plantas CR no alcanzaron los valores de actividad SOD de las plantas SR en ninguno de los momentos de déficit hídrico, esto indica que las plantas SR presentaron una mayor capacidad para la eliminación del radical superóxido respecto a las plantas CR y que a los 15 días las plantas SR presentaron mejor defensa contra el estrés oxidativo que las plantas CR y por ende mayor tolerancia a condiciones de sequía temporal.

De manera general las plantas SR mostraron mayor expresión CAM que las plantas CR durante el periodo de déficit hídrico, con mejor comportamiento de los indicadores en las plantas SR a los 15 días de experimento ya que a los 30 días se observó en este mismo grupo un comportamiento similar “CAM Idling”, lo cual demuestra estrés hídrico severo. Además se observó que las variables estudiadas demuestran una disminución de la expresión CAM con el restablecimiento del riego hasta la saturación del sustrato, de modo que las plantas de piña micropropagadas en la etapa final de aclimatización presentaron una fuerte flexibilidad metabólica, primero porque en tan solo 15 días de déficit hídrico las plantas tuvieron una respuesta considerable ante el estrés y consigo el aumento de la

## **Capítulo IV**

expresión CAM e incremento de la calidad morfológica, además 15 días después del restablecimiento del riego hasta saturación del sustrato se observó un incremento en los indicadores morfológicos relacionados con el crecimiento (figura 2A y C), por lo que se puede decir que las plantas SR presentaron mayor resistencia frente a condiciones de estrés hídrico con respecto a las plantas CR y respecto a ellas mismas en los otros momentos de evaluación, lo que implica que presenten mayor tolerancia a la sequía

.

*Conclusiones*



## **Conclusiones**

### **CONCLUSIONES**

1. La exposición de las plantas a sequía temporal no provocó una disminución significativa del contenido de agua ni afectó la producción de biomasa de las plantas.
2. La exposición de las plantas a sequía temporal favoreció el aumento de la eficiencia hídrica, capacidad de reciclaje del CO<sub>2</sub> y captación del mismo en horarios de mínima pérdida de agua.
3. La exposición de las plantas a sequía temporal fortaleció la primera línea defensiva para la eliminación del radical superóxido.
4. Con el restablecimiento del riego disminuyó la eficiencia metabólica ante condiciones adversas de crecimiento, la primera línea defensiva para la eliminación del radical superóxido y se mantuvo constante la eficiencia hídrica de las plantas, lo cual demuestra elevada flexibilidad metabólica y tolerancia a la sequía.

## *Recomendaciones*



## **Recomendaciones**

### **RECOMENDACIONES**

Realizar un estudio en piña MD-2 durante un tiempo más prolongado hasta determinar la tolerancia total a la sequía que presentan las plantas.

Realizar un estudio comparativo de la piña con otras especies CAM para evaluar el grado de tolerancia de la piña respecto a otros tipos de plantas con este metabolismo.

# *Bibliografía*



## **Bibliografía**

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AIRAKI, M. 2012. *Role of reactive oxygen species and reactive nitrogen species (ROS and RNS) in pepper (Capsicum annuum L.) plants during development and under low temperature stress*. Doctoral, Universidad de Granada.
- ARAGÓN, C., CARVALHO, L., GONZÁLEZ-OLMEDO, J. L., ESCALONA, M. & AMANCIO, S. 2012. The physiology of *ex vitro* pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions. *Plant Cell Reports*, 31, 757-69.
- ARAGÓN, C., PASCUAL, P., GONZÁLEZ-OLMEDO, J. L., ESCALONA, M., CARVALHO, L. & AMANCIO, S. 2013. The physiology of *ex vitro* pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions: proteomic and transcriptomic profiles. *Plant Cell Reports*, 32, 1807-1818.
- BAILEY, K. J., GRAY, J. E., WALKER, R. P. & LEEGOOD, R. C. 2007. Coordinate regulation of Phosphoenolpyruvate carboxylase and Phosphoenolpyruvate carboxykinase by light and CO<sub>2</sub> during C4 photosynthesis. *Plant Physiol*, 144, 479-486.
- BARTHOLOMEW, D. P., PAUL, R. & ROHRBACH, K. 2003. *The Pineapple. Botany, production and uses.*, Wallingford, CABI.
- BORLAND, A. M., BARRERA, V. A., CEUSTERS, J. & SHORROCK, K. 2011. The photosynthetic plasticity of Crassulacean Acid Metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in a changing world. *New Phytologist*, 191, 619-33.
- BORLAND, A. M., ELLIOTT, S., PATTERSON, S., TAYBI, T., CUSHMAN, J., PATER, B. & BARNES, J. 2006. Are the metabolic components of Crassulacean Acid Metabolism up-regulated in response to an increase in oxidative burden? *Journal of Experimental Botany*, 57, 319-28.
- BORLAND, A. M., GRIFFITHS, H., HARTWELL, J. & SMITH, J. A. 2009. Exploiting the potential of plants with Crassulacean Acid Metabolism for bioenergy production on marginal lands. *Journal of Experimental Botany*, 60, 2879-96.
- BORLAND, A. M., HARTWELL, J., JENKINS, G. I., WILKINS, M. B. & NIMMO, H. G. 1999. Metabolite control overrides circadian regulation of Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase and CO<sub>2</sub> fixation in Crassulacean Acid Metabolism. *Plant Physiol*, 121, 889-896.
- BORLAND, A. M. & TAYBI, T. 2004. Synchronization of metabolic processes in plants with Crassulacean Acid Metabolism. *J Exp Bot*, 55, 1255-65.
- BORLAND, A. M., WULLSCHLEGER, S. D., WESTON, D. J., HARTWELL, J., TUSKAN, G. A., YANG, X. & CUSHMAN, J. C. 2014. Climate-resilient agroforestry: physiological responses to climate change and engineering of crassulacean acid metabolism (CAM) as a mitigation strategy. *Plant, Cell & Environment*.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

## **Bibliografía**

- CEUSTERS, J., BORLAND, A. M., CEUSTERS, N., VERDOODT, V., GODTS, C. & DE PROFT, M. P. 2010. Seasonal influences on carbohydrate metabolism in the CAM bromeliad *Aechmea* 'Maya': consequences for carbohydrate partitioning and growth. *Annals of Botany*, 105, 301-309.
- CEUSTERS, J., BORLAND, A. M. & DE PROFT, M. P. 2009. Drought adaptation in plants with Crassulacean Acid Metabolism involves the flexible use of different storage carbohydrate pools. *Plant Sign Behav*, 4, 212-4.
- CEUSTERS, J., BORLAND, A. M., LONDERS, E., VERDOODT, V., GODTS, C. & DE PROFT, M. P. 2008. Diel shifts in carboxylation pathway and metabolite dynamics in the CAM Bromeliad *Aechmea* 'Maya' in response to elevated CO<sub>2</sub>. *Ann Bot*, 102, 389-397.
- CEUSTERS, J., BORLAND, A. M., TAYBI, T., FRANS, M., GODTS, C. & DE PROFT, M. P. 2014. Light quality modulates metabolic synchronization over the diel phases of Crassulacean Acid Metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 65, 3705-14.
- CORTES, J. A. H. 2013. Mecanismos antioxidantes de defensa (I): mecanismos no enzimáticos. *Sciences'Blog*
- COTE, F. X., ANDRE, M., FOLLIOU, M., MASSIMINO, D. & DAGUENET, A. 1989. CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> Exchanges in the CAM Plant *Ananas comosus* (L.) Merr. *Plant Physiol*, 89, 61-68.
- CRAYN, D. M., WINTER, K. & SMITH, J. A. 2004. Multiple origins of Crassulacean Acid Metabolism and the epiphytic habit in the neotropical family Bromeliaceae. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 3703-8.
- CUSHMAN, J. C. & BORLAND, A. M. 2002. Induction of Crassulacean Acid Metabolism by water limitation. *Plant Cell Env*, 25, 295-310.
- CHEN, L. S. & NOSE, A. 2004. Day-night changes of energy-rich compounds in Crassulacean Acid Metabolism (CAM) species utilizing hexose and starch. *Annals of Botany*, 94, 449-55.
- DANSO, E. K., AYEK, K. O., ODURO, V., AMITEYE, S. & AMOATE, H. M. 2008. Effect of 6-Benzylaminopurine and Naphthalene acetic acid on *in vitro* production of "MD2" pineapple planting materials. *World Applied Sciences Journal*, 3, 614-619.
- DAQUINTA, M. & BENEGAS, R. 1997. Brief review of tissue culture of pineapple. *New Pin Int Soc Hort Sci*, 3, 7-9.
- DODD, A. N., BORLAND, A. M., HASLAM, R. P., GRIFFITHS, H. & MAXWELL, K. 2002. Crassulacean Acid Metabolism: plastic, fantastic. *J Exp Bot*, 53, 569-80.
- DODD, A. N., GRIFFITHS, H., TAYBI, T., CUSHMAN, J. C. & BORLAND, A. M. 2003. Integrating diel starch metabolism with the circadian and environmental regulation of Crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Planta*, 216, 789-97.
- DOPAZO, A. R., ARMENTEROS, E., GAFAS, J. P., PEÑA, O., FORNARIS, L. M. & MULEN, L. 2009. Manejo del cultivo de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cv. Española Roja. *Citrifrut*, 26, 71-75.
- DRENNAN, P. M. & NOBEL, P. S. 2000. Responses of CAM species to increasing atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations. *Plant Cell Env*, 23, 767-781.

## **Bibliografía**

- ESCALONA, M., LORENZO, J. C., GONZÁLEZ, B., DAQUINTA, M., GONZÁLEZ, J. L., DESJARDINS, Y. & BORROTO, C. G. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18, 743-748.
- ESCALONA, M., SAMSON, G., BORROTO, C. & DESJARDINS, Y. 2003. Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 39, 651-656.
- FERNÁNDEZ, J. L. U. 2013. El cambio climático: sus causas y efectos medioambientales. *Anales de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid*, 71-98.
- FRESCHI, L., NIEVOLA, C. C., RODRIGUES, M. A., DOMINGUES, D. S., VAN SLUYS, M. A. & MERCIER, H. 2009. Thermoperiod affects the diurnal cycle of nitrate reductase expression and activity in pineapple plants by modulating the endogenous levels of cytokinins. *Plant Physiology*, 137, 201-12.
- FRESCHI, L., RODRIGUES, M. A., DOMINGUES, D. S., PURGATTO, E., VAN SLUYS, M. A., MAGALHAES, J. R., KAISER, W. M. & MERCIER, H. 2010. Nitric oxide mediates the hormonal control of Crassulacean Acid Metabolism expression in young pineapple plants. *Plant Physiology*, 152, 1971-85.
- GEHRIG, H., WOOD, J., CUSHMAN, M., VIRGO, A., CUSHMAN, J. & WINTER, K. 2005. Large gene family of Phosphoenolpyruvate carboxylase in the Crassulacean Acid Metabolism plant *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae) characterised by partial cDNA sequence analysis. *Funct Plant Biol*, 32, 467-472.
- GONZÁLEZ-OLMEDO, J. L., FUNDORA, Z., MOLINA, L. A., ABDULNOUR, J., DESJARDINS, Y. & ESCALONA, M. 2005. New contributions to propagation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 41, 87-90.
- GRIFFITHS, H., ONG, B. L., AVADHANI, P. N. & GOH, C. J. 1989. Recycling of respiratory CO<sub>2</sub> during Crassulacean acid metabolism: alleviation of photoinhibition in *Pyrrhosia piloselloides*. *Planta*, 179, 115-22.
- GURALNICK, L. J., CLINE, A., SMITH, M. & SAGE, R. F. 2008. Evolutionary physiology: the extent of C<sub>4</sub> and CAM photosynthesis in the genera *Anacampseros* and *Grahamia* of the Portulacaceae. *J Exp Bot*, 59, 1735-1742.
- HERRERA, A. 2009. Crassulacean Acid Metabolism and fitness under water deficit stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM good for? *Annals of Botany*, 103, 645-53.
- HERRERA, A. 2013. Crassulacean Acid Metabolism-cycling in *Euphorbia milii*. *AoB Plants*, 5, 1-9.
- HERRERA, A., BALLESTRINI, C. & MONTES, E. 2015. What is the potential for dark CO<sub>2</sub> fixation in the facultative crassulacean acid metabolism species *Talinum triangulare*? *J Plant Physiol*, 174, 55-61.
- HONG, H. T., NOSE, A. & AGARIE, S. 2004. Respiratory Properties and Malate Metabolism in Percoll-Purified Mitochondria Isolated from Pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. cv. Smooth Cayenne. *J Exp Bot*, 55, 2201-11.

## **Bibliografía**

- LÜTTGE, U. 2004. Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). *Annals of Botany*, 93, 629-52.
- LÜTTGE, U. 2008. *Physiological ecology of tropical plants.*, Berlin Springer-Verlag.
- LÜTTGE, U. 2010. Ability of Crassulacean Acid Metabolism plants to overcome interacting stresses in tropical environments. *AoB Plants*, 2010, 1-9.
- MAXWELL, K., BORLAND, A. M., HASLAM, R. P., HELLIKER, B. R., ROBERTS, A. & GRIFFITHS, H. 1999. Modulation of RubisCO activity during the diurnal phases of the Crassulacean Acid Metabolism plant *Kalanchoe daigremontiana*. *Plant Physiol*, 121, 849-856.
- MCCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. 1969. Superoxide Dismutase: Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (Hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049-6055.
- MISALOVA, A., DURKOVIC, J., MAMONOVA, M., PRIWITZER, T., LENGYELOVA, A., HLADKA, D. & LUX, A. 2009. Changes in leaf organization, photosynthetic performance and wood formation during *ex vitro* acclimatization of black mulberry (*Morus nigra* L.). *Plant Biol (Stuttg)*, 11, 686-693.
- MORADSHAHI, A., VINES, H. M. & BLACK, C. C. 1977. Carbon Dioxide Exchange and Acidity Levels in Detached Pineapple, *Ananas comosus* (L.), Merr., Leaves during the Day at Various Temperatures, Oxygen and Carbon Dioxide Concentrations. *Plant Physiol*, 59, 274-8.
- NELSON, E. A. & SAGE, R. F. 2008. Functional constraints of CAM leaf anatomy: tight cell packing is associated with increased CAM function across a gradient of CAM expression. *Journal of Experimental Botany*, 59, 1841-1850.
- NIEVOLA, C. C., KRAUS, J. E., FRESCHI, L., SOUZA, B. M. & MERCIER, H. 2005. Temperature determines the occurrence of CAM or C3 photosynthesis in pineapple plantlets grown in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 41, 832-837.
- NIMMO, H. G. 2000. The regulation of Phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants. *Trends in Plant Science*, 5, 75-80.
- NIMMO, H. G. 2003. How to tell the time: the regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in Crassulacean acid metabolism (CAM) plants. *Biochem Society*, 31, 728-30.
- NOBEL, P. S. 2009. *Physicochemical and Environmental Plant Physiology.*, San Diego, Academic Press.
- NOBEL, P. S. & EDWARD, B. B. 2002. Initial Net CO<sub>2</sub> uptake responses and root growth for a CAM community placed in a closed environment. *Ann Bot*, 90, 593-598.
- PINO, Y. 2014. *Nuevas contribuciones al proceso del cultivo ex vitro de vitroplantas de piña (Ananas comosus (L.) Merr.) MD-2 previo al traslado a campo.* Tesis de maestría, Centro de Bioplantitas.
- POPP, M., JANETT, H. P., LÜTTGE, U. & MEDINA, E. 2003. Metabolite gradients and carbohydrate translocation in rosette leaves of CAM and C3 bromeliads. *New Phytol*, 157, 649-656.

## **Bibliografía**

- PREECE, J. E. & SUTTER, E. U. 1991. Acclimatization in micropropagated plants to the greenhouse and field. *Microp Tech App*, 1, 71-93.
- PRIGGE, M. & GURIÉRREZ-SOTO, M. V. 2014. Pineapple photosynthesis and leaf sap pH as a surrogate of CAM performance in the field. A research advance. *Newsletter of Pineapple International Society for Horticultural Sciences*, 21, 18-23.
- RODRÍGUEZ-ESCRIBA, R. C., LÓPEZ, D., ARAGÓN, C., BECQUER, R., PINO, Y., GARZA, Y., PODESTÁ, F. E., GONZÁLEZ-OLMEDO, J. L. & RODRÍGUEZ, R. 2014. CAM metabolic changes of "MD-2" pineapple grown under high and low light. *Newsletter of Pineapple International Society for Horticultural Sciences*, 21, 27-34.
- RODRÍGUEZ-ESCRIBA, R. C., RODRÍGUEZ, R., LÓPEZ, D., LORENTE, G. Y., PINO, Y., ARAGÓN, C. E., GARZA-GARCÍA, Y., PODESTÁ, F. E. & GONZÁLEZ-OLMEDO, J. L. 2015. High Light Intensity Increases the CAM Expression in "MD-2" Micro-Propagated Pineapple Plants at the End of the Acclimatization Stage. *American Journal of Plant Sciences*, 6, 3109-3118.
- SIMONTACCHI, M. 2001. El estrés oxidativo en las plantas. *Cátedra de Físicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA* 45.
- ŚLESIAK, I., KARPINSKA, B., SURÓWKA, E., MISZALSKI, Z., KARPINSKI, S., SLESIAK, I., KARPINSKA, B., SURÓWKA, E., MISZALSKI, Z. & KARPINSKI, S. 2003. Redox changes in the chloroplast and Hydrogen peroxide are essential for regulation of C3 – CAM transition and photooxidative stress responses in the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Cell Physiol*, 44, 573-581.
- SONEJI, J. R., RAO, P. S. & MHATRE, M. 2002. Somaclonal variation in micropropagated dormant axillary buds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *J Hort Sci Biotech*, 77, 28-32.
- TAYBI, T., NIMMO, H. G. & BORLAND, A. M. 2004. Expression of Phosphoenolpyruvate carboxylase and Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes. Implications for genotypic capacity and phenotypic plasticity in the expression of Crassulacean Acid Metabolism. *Plant Physiol*, 135, 587-98.
- TERASHIMA, I. & HIKOSAKA, K. 1995. Comparative ecophysiology of leaf and canopy photosynthesis. *Plant, Cell & Environment*, 18, 1111-1128.
- THI, P. S. 2003. *Comparative study of the quality of micropropagated C3, C4 and CAM plants during the acclimatization stages*. Thesis in option to Doctor degree, Universiteit Gent.
- TRÍPODI, K. & PODESTÁ, F. 2003. Purification and characterization of an NAD-dependent Malate dehydrogenase from leaves of the Crassulacean Acid Metabolism plant *Aptenia cordifolia*. *Plant Physiol Biochem*, 41, 97-105.
- TRÍPODI, K., PODESTÁ, F., FIGUEROA, C., PIATTONI, C., IGLESIAS, A. & PEROTTI, V. 2002. CAM plants as crops and highly productive cultivars. *Handbook of Plant and Crop Physiology*. 2 ed.
- VILLALOBOS, A., GONZÁLEZ-OLMEDO, J., SANTOS, R. & RODRÍGUEZ, R. 2012a. Morphophysiological changes in pineapple plantlets [*Ananas comosus* (L.) Merr.] during acclimatization. *Ciência e Agrotecnologia*, 36, 624-630.

## **Bibliografía**

- VILLALOBOS, A., GONZÁLEZ, J., SANTOS, R. & RODRÍGUEZ, R. 2012b. Changes in pineapple plantlets [*Ananas comosus* (L.) Merr.] during acclimatization. *Ciência e Agrotecnologia*, 36, 624-630.
- WANG, K. & JIANG, Y. 2007. Antioxidant Responses of Creeping Bentgrass Roots to Waterlogging. *Crop Science*, 47, 232-236.
- WILD, B., WANEK, W., POSTL, W. & RICHTER, A. 2010. Contribution of carbon fixed by RubisCO and PEPC to phloem export in the Crassulacean Acid Metabolism plant *Kalanchoe daigremontiana*. *J Exp Bot*, 61, 1375-83.
- WINTER, K., GARCIA, M. & HOLTUM, J. M. 2008. On the nature of facultative and constitutive CAM: environmental and developmental control of CAM expression during early growth of *Clusia*, *Kalanchoe*, and *Opuntia*. *J Exp Bot*, 59, 1829-1840.
- ZHU, J. 1996. *Physiological responses of pineapple (Ananas comosus (L.) Merr.) to CO<sub>2</sub> enrichment, temperatures and water deficit*. Doctor of philosophy, University of Hawaii.
- ZHU, J. C., BARTHOLOMEW, D. P. & GOLDSTEIN, G. 1997. Effect of elevated Carbon dioxide on the growth and physiological responses of pineapple. A species with Crassulacean Acid Metabolism. *J American Soc Hort Sci*, 122, 233-237.