

**DOCTORADO EN CIENCIAS Y
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

**Antioxidantes y fotoprotección en dos especies con
metabolismo ácido de las crasuláceas en una selva baja de
Yucatán**

**Tesis para obtener el grado de Doctor en
Ciencias presenta:**

M. EN C. CLAUDIA GONZÁLEZ SALVATIERRA

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México

2009



Declaración de Propiedad

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento provienen de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán y que dicha información le pertenece en términos de la ley de propiedad industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.



Claudia González Salvatierra

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Recursos Naturales bajo la dirección del Dr. Jose Luis Andrade Torres y en la Unidad de Biotecnología bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Las fotografías del microscopio electrónico de barrido (MEB) se realizaron gracias a la ayuda de la técnica Lilia Can.

Los datos de la estación meteorológica fueron aportados por el Ing. Roberth Us.

El trabajo de campo se realizó en el Parque Nacional de Dzibilchaltún.

Parte del trabajo de cuantificación se realizó en el laboratorio de Fisiología Vegetal del Dr. Jorge Santamaría

Este trabajo de investigación fue financiado por lo proyectos del fondo sectorial SEP-CONACYT 48344/24588 y FOMIX-Yucatán No. 66262, y por la beca de doctorado otorgada por el Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT-172810) a Claudia González Salvatierra.



DEDICATORIA

A mi abuela y a mi madre

A mis heramos, a mi sobrina Natys y a toda mi familia

**POR TODO SU APOYO MORAL DURANTE ESTOS AÑOS LEJOS DE
CASA**

DEDICATORIA

A mi esposa y a mi madre

A los señores a mi familia y a todos los familiares

FOR TUDO SU AFECTO MORAL DURANTE ESTOS AÑOS LEJOS DE
CASA

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores el Dr. JL Andrade y Dr. LM Peña, por su asesoría, supervisión y apoyo.

Al técnico Gabriel Dzib por no dejarme sola en las salidas al campo y la Q.B. Fabiola Escalante por su apoyo en la parte experimental en el laboratorio de Química Orgánica.

Al Dr. Joel Flores, Dr. Roger Orellana y Dr. Erick de la Barrera, por sus comentarios y apoyo tanto personal como académico.

A la Dra. Rocío Borges y al Dr. Jorge Santamaría por sus comentarios y sugerencias a este proyecto.

A la fundación Andrade para el apoyo e impresión de esta tesis.

A todos mis amigos, que me han apoyado en todo el tiempo lejos de casa, especialmente a Horacio, Aris, Andra, Monse, Casandra, Ciccio, Isaac, Nacho, Alfredo, Tere, Val, Mirna, Dafne, a la Sra Alejandra García, Gris, Ana, Arely y Edilia. Muchas gracias por todo, por cuidarme cuando estaba enferma, por ser mi familia lejos de mi familia, por todos los momentos de mi estancia en Yucatán, sin su apoyo esto no se hubiera logrado.

A todos mis compañeros de la Unidad de Recursos Naturales y los chicos del laboratorio de Química orgánica.

ÍNDICE

	Página
Reconocimientos	I
Dedicatoria	III
Agradecimientos	V
Índice	VII
Índice de tablas	IX
Índice de figuras	X
Resumen	XIX
Abstract	XXI
Lista de abreviaturas	XXIII
 INTRODUCCIÓN	 1
Referencias	3
 CAPÍTULO I	
ANTECEDENTES	
La selva baja caducifolia	5
La familia Bromeliaceae	7
La fisiología del estrés por alta radiación	9
Justificación	13
Objetivos	
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
Sitio de estudio	16
Especies de estudio	16
<i>Tillandsia brachycaulos</i>	16
<i>Bromelia karatas</i>	17
Referencias	19
 CAPÍTULO II	
RESPUESTAS ECOFISIOLÓGICAS DE DOS ESPECIES CAM EN UNA SELVA BAJA DE YUCATÁN BAJO CONDICIONES NATURALES DE RADIACIÓN	
Introducción	25
Materiales y métodos	29
Trabajo de campo	29
Caracterización de las condiciones ambientales	29
Caracterización del microambiente lumínico	29
Mediciones de fluorescencia	30
Curvas de respuesta a la luz	30
Potencial hídrico	31
Cuantificación de pigmentos fotosintéticos	31
Variación del contenido de ácidos orgánicos	32

Análisis estadísticos	33
Resultados	
Caracterización ambiental del sitio, durante el período de trabajo	34
Caracterización del ambiente lumínico y el microambiente	36
a) Temporada de lluvia	36
b) Temporada de sequía	39
Fluorescencia	45
a) Curvas de respuesta a la luz	45
b) Fluorescencia máxima del PSII (F_v/F_m)	48
c) Parámetros relacionados con fluorescencia	49
Potencial hídrico	53
Pigmentos fotosintéticos	56
Variación del contenido de ácidos orgánicos	59
Discusión	62
Conclusiones	70
Referencias	71

CAPÍTULO III

CONTENIDO ANTIOXIDANTE EN DOS ESPECIES DE BROMELIACEAS CAM COMO RESPUESTA A LOS CAMBIOS ESTACIONALES DE LUZ EN UNA SELVA BAJA CADUCIFOLIA

Introducción	77
Referencias	80
Antioxidant content in two CAM bromeliad species as a response to seasonal light changes in a tropical dry deciduous forest	
Summary	83
Introduction	84
Materials and methods	
Plant species and study site	86
Light microsite characterization	86
Antioxidant activity	86
Leaf extraction	86
DPPH assay	
a) Qualitative assay	87
b) Quantitative assay	87
Assay for total anthocyanins	
Tissue-specific localization of anthocyanins	88
Extraction and determination	88
Statistical analysis	88
Results	
Microsites light characterization	89
Antioxidant activity	

a)	Qualitative assay	91
b)	Quantitative assay	91
	Assay for total anthocyanins	93
	Discussion	96
	Acknowledgments	98
	References	100

CAPÍTULO IV

CARACTERES MORFOANATÓMICOS Y PRODUCCIÓN DE ANTOCIANINAS COMO RESPUESTA DE FOTOPROTECCIÓN EN DOS ESPECIES DE BROMELIÁCEAS

Introducción	105
Materiales y métodos	
Material vegetal	108
Caracteres morfoanatómicos: microscopio óptico	108
a) Técnica para observar células del mesófilo	108
b) Técnica para observar estomas	109
Caracteres morfoanatómicos: microscopio electrónico de barrido (MEB)	110
Localización de antocianinas en la lámina foliar	110
Resultados	
1. Caracteres morfoanatómicos:	
microscopio óptico	111
MEB	114
2. Localización de antocianinas en la lamina foliar	118
Discusión y Conclusiones	124
Referencias	128

DISCUSIÓN GENERAL	133
--------------------------	-----

Referencias	135
-------------	-----

PERSPECTIVAS	139
---------------------	-----

CONCLUSIONES	141
---------------------	-----

Anexo I	i-v
----------------	-----

ÍNDICE DE TABLAS

Página

CAPITULO I

Tabla 1.1	Características básicas en la familia Bromeliaceae	8
	(Tomado de Benzing, 2000).	

CAPÍTULO II

Tabla 2.1	Variación del microambiente lumínico estacional de plantas expuestas y bajo sombra de <i>T. brachycaulos</i> y <i>B. karatas</i> . FFF, flujo de fotones para la fotosíntesis ($\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$).	45
------------------	--	----

CAPÍTULO III

Table 3.1	Qualitative antioxidant activity of crude extracts and purified fractions from <i>T. brachycaulos</i> and <i>B. karatas</i> .	91
------------------	---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.1	Diagrama ombrotérmico representativo de las condiciones climáticas de una selva baja caducifolia de Yucatán (Motul, Yuc; modificado de Orellana et al., 1999).	5
Figura 1.2.	Especies de estudio: <i>Tillandsia brachycaulos</i> (A) y <i>Bromelia karatas</i> (B)	18

CAPÍTULO II

Figura 2.1	Aclimatación de las plantas a la oscuridad al medio día, durante la temporada de lluvia. <i>Bromelia karatas</i> (A) y <i>Tillandsia brachycaulos</i> (B).	31
Figura 2.2	Diagrama ombrotérmico para el sitio de estudio de junio de 2006 a diciembre de 2008. Los rectángulos blancos indican la temporada de lluvia y los rectángulos negros indican la temporada de sequía. La línea punteada en los 100 mm de precipitación, indica un superávit.	34
Figura 2.3	Diagrama de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) y déficit de presión de vapor (DPV) para el sitio de estudio de junio de 2006 a diciembre de 2008. Los rectángulos blancos indican la temporada de lluvia y los rectángulos negros indican la temporada de sequía.	35

Figura 2.4	Tamaño de los individuos de <i>Tillandsia brachycaulos</i> (A, unidades en cm) y <i>Bromelia karatas</i> (B, unidades en metros), expuestos y bajo sombra. Los valores son medias $\pm$ EE.	36
Figura 2.5	Caracterización del microambiente lumínico para <i>Tillandsia brachycaulos</i> durante la temporada de lluvia. A, Flujo de fotones para la fotosíntesis (FFF) total y FFF sobre los individuos bajo sombra y expuestos; B, Porcentaje del FFF sobre las plantas expuestas y bajo sombra; C, temperatura de los individuos bajo sombra y expuestos. Los valores son medias $\pm$ EE, n=6 replicas por hora de medición.	37
Figura 2.6	Caracterización de microambiente lumínico para <i>Bromelia karatas</i> durante la temporada de lluvia. A, Flujo de fotones para la fotosíntesis (FFF) total y FFF sobre los individuos bajo sombra y expuestos; B, Porcentaje de FFF en las plantas expuestas y bajo sombra; y C, temperatura de los individuos bajo sombra y expuestos. Los valores son medias $\pm$ EE, n=6 replicas por hora de medición.	38
Figura 2.7	Temperaturas del ambiente y del suelo en los micrositios expuestos y bajo sombra, registradas durante un ciclo diurno en la temporada de lluvia. Los valores son medias $\pm$ EE, n=6 replicas por hora de medición.	39
Figura 2.8	Cambios diurnos en el flujo de fotones para la fotosíntesis (FFF) incidentes temperatura ambiental y del suelo de sitios expuestos para un día representativo de la temporada de sequía (6 de mayo 2007). Los valores son medias $\pm$ EE, n=6 replicas por hora de medición.	40
Figura 2.9	Caracterización de las condiciones microambientales de <i>T. brachycaulos</i> durante la temporada de sequía, de los micrositios de individuos expuestos y bajo sombra. A, temperatura del suelo y del ambiente de individuos expuestos y bajo sombra; B, Porcentaje de radiación (FFF) en las plantas expuestas y bajo sombra; y C, temperatura de la planta. Los valores son medias $\pm$ EE, n= 3 individuos.	42
Figura 2.10	Caracterización de las condiciones microambientales de <i>B. karatas</i> durante la temporada de sequía. A,	44

temperatura del suelo y del ambiente de individuos expuestos y bajo; **B**, Porcentaje de radiación en las plantas expuestas y bajo sombra; y **C**, temperatura en las hojas de individuos bajo sombra y expuestos. Los valores son medias $\pm$ EE, $n=3$ individuos.

- Figura 2.11** Curvas de respuesta a la luz de *T. brachycaulos* para individuos expuestos y bajo sombra. Las figuras muestran los valores de respuesta a la luz (FFF) y la ETR registradas al medio día para las diferentes temporadas. **A**, Mitad de la temporada de lluvias; **B**, inicio de la temporada de sequía; **C**, mitad de la temporada de sequía; **D**, final de la temporada de sequía y **E**, final de la temporada de lluvia. Los valores son medias $\pm$ EE, $n=3$ plantas. 46
- Figura 2.12** Curvas de respuesta a la luz de *B. karatas* para individuos expuestos y bajo sombra. Las figuras muestran los valores de respuesta a la luz (FFF) y la ETR registrados al medio día para las diferentes temporadas. **A**, Mitad de la temporada de lluvias; **B**, inicio de la temporada de sequía; **C**, mitad de la temporada de sequía; **D**, final de la temporada de sequía y **E**, final de la temporada de lluvia. Los valores son medias $\pm$ EE, $n=3$ plantas. 47
- Figura 2.13** Fluorescencia máxima del fotosistema II (F_v/F_m) de *T. brachycaulos* para las plantas expuestas y bajo sombra de mediciones durante el amanecer. Los valores son medias $\pm$ EE, $n=3$. 48
- Figura 2.14** Fluorescencia máxima del fotosistema II (F_v/F_m) de *B. karatas* para las plantas expuestas y bajo sombra de mediciones durante el amanecer. Los valores son medias $\pm$ EE, $n=3$. 49
- Figura 2.15** Parámetros de fluorescencia de la clorofila de *T. brachycaulos*. En la figura se muestran los patrones estacionales de: **A**) tasa de transporte de electrones (ETR), **B**) Flujo de fotones para la fotosíntesis (FFF), **C**) disipación no fotoquímica (NPQ), **D**) temperatura de la hoja, **E**) rendimiento cuántico del fotosistema II (Φ PSII). Los valores son medias $\pm$ EE, $n=3$. Los símbolos representan plantas expuestas (Δ) y bajo sombra ($\bullet$). 51
- Figura 2.16** Parámetros de fluorescencia de la clorofila de *B.* 52

karatas. En la figura se muestran los patrones estacionales de a) tasa de transporte de electrones (ETR), b) flujo de fotones para la fotosíntesis (FFF), c) eficiencia no fotoquímica (NPQ), d) temperatura de la hoja, e) rendimiento cuántico del fotosistema II (Φ PSII). Los valores son medias $\pm$ EE, $n=3$. Los símbolos representan plantas expuestas (Δ) y bajo sombra ($\bullet$).

- | | | |
|--------------------|---|----|
| Figura 2.17 | Potencial hídrico al amanecer y al medio día, para las plantas expuestas (A) y bajo sombra (B) de <i>T. brachycaulos</i> . Los valores son medias $\pm$ EE, $n=3-6$. La línea negra representa la temporada de sequía. | 54 |
| Figura 2.18 | Potencial hídrico en la mañana y al medio día, para las plantas bajo sombra (A) y expuestas (B) de <i>B. karatas</i> . Los valores son medias $\pm$ EE, $n=3-6$. La línea negra representa la temporada de sequía. | 55 |
| Figura 2.19 | Cuantificación estacional de los pigmentos fotosintéticos de plantas expuestas y bajo sombra de <i>T. brachycaulos</i> . $n= 3-6$ individuos $\pm$ EE. La línea negra representa la temporada de sequía. | 57 |
| Figura 2.20 | Cuantificación estacional de los pigmentos fotosintéticos de plantas expuestas y bajo sombra de <i>B. karatas</i> . $n= 3-6$ individuos $\pm$ EE. La línea negra representa la temporada de sequía. | 58 |
| Figura 2.21 | Acidez titulable estacional de <i>T. brachycaulos</i> de plantas expuestas y bajo sombra. Los valores son medias $\pm$ EE, $n=3-6$ individuos por especie por condición de luz. La línea negra representa la temporada de sequía. | 60 |
| Figura 2.22 | Acidez titulable estacional de <i>B. karatas</i> de plantas expuestas y bajo sombra. Los valores son medias $\pm$ EE, $n=3-6$ individuos por especie por condición de luz. La línea negra representa la temporada de sequía. | 61 |

CAPÍTULO III

- | | | |
|-------------------|--|----|
| Figure 3.1 | Percentage of total daily photosynthetic photon flux (PPF) received relative to the top canopy in Dzibilchaltún, Mexico, for a clear day during dry (April | 90 |
|-------------------|--|----|

18, 2007) and rainy (September 15, 2007) seasons. Individual plants of *T. brachycaulos* (A-B and E-F) and *B. karatas* (C-D and G-H) in two light conditions: shaded (A-D) and exposed (E-H) plants. Black line: above canopy PPF; gray line: below canopy light intensity. Data obtained using the report file of the fisheye photograph analysis with the program WinPhot 5.0.

- | | | |
|-------------------|--|----|
| Figure 3.2 | Total concentration of metabolites with antioxidant activity for <i>T. brachycaulos</i> (A) and <i>B. karatas</i> (B) under two light conditions: exposed and shaded plants, during dry and rainy seasons in Dzibilchaltún, Mexico. Data are means $\pm$ SE (n=27); P< 0.05. | 92 |
| Figure 3.3 | Optical microscopy photograph (40X) of transverse leaf sections of <i>T. brachycaulos</i> (A-B) and <i>B. karatas</i> (C-D) in two light conditions: exposed (A and C) and shaded plants (B and D) during dry season. ad: adaxial epidermis; ab: abaxial epidermis. Arrows indicate zones with high amount of anthocyanins. | 93 |
| Figure 3.4 | Total anthocyanins concentration for leaves of <i>T. brachycaulos</i> (A) and <i>B. karatas</i> (B) in two light conditions: exposed and shaded plants, during the rainy and dry seasons. | 94 |
| Figure 3.5 | Correlation between incident photosynthetic photon flux (PPF) and total anthocyanins for leaves of <i>T. brachycaulos</i> (A) and <i>B. karatas</i> (B) during the dry and rainy seasons. Open symbols: exposed plants; closed symbols: shaded plants; squares: dry season; circles: rainy season. Regression lines and P values are indicated in the figures (significant at P<0.05). | 95 |

CAPÍTULO V

- | | | |
|-------------------|---|-----|
| Figura 4.1 | Estructura general representativa de la mayoría de las antocianinas encontradas en la naturaleza (izquierda). R ¹ y R ² =OH; R ⁴ =H. Una de las seis antocianinas más comunes: pyranoantocianina (derecha). Tomado de Davies (2004). | 106 |
| Figura 4.2 | Microfotografías de las secciones transversales de hojas montadas en parafina de <i>B. karatas</i> . A, sección | 111 |

transversal de hoja expuesta (10x). **B**, sección transversal de hoja de sombra (10x). **C**: haz vascular (40x); **PH**: parénquima hídrico; **PC**: parénquima clorofílico; **hv**: haz vascular; **ca**: canales de aire; **Ab**: superficie abaxial; **Ad**: superficie adaxial; **ep**: epidermis; **cs**: cavidad subestomática.

- Figura 4.3** Microfotografías de las secciones transversales de 112
hojas montadas en parafina de *T. brachycaulos*. **A**, sección transversal de hoja expuesta (10x). **B**, sección transversal de hoja de sombra (10x). **PH**: parénquima hídrico; **PC**: parénquima clorofílico; **hv**: haz vascular; **ca**: canales de aire; **Ab**: superficie abaxial; **Ad**: superficie adaxial; **ep**: epidermis; **cs**: cavidad subestomática.
- Figura 4.4** Microfotografías de *B. karatas*. **A**, corte transversal 113
hecho a mano de una hoja. **B**, epidermis de una hoja en fresco, en donde se observan las regiones costales e intercostales (**ha**) donde se encuentran los tricomas (**t**, 5x) y los estomas hundidos (**es**); **C**, región intercostal con estomas y tricomas (40x); **D**, corte transversal de un tricoma (**t**, 40x); **ep**: epidermis; **PC**: parénquima clorofílico; **Ab**: superficie abaxial; **Ad**: superficie adaxial; **ep**: epidermis.
- Figura 4.5** Microfotografías de la epidermis de *T. brachycaulos*. 114
A, epidermis con células alargadas y estomas (**es**, 10x); **B**, epidermis con estomas y fracciones de tricomas (5x); **C**, tricoma peltado (**t**, 40x); **D**, estoma (**es**, 40x); **ep**: epidermis; **Ad**: superficie adaxial.
- Figura 4.6** Superficie abaxial de hojas de *B. karatas*; 115
microfotografías del microscopio electrónico de barrido (MEB). **A**, vista general de los tricomas agrupados en hileras longitudinales, sobre las regiones intercostales; **B**, tricomas distribuidos en la regiones intercostales; **C**, tricoma. La línea blanca al centro representa la escala.
- Figura 4.7** Superficie abaxial de hojas de *B. karatas*; 116
microfotografías del microscopio electrónico de barrido (MEB). **A**, Tricomas protegiendo los estomas; **B**, detalle de los estomas hundidos dentro de las regiones intercostales; **C**, estomas en depresión, por debajo de la epidermis.

Figura 4.8	Superficie adaxial de hojas de <i>T. brachycaulos</i> ; microfotografías del microscopio electrónico de barrido (MEB). A , vista general de los tricomas (t) cubriendo la hoja; B y C , detalle de los tricomas, donde puede distinguirse que el disco central (dc) se compone de cuatro células, dos filas de células fuera del anillo central (r), y su ala externa (w).	117
Figura 4.9	Pigmentación roja de las hojas de <i>T. brachycaulos</i> en condiciones de campo. A , individuo en temporada reproductiva; B , individuo expuesto sin floración.	118
Figura 4.10	Pigmentación de las hojas de <i>B. karatas</i> en condiciones de campo. A , individuo expuesto; B , superficie adaxial de las hojas de una planta expuesta; C , individuo al inicio del período de floración.	119
Figura 4.11	Cortes transversales de hojas de <i>T. brachycaulos</i> colectadas durante la temporada de sequía, en los que se puede distinguir la pigmentación roja que corresponde a la presencia de antocianinas. A : cortes de plantas expuestas; B : cortes de plantas bajo sombra.	120
Figura 4.12	Microfotografías de las secciones transversales de hojas de plantas expuestas y de sombra de <i>B. karatas</i> . A , sección transversal de hoja expuesta (10x) y B , sección transversal de hoja de sombra (10x), durante la temporada de lluvia. C , sección transversal de hoja expuesta (10x) y D , sección transversal de hoja de sombra (10x), durante la temporada de sequía. PH : parénquima hídrico; PC : parénquima clorofílico; hv : haz vascular; ca : canales de aire; Ab : superficie abaxial; Ad : superficie adaxial; ep : epidermis; cs : cavidad subestomática. Las flechas indican la localización de las antocianinas.	121
Figura 4.13	Microfotografías de las secciones transversales de hojas de plantas expuestas y de sombra de <i>T. brachycaulos</i> en condiciones de campo. A , sección transversal de hoja expuesta (10x), B , sección transversal de hoja de sombra (10x), durante la temporada de lluvia; C , sección transversal de hoja expuesta (10x) y D , sección transversal de hoja de sombra (10x), durante la temporada de sequía. PH : parénquima hídrico; PC : parénquima clorofílico; hv : haz vascular; ca : canales de aire; Ab : superficie	122

abaxial; **Ad**: superficie adaxial; **ep**: epidermis; **cs**: cavidad subestomática. Las flechas indican la localización de las antocianinas.

Figura 4.14 Microfotografías de las secciones transversales de 123
hojas de *T. brachycaulos* en condiciones de campo, durante la temporada de sequía, en donde el periciclo de los haces vasculares contiene pigmentos rojos. **A**, Haz vascular (**hv**) de una planta bajo sombra (40x, aumentado con el lente de la cámara) y **B**, Haces vasculares de una planta expuesta (40x). **PH**: parénquima hídrico; **PC**: parénquima clorofílico; **Ab**: superficie abaxial; **Ad**: superficie adaxial; **ep**: epidermis.

RESUMEN

La luz, aún cuando es requerida para la fotosíntesis, puede afectar otros procesos de las plantas. Por ejemplo, la exposición parcial a un exceso de luz en plantas adaptadas a la sombra, produce un exceso de energía de excitación que, resulta en un estrés fotooxidativo que es controlado por eventos de óxido-reducción en las cercanías del fotosistema II (PS II). Por otra parte, las plantas adaptadas a alta luminosidad presentan una alta capacidad fotosintética que les proporciona un nivel parcial de fotoprotección, en tanto que las plantas con el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) pueden proporcionar una mayor fotoprotección manteniendo el transporte de electrones, cuando las plantas C_3 no pueden hacerlo. La tolerancia de las plantas CAM a condiciones de estrés ambiental se ha relacionado con diferentes mecanismos de respuesta (e.g. adaptaciones estructurales para la captación y almacenamiento de agua y soportar períodos de sequía).

El objetivo de este trabajo fue determinar los mecanismos de respuesta de fotoprotección, en ambientes contrastantes de radiación, de dos especies de bromeliáceas CAM con diferente forma de vida (la epífita *Tillandsia brachycaulos* y la terrestre *Bromelia karatas*) en la selva baja caducifolia del Parque Nacional Dzibilchaltún, Yucatán. Los parámetros del funcionamiento fotosintético, (la tasa de transferencia de electrones, la eficiencia cuántica del PSII y el punto de saturación a la luz), además de la acidez titulable, el potencial hídrico y la cuantificación de pigmentos fotosintéticos (Capítulo II), así como la cuantificación de los metabolitos con actividad antioxidante (Capítulo III), y la localización de las antocianinas en las hojas y la descripción de los caracteres morfoanatómicos (Capítulo IV), se estudiaron en función de la variabilidad estacional del ambiente lumínico.

Ambas especies presentaron un comportamiento contrastante en cuanto a sus límites de tolerancia al ambiente lumínico durante las temporadas de lluvia y sequía. Ambas presentaron adaptaciones morfoanatómicas para disminuir la pérdida de agua por transpiración, haciendo más eficiente la fotosíntesis. Durante la temporada de sequía se presentó la mayor incidencia de flujo de fotones para la fotosíntesis (FFF), por lo que las plantas expuestas de *T. brachycaulos* presentaron fotoinactivación, y disminución de la eficiencia cuántica del PSII, siendo más susceptibles de daño fotooxidativo. En este sentido, *T. brachycaulos* produce metabolitos con actividad antioxidante, que protegen al menos parcialmente al aparato fotosintético de daño oxidativo, y presenta eficientes mecanismos fisiológicos para aumentar su fotoprotección. La acumulación de antocianinas en la epidermis de las hojas expuestas de *T. brachycaulos*,

principalmente durante la temporada de sequía, estuvo relacionada con un aumento en la exposición de las plantas a altos niveles de FFF y a la disminución de la disponibilidad de agua, indicando que la función de estos pigmentos es la protección de los cloroplastos durante períodos de alto FFF o estrés por sequía.

Por otra parte, *B. karatas* presentó importantes caracteres morfoanatómicos de adaptación a alta radiación, incluyendo un mecanismo altamente eficiente de disipación de la luz (e.g. aumento en la concentración de carotenoides que permiten la disipación de la energía en forma de calor), por lo que no presentó fotoinhibición. Al mismo tiempo, *B. karatas* presentó pérdida de los pigmentos fotosintéticos, principalmente clorofilas, como una estrategia para disminuir la captación de energía y evitar la fotooxidación. Por otra parte, y a pesar de que las plantas expuestas de *B. karatas* presentan una coloración roja en la epidermis, esta coloración no estuvo relacionada con la producción de antocianinas, indicando que la pigmentación observada pudo deberse a la producción de otros metabolitos de fotoprotección (e.g. flavonoides o carotenoides).

Los resultados indican que las estrategias anatómicas y fisiológicas especializadas de ambas bromeliáceas CAM están relacionadas con su tolerancia a la radiación, su hábito de crecimiento y su capacidad para enfrentar limitaciones hídricas y de nutrimentos durante la temporada de sequía en esta selva baja caducifolia.

ABSTRACT

Although light is required for photosynthesis, it can also affect other processes in the plant; partial exposure to an excess of light in plants adapted to the shade, leads to an excess of excitation energy, resulting in photo-oxidative stress that is controlled by oxidation-reduction events in the surroundings of photosystem II (PS II). On the other hand, plants adapted to high light show a high photosynthetic capacity which provides them with a partial level of photoprotection, whereas plants with the crassulacean acid metabolism (CAM) can provide greater photoprotection maintaining the electron transport when C_3 plants cannot do it. The tolerance of CAM plants to environmental stress conditions has been related to different response mechanisms (e.g. structural adaptations for water capture and storage or withstand drought periods).

The aim of this study was to determine the photoprotective mechanisms, in contrasting light microenvironments, of two species of CAM bromeliads with different life forms (the epiphyte *Tillandsia brachycaulos* and the terrestrial *Bromelia karatas*) in the tropical dry deciduous forest of the Dzibilchaltun National Park, Yucatan. Photosynthetic performance parameters (electron transport rate, quantum efficiency of PSII and light saturation point), together with titratable acidity, water potential and the quantification of photosynthetic pigments (Chapter II), as well as quantification of the metabolites with antioxidant activity (Chapter III), tissue localization of anthocyanins and description of the morphoanatomic characters (Chapter IV) were studied taking into account the seasonal variability of the light environment.

Both species showed a contrasting behavior in their limits of tolerance to the light microenvironment during the rainy and dry seasons. Both species showed morphoanatomical adaptations to diminish water loss through transpiration, making photosynthesis more efficient. The highest incidence of photosynthetic photon flux (PPF) occurred during the dry season, therefore exposed plants of *T. brachycaulos* showed photoinactivation, and a decrease of the quantum efficiency of PSII, being more susceptible to photo-oxidative damage. From this perspective, *T. brachycaulos* produces metabolites with antioxidant activity, to partially protect the photosynthetic apparatus from oxidative damage and to show efficient physiological mechanisms to increase photoprotection. The accumulation of anthocyanins in the epidermis of the exposed leaves of *T. brachycaulos*, mainly during the dry season, was related to an increase in the exposure of plants to high levels of PPF and a decrease of water availability, indicating that the function of these pigments is to protect chloroplasts during periods of high PPF or drought stress.

On the other hand, *B. karatas* displayed important morphoanatomical characters of adaptation to high radiation, including a highly efficient mechanism of light dissipation (e.g. increasing the carotenoid concentration to allow heat), and did not show photoinhibition. At the same time, *B. karatas* showed a loss of photosynthetic pigments, mainly chlorophylls, as a strategy for capturing less energy and avoid photooxidation. Even though exposed plants of *B. karatas* showed a red coloration in the epidermis, this pigmentation was not related to anthocyanins production, indicating that the color might be due to the production of other metabolites (e.g. flavonoids or carotenoids).

The results indicate that the specialized anatomical and physiological strategies of both CAM bromeliads are related to their radiation tolerance, habit growth and capacity to confront water and nutrient limitations during the dry season in this tropical dry deciduous forest.

LISTA DE ABREVIATURAS

ad	Superficie adaxial
ab	Superficie abaxial
Aw	Caliente subhúmedo, con una larga temporada de sequía
ca	Canales de aire
C₃	Ruta fotosintética en donde el primer compuesto que se detecta durante el proceso de la fotosíntesis es un compuesto de tres carbonos, el ácido 3 - fosfoglicérico (PGA)
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas
cs	Cavidad subestomática
dc	Disco central
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl reactive
DPV	Déficit de presión de vapor
ΔH^+	Variación del contenido de ácidos orgánicos
EE	Error estándar
ep	Epidermis
es	Estoma
ETR	Tasa de transporte de electrones
FFF	Flujo de fotones para la fotosíntesis
$\Phi PSII$	Rendimiento cuántico del fotosistema II
F_v/F_m	Fluorescencia máxima del fotosistema II (fluorescencia variable/fluorescencia máxima)

HR	Humedad relativa
hv	Haz vascular
MEB	Microscopio electrónico de barrido
NPQ	Disipación no fotoquímica
PC	Parénquima clorofílico
PH	Parénquima hídrico
PPF	photosynthetic photon flux
PSII	Fotosistema II; photosystem II
Q_A	Plastoquinona Q _A
r	Anillo central
ROS	Especies reactivas de oxígeno; reactive oxygen species
t	Tricoma
TLC	Thin layer chromatography
Ψ	Potencial hídrico
w	Ala externa

INTRODUCCIÓN

La acción individual o conjunta de diferentes factores de estrés ambiental, unidos a los efectos de la radiación, pueden afectar la capacidad de resistencia y adaptación de las plantas a su medio. Las especies vegetales no responden de forma homogénea, aún en el mismo espacio y sometidas al mismo estrés, esta heterogeneidad del comportamiento ecológico de las plantas sometidas a estrés, puede tener un significado importante en la descripción funcional del ecosistema donde se desarrollan.

Desde el punto de vista fisiológico, algunos de los cambios característicos observados en las plantas como respuesta al exceso de luz (e.g. disminución de la fotosíntesis y cambios en la emisión de fluorescencia de la clorofila), están asociados con procesos de fotoprotección involucrados en el control de la disipación de energía de los complejos antena (Horton et al., 1996; Maxwell & Johnson, 2000). Una gran proporción de la inhibición de la fotosíntesis y de la eficiencia del PSII, observados en hojas de diferentes especies expuestas a alta radiación, es ocasionada por la disipación de la energía térmica, más que por daño del aparato fotosintético (Barker & Adams, 1997).

La fotoprotección involucra mecanismos que previenen que el exceso de energía lumínica absorbida durante la fotosíntesis dañe a las células fotosintéticas. Esta respuesta está relacionada con el gradiente de radiación y el nivel de tolerancia a la sombra de las plantas (Logan et al., 1996; Griffiths & Maxwell, 1999). En la mayoría de los casos, las respuestas de fotoprotección son rápidas, e.g. algunas especies de helechos epifitos (Tausz et al., 2001) y algunas bromeliáceas (*Aechmea magdalenae* y *Pitcairnia atropurpurea*; Matsubara et al., 2009) aumentan su concentración de carotenoides y α -tocoferol, pocas horas después de ser expuestos a alta radiación.

La radiación, aún cuando es requerida para la fotosíntesis, puede afectar otros procesos. Un exceso de radiación puede generar especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que dañan al sistema fotosintético al destruir las proteínas de los centros de reacción en los tilacoides y atacar los lípidos de la membrana en los cloroplastos (Chalker-Scott, 1999; Gould et al., 2002). La producción de ROS, como respuesta de la planta a ambientes adversos, es común e impide el transporte de electrones y la fijación de CO₂. Por otra parte, los mecanismos de adaptación a estrés por radiación requieren de la formación de productos de fotoprotección en los cloroplastos, e.g. carotenoides del ciclo de las zeaxantinas, y flavonoides que absorben y disipan la energía. La adaptación

a diversas intensidades de radiación es específica para cada especie y depende de su capacidad para producir otros metabolitos protectores (Winkel-Shirley, 2002).

La tolerancia de las plantas a condiciones ambientales de estrés ha sido relacionada con diferentes mecanismos de respuesta. En el presente trabajo se planteó el estudio de los careres fisiológicos (fluorescencia de la clorofila, potencial hídrico, concentración de pigmentos fotosintéticos y de ácidos orgánicos), morfoanatómicos (densidad estomática y de tricomas, medición de las capas de células del mesófilo y sus caracteres, localización de antocianinas en el mesófilo) y químicos (contenido de antioxidantes y antocianinas) de dos especies de bromeliáceas, una con forma de vida epífita y la otra terrestre, en una selva baja caducifolia de Yucatán, con el fin de definir los mecanismos de respuesta de estas especies ante diferentes condiciones de disponibilidad lumínica estacional.

REFERENCIAS

- Barker, D.H. and W.W. Adams III (1997).** *The xanthophyll cycle and energy dissipation in differently oriented faces of the cactus Opuntia macrorhiza.* Oecology, 109, 353–361.
- Chalker-Scott, L (1999).** *Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses.* Photochemistry and Photobiology, 70, 1–9.
- Gould, K.S., J. McKelvie and K.R. Markham (2002).** *Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury.* Plant, Cell and Environment, 25, 1261–1269.
- Griffiths, H. and K. Maxwell (1999).** *In memory of C.S. Pittendrigh: Does exposure in forest canopy relate to photoprotective strategies in epiphytic bromeliads?* Functional Ecology, 13, 15–23.
- Horton, P., A. Ruban and R. Walters (1996).** *Regulation of light harvesting in green plants.* Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 47, 655–684.
- Logan, B., D. Barker, B. Demming-Adams and W.W. Adams III (1996).** *Acclimation of leaf carotenoid composition and ascorbate levels to gradients in the light environment within an Australian rainforest.* Plant Cell and Environment, 19, 1083–1090.
- Maxwell, K. and G. Johnson (2000).** *Chlorophyll fluorescence –a practical guide.* Journal of Experimental Botany, 51, 659–668.
- Tausz, M., P. Hietz and O. Briones (2001).** *The significance of carotenoids and tocopherol in photoprotection of seven epiphytic fern species of a Mexican cloud forest.* Australian Journal of Plant Physiology, 28, 775–783.
- Winkel-Shirley, B (2002).** *Biosynthesis of flavonoids and effects of stress.* Plant Biology, 5, 218–223.

Capítulo I Antecedentes

LA SELVA BAJA CADUCIFOLIA

La comunidad de la selva baja caducifolia o bosque tropical seco estacional (Bullock et al., 1995), refleja los cambios estacionales del clima en su comportamiento a lo largo del año, ya que se observan dos condiciones contrastantes que se relacionan con las diferencias en la disponibilidad de agua: la temporada de sequía, en donde la mayor parte de los árboles pierden sus hojas y la temporada de lluvia, cuando la mayor parte de la vegetación está cubierta de hojas. La temporada de sequía varía de cinco a ocho meses y se presenta entre diciembre y mayo. La precipitación media anual, que incluye a la temporada de lluvia, varía entre 300 y 1800 mm (Bullock et al., 1995; Gentry, 1995; Rzedowski, 2006). De acuerdo a la clasificación de Koeppen (1948), el tipo de clima más común de la selva baja caducifolia es el "Aw" (caliente subhúmedo, con una larga temporada de sequía; Rzedowski, 2006). En la Figura 1.1 se presenta un diagrama ombrotérmico de una selva baja caducifolia en el estado de Yucatán, donde se puede distinguir una marcada temporada de sequía, en los meses de diciembre a abril, y una temporada de lluvia de junio a octubre.

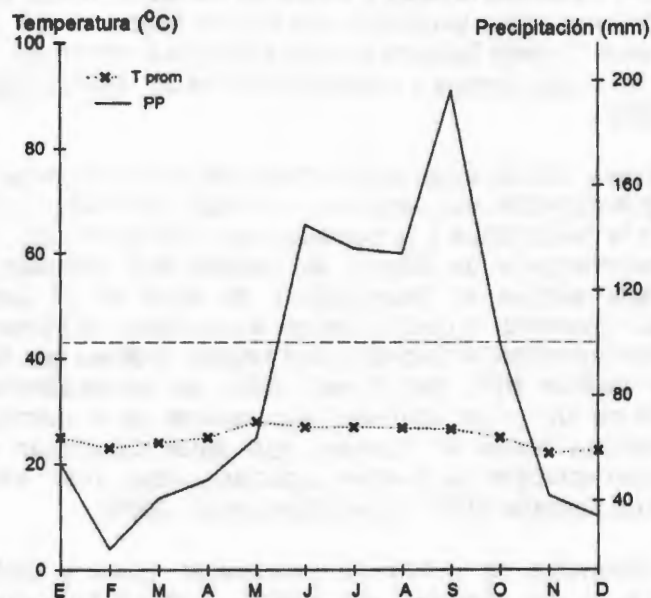


Figura 1.1. Diagrama ombrotérmico representativo de las condiciones climáticas de una selva baja caducifolia de Yucatán (Motul, Yuc; modificado de Orellana et al., 1999).

Casi todos los árboles (c.a. del 75%) de la selva baja caducifolia pierden sus hojas durante la temporada de sequía; la sequía puede ser prolongada (c.a. seis meses o un par de meses), como es el caso de algunas regiones de la Península de Yucatán. Sin embargo, muchas de estas especies pierden y producen hojas continuamente (Bullock et al., 1995; Challenger, 1998). Por otra parte, los microambientes que se forman en el dosel y en el suelo del bosque, están sujetos a fluctuaciones estacionales de radiación solar. Estas fluctuaciones en la disponibilidad de luz, varían desde las sombras proyectadas por el dosel completamente cubierto de follaje durante la temporada de lluvias, hasta una reducción del dosel durante la temporada de sequía, permitiendo la entrada de más del 50% de la radiación (Maass et al., 1995).

La biomasa foliar es máxima a nivel de dosel, donde la intercepción y transformación de la energía (radiación) es óptima para muchas especies. La línea divisoria entre las partes complementarias del dosel y el sotobosque, se ha concebido como un plano. Este límite separa la parte del ecosistema que está expuesta a la radiación total (zona eutrófica), de la parte sombreada inferior (oligotrófica) que recibe un promedio de apenas 2-3% de radiación total en algunas selvas altas. Generalmente, la luz llega en forma de haces de luz transmitida a través de las hojas, donde pequeños claros en el dosel permiten temporalmente el paso directo de la luz del sol; por lo tanto, esta luz está formada por rojos lejanos e infrarrojos y por luz reflejada por las hojas, troncos y ramas (Fetcher et al., 1994; Lüttge, 1997; Challenger, 1998).

En la parte alta del dosel el movimiento del aire es considerable y la temperatura y la humedad son variables; por debajo del dosel, el aire suele estar quieto y la temperatura y la humedad son casi constantes, mientras que las concentraciones de dióxido de carbono son elevadas. Se ha establecido que aunque la disponibilidad de agua es el factor más importante que determina la distribución de las especies, la tolerancia a la sombra y la susceptibilidad al foto-daño son también factores que deben ser considerados (Kessler, 2002; Zotz & Hietz, 2001). Así, se ha observado que los gradientes de luz y humedad son responsables de la distribución de diferentes especies dentro del bosque y que éstos determinan, en gran medida, el nicho ecológico de muchas especies (Lüttge, 1997; Valladares, 2004; Graham & Andrade, 2004; Reyes-García et al., 2008).

Las diferencias en hábitos de crecimiento, altura y preferencias microclimáticas de las especies que habitan la selva baja caducifolia, permiten que la vegetación de esta sea dividida en subunidades que

permiten su afinidad por un microhábitat, a los cuales se les podría llamar "estratos" (Challenger, 1998).

LA FAMILIA BROMELIACEAE

Aproximadamente dos mil quinientas especies conforman la familia Bromeliaceae, la cual presenta una distribución netamente neotropical, a excepción de una especie en el oeste de África, *Pitcairnia feliciana* (Chevalier) Harms & Mildbraed (Benzing, 2000). México cuenta con 343 especies repartidas en 18 géneros, incluyendo un género endémico (*Ursulea*); los géneros *Tillandsia* (190 especies), *Hechtia* (50 especies), algunos grupos de *Aechmea* y *Pitcairnia* (46 especies) son los mejor representados. Particularmente, en la península de Yucatán se encuentran de 31 a 33 especies de la familia Bromeliaceae de las cuales ca. 75% son epífitas y aproximadamente 25% son terrestres, subterrestres o litófitas, distribuidas en diferentes tipos de vegetación. El género *Tillandsia* es el más diverso en la península con 21 especies (Ramírez & Carnevali, 1999); por otro lado, se encuentran también el género *Aechmea* (3 especies), *Bromelia* (2 especies), *Catopsis* (3 especies), *Hechtia* (1 especie) y *Vriesea* (1 especie; Ramírez et al., 2005).

La familia Bromeliaceae está ordenada en tres subfamilias: Pitcarnioideae, de hábito terrestre, Bromelioideae de hábito epífito y terrestre, y Tillandsioidae, con hábito preferentemente epífito. El hábito de crecimiento, es una roseta con hojas ordenadas en espiral sobre un eje corto y erecto, que normalmente termina en una inflorescencia espigada o paniculada con brácteas transicionales frecuentemente de colores brillantes. Pittendrigh (1948) dividió las especies de bromeliáceas en tres ecotipos, basados en sus fuentes de humedad (suelo vs atmósfera) y de nutrimentos (tricomas foliares vs raíces). Por otra parte, Benzing (2000) definió a la familia dentro de cinco tipos ecológico/funcionales (e.g. ecofisiológicamente) para facilitar su comparación. En la Tabla 1.1 se resumen las características de los cinco tipos funcionales, en donde se definen los caracteres del sistema de raíces, la arquitectura del tallo, la disposición de los tricomas a través de las hojas y la capacidad para absorber agua, la vía o el síndrome fotosintético, la preferencia del hábitat y las subfamilias a las que pertenece cada tipo funcional.

Tabla 1.1. Características básicas en la familia Bromeliaceae (Tomado de Benzing, 2000).

	Sistema de raíces	Arquitectura del tallo	Tricomas foliares	Síndrome fotosintético	Hábitat	Distribución taxonómica
Tipo I	Raíces de absorción	Sin fitotelmata *	Sin capacidad de absorber	*C ₃ o CAM*	Terrestre	Pitcairnioideae Bromelioideae
Tipo II	Raíces de absorción y apogeotrópica*	Fitotelmata débilmente desarrollado	Capacidad de absorber, sobre la base de las hojas	CAM	Terrestre	Bromelioideae
Tipo III	Mecánico a condicionalmente absorbente	Fitotelmata bien desarrollado	Capacidad de absorber, sobre la base de las hojas	Mayoría son CAM	Terrestres/saxícolas*/epífitas	Bromelioideae
Tipo IV	Mecánico a condicionalmente absorbente	Fitotelmata bien desarrollado	Capacidad de absorber, sobre la base de las hojas	Mayoría son C ₃	Mayoría epífitas	Tillandsioideae y algunas especies de <i>Brocchinia</i>
Tipo V	Mecánica o ausente	Sin fitotelmata, neoténico o miniaturizado	Capacidad de absorber sobre el tallo	CAM	Mayoría saxícolas o epífitas	Tillandsioideae

*Fitotelmata: conjunto de espacios ocupados por el agua en las cavidades de los troncos, axilas de las ramas, en las plantas epífitas y el tejido de musgos o cualquier estructura del dosel.

*C₃: ruta fotosintética en donde el primer compuesto que se detecta durante el proceso de la fotosíntesis es un compuesto de tres carbonos, el ácido 3 - fosfoglicérico (PGA)

*CAM: metabolismo ácido de las crasuláceas

*Saxícolas: capacidad de crecer en o sobre las rocas

*Apogeotrópica: crecimiento hacia la superficie del suelo

Además de las especializaciones morfológicas, otro punto clave asociado al éxito de algunas bromeliáceas para sobrevivir a ambientes áridos es el síndrome fotosintético conocido como metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) (Crayn et al., 2004). Las plantas CAM se caracterizan

por tener tejido succulento con grandes vacuolas para el almacenamiento temporal de cantidades sustanciales de ácido málico durante la noche sin dañar estructuras y procesos bioquímicos del citoplasma (Kluge & Ting, 1978), además se requiere de un estricto control temporal sobre la síntesis de malato y la descarboxilación, coordinadas con el control de la apertura estomática (Winter & Smith, 1996; Nimmo, 2003; Crayn et al., 2004). Las plantas CAM asimilan CO_2 atmosférico en forma de ácidos de cuatro carbonos durante la noche, los cuales son acumulados en las vacuolas. Durante el día estos ácidos son descarboxilados vía el ciclo de Calvin, formando carbohidratos de reserva como almidón, glucanos o hexosas solubles (Ceusters et al., 2009). Los estomas permanecen abiertos durante la noche y cerrados durante la mayor parte del día, dando como resultado la pérdida mínima de agua y una fotorrespiración reducida, por lo que estas especies presentan una gran ventaja competitiva en ambientes donde el agua es un factor limitante (e.g. desiertos o ambientes epífitos; Cushman, 2001; 2005; Graham & Andrade, 2004). Las plantas CAM cuentan con mecanismos especializados para resistir las altas temperaturas, que generalmente ocurren durante el pico de mayor radiación en ausencia de enfriamiento por transpiración. Para sobrellevar estas condiciones, las plantas cuentan con re-emisión de radiación infraroja y pérdida de calor por convección y conducción que permiten el enfriamiento de las hojas (Rhodes & Nadolska-Orczyk, 2001).

La vía CAM es principalmente un mecanismo para el ahorro de agua. Sin embargo, algunas plantas, para maximizar la fotosíntesis, pueden cambiar de C_3 a CAM, o tener diferentes grados de CAM, dependiendo de la cantidad de luz, del estado hídrico y de la edad de la planta (Benzing, 1990; Maxwell et al., 1995). Las plantas CAM adaptadas a alta radiación presentan alta capacidad fotosintética y, en estos casos, la vía CAM proporciona fotoprotección adicional a través del mantenimiento del transporte de electrones (Griffiths et al., 1986; Maxwell et al., 1995).

LA FISIOLÓGÍA DEL ESTRÉS POR ALTA RADIACIÓN

Los factores de estrés abiótico que más influyen sobre el rendimiento de las plantas incluyen deficiencias o exceso de agua (sequía o inundación), condiciones extremas de radiación y de temperatura, deficiencia o exceso de nutrimentos (incluyendo macro y micronutrimentos), alta salinidad (e.g. exceso de Na^+ , Cl^- y/o SO_4^{2-}) y pH extremo en el suelo (Rhodes & Nadolska-Orczyk, 2001). En muchos casos los factores de estrés no ocurren de forma independiente; así el estrés ambiental puede incluir diferentes factores de estrés que interactúan, e.g. alta radiación y altas o bajas temperaturas que pueden romper el sistema de transporte de electrones a

través de la membrana, lo que a su vez puede aumentar el flujo de fotones como resultado del daño de la maquinaria fotosintética.

La cosecha de fotones por los tejidos verdes es inherentemente peligrosa cuando la captura de energía es más rápida que el transporte de electrones y la disipación de la energía, entonces se produce sobre-excitación del aparato fotosintético. La sobre-excitación, también llamada fotoinhibición, representa una represión de la fotosíntesis (Long et al., 1994). La fotoinhibición crónica disminuye la productividad y puede tener efectos negativos sobre la supervivencia; las condiciones fotoinhibitorias pueden llevar a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, siglas en inglés), que causan blanqueamiento fotodinámico y perturbación del metabolismo celular (Foyer et al., 1994). La fotoinhibición y la producción de ROS están relacionados con el daño en los centros de reacción, particularmente en la proteína D1 del fotosistema II (PSII). Las proteínas D1 dañadas pueden ser eliminadas desde los centros de reacción del PSII, y ser reemplazadas con la síntesis de nuevas proteínas. Sin embargo, esta reparación es inhibida si la síntesis es afectada en las hojas estresadas (Rhodes & Nadolska-Orczyk, 2001).

La exposición parcial a un exceso de luz en plantas adaptadas a baja radiación, da como resultado un exceso de energía de excitación que, como consecuencia, produce estrés foto-oxidativo, el cual es controlado por eventos de óxido reducción en las cercanías del fotosistema II (PSII; Karpinski et al., 1997; Mollinedo, 2006). De esta forma, cuando las hojas son dañadas por la exposición a altas intensidades de luz, producen ROS en el cloroplasto; los ROS comúnmente incluyen al radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), al oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) y al radical oxhidrilo ($\text{OH}^\cdot$). El $\text{O}_2^{\cdot-}$, que posteriormente es dismutado a H_2O_2 , es formado por el fotosistema I, mediante la fotorreducción del oxígeno molecular en los cloroplastos. El $\text{OH}^\cdot$ puede ser formado por la reacción de H_2O_2 con $\text{O}_2^{\cdot-}$, en tanto que el $^1\text{O}_2$ es formado por transferencia de energía desde la clorofila en estado excitado (ch^*) al oxígeno. La síntesis de ROS aumenta cuando el cloroplasto es expuesto a un exceso de energía de excitación, particularmente cuando la fijación de carbono es limitada (Rhodes & Nadolska-Orczyk, 2001; Mittler, 2002).

Las ROS desnaturalizan proteínas, dañan ácidos nucleicos, causan peroxidación lipídica y ocasionan el escape del contenido celular; además de una rápida desecación, interfieren en el funcionamiento de la cadena respiratoria en la mitocondria y en el rompimiento y pérdida en la fijación de CO_2 (Scandalios, 1992; Rhodes & Nadolska-Orczyk, 2001). Sin embargo, existen diferentes procesos metabólicos (e.g. la formación de lignina en la pared celular) que requieren de ROS como el H_2O_2 y el radical $\text{OH}^\cdot$. Para

disminuir los efectos tóxicos y letales de los ROS, los organismos aeróbicos han desarrollado dos mecanismos de autodefensa; estos mecanismos, que pueden ser enzimáticos o no enzimáticos, juegan un papel significativo en la protección celular contra los efectos tóxicos de ROS (Scandalios, 1992).

En los procesos no enzimáticos se producen moléculas antioxidantes como los carotenoides, los cuales controlan la proliferación de radicales libres en cloroplastos, así como metabolitos como el ácido ascórbico (vitamina C), el glutatión, el tocoferol (vitamina E) y la ferredoxina, que protegen las moléculas de clorofila contra la foto-oxidación (Noctor & Foyer, 1998; Tausz et al., 2004; Mollinedo, 2006). Los procesos enzimáticos incluyen enzimas capaces de remover, neutralizar o atrapar intermediarios "oxi". La glutatión-peroxidasa y la superóxido dismutasa atrapan el oxígeno del anión superóxido y lo transforman en H_2O_2 , mientras que las catalasas y la ascorbato peroxidasa, que actúan en cloroplastos y la glutatión reductasa que actúa en mitocondria, se cree que capturan H_2O_2 y lo convierten en oxígeno molecular y agua (Noctor & Foyer, 1998; Rhodes & Nadolska-Orzyk, 2001; Payton et al., 2001).

Adicionalmente, las plantas utilizan múltiples mecanismos para balancear la captura de energía con el consumo y la disipación de la misma, con el fin de prevenir el daño oxidativo (Demmig-Adams & Adams III, 1992; Niyogui, 1999); estos incluyen mecanismos de tolerancia que regulan la distribución y disipación de la energía, así como mecanismos de reparación y de evasión que disminuyen la absorción de la luz por los tejidos verdes. Los mecanismos de evasión incluyen el paraheliotropismo y el enrollamiento de las hojas, así como el aumento en la reflectancia a través de la pubescencia, los depósitos de sal, las ceras epicuticulares y las adaptaciones morfológicas permanentes, e.g. hojas pequeñas y gruesas y hábito de crecimiento compacto (Steyn et al., 2002). En algunas bromeliáceas como *Aechmea distiachanta*, se presentan diferente morfología cuando crecen dependiendo del hábitat, las plantas de sombra presentan mayor área foliar proyectada, mientras que plantas de sol muestran mayor área evaporativa y mayor contenido de agua (Cavallero et al., 2009).

Otras medidas para reducir la absorción de radiación incluyen el movimiento de los cloroplastos y la acumulación de metabolitos protectores que sirven como pantallas protectoras contra radiación, e.g. antocianinas, betalainas y rodoxantinas (Steyn et al., 2002). Estos metabolitos también pueden ayudar a evitar el daño oxidativo y a contribuir al secuestro de especies reactivas de oxígeno antes que ataquen macromoléculas (Gould et al., 2002; Winkel-Shirley, 2002).

JUSTIFICACIÓN

La vía fotosintética CAM otorga un diferente número de ventajas para las bromeliáceas que crecen bajo condiciones de sequía: 1) la plasticidad fisiológica a corto plazo [a través del reciclamiento de CO₂ respiratorio bajo condiciones de humedad, seguido de un ajuste temporal compensatorio en la toma de CO₂ en condiciones de sequía, (e.g. *Tillandsia usneoides* (L.) L. (Haslam et al., 2002)]; 2) la plasticidad estacional en asimilación de carbono y la pérdida de agua que incrementan las condiciones de sequía [(e.g. *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex Mez (Maxwell et al., 1995)]; y 3) la fotoprotección; en días soleados se considera que CAM puede proporcionar CO₂ para carboxilación, previniendo reacciones de inhibición de los fotosistemas y daño bajo condiciones de alta radiación [(e.g. *Guzmania monostachia* (Maxwell et al., 1995); *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B.Smith, (Fernandes et al., 2002); *Aechmea dactylina* (Baker) y *Werauhia capitata* (Mez & Wercklé) J.R. Grant, (Pierce et al., 2002)].

Se ha reportado que la vía CAM representa una adaptación exitosa de ciertas plantas, que les ha permitido habitar o competir en ambientes con limitaciones de agua o CO₂ (Andrade et al., 2007). Esta vía puede considerarse como uno de los ejemplos más complejos e interesantes de rutas de regulación fisiológica, por lo que los estudios relacionados con plantas CAM pueden proporcionar información sobre la plasticidad como una respuesta a diferentes factores ambientales.

La frecuencia de las bromeliáceas con vía CAM está relacionada con el ambiente de luz y la exposición a la sequía; sin embargo, estas plantas son más comunes en ambientes de alta radiación, aunque varias especies ocurren también en sitios sombreados. Las especies expuestas a alta radiación con frecuencia reducen su crecimiento y reproducción como consecuencia del daño oxidativo (e.g. *Tillandsia brachycaulos*, Cervantes et al., 2005; y *Guzmania monostachia*, Maxwell et al., 1995). En algunas bromeliáceas CAM se ha observado la producción de antocianinas como una respuesta a la exposición por alta radiación (e.g. *T. capitata*, *T. flabellata*, *G. zahnii*, *Vriesea fosteriana*, Benzing, 2000); también se ha reportado que las antocianinas tienen la función de atraer polinizadores, por lo que se producen en el período reproductivo (Benzing, 2000). Sin embargo, en el campo, se ha observado que algunas plantas expuestas a alta radiación durante la temporada de sequía presentan pigmentación roja, pero no presentan inflorescencia, lo cual sugiere que la producción de antocianinas está también relacionada con una respuesta de fotoprotección.

Con base en lo anterior, para este trabajo se planteó estudiar los mecanismos fisiológicos, morfoanatómicos y químicos *in situ*, en respuesta

a dos condiciones de radiación, en dos bromeliáceas con fisiología CAM, *Tillandsia brachycaulos* y *Bromelia karatas*, de diferente hábito de crecimiento en una selva baja caducifolia. Para cumplir con los objetivos del trabajo se plantearon las siguientes preguntas:

¿Con qué mecanismos cuentan *T. brachycaulos* y *B. karatas*, para sobrevivir en condiciones de alta radiación?

¿Podrían los individuos de sitios expuestos durante la temporada de sequía, presentar alta capacidad fotosintética a través del mantenimiento de la tasa de electrones?

¿Presenta fotoinhibición y degradación de la clorofila la maquinaria fotosintética (PSII)?

¿Presentan una alta eficiencia no fotoquímica (NPQ) los individuos expuestos?

¿Presentan fotodaño y bajo NPQ los individuos bajo sombra cuando se exponen a alta radiación?

¿Producen metabolitos con actividad antioxidante como respuesta a alta radiación *T. brachycaulos* y *B. karatas*? ¿Aumenta la concentración de metabolitos con actividad antioxidante en individuos expuestos durante la temporada de sequía? ¿Producen una mayor cantidad de productos antioxidantes las plantas de sombra bajo condiciones de alta radiación?

¿Reflejan caracteres adaptativos típicos de plantas de sol o de sombra los caracteres morfoanatómicos, como una respuesta a condiciones de alta radiación?

¿Está relacionada con la producción de antocianinas la pigmentación roja de las hojas de plantas expuestas? ¿Se presenta como una respuesta para disminuir el fotodaño la producción de antocianinas?

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si dos especies de bromeliáceas con metabolismo ácido de las crasuláceas, con diferente hábito de crecimiento (epifita y terrestre) y bajo condiciones diferentes de microambiente lumínico en una selva baja caducifolia, cuentan con mecanismos eficientes de fotoprotección.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- * Caracterizar las condiciones de microambiente lumínico para *T. brachycaulos* (epifita) y *B. karatas* (terrestre), durante las temporadas de sequía y lluvia, en individuos expuestos y bajo sombra.

- * Determinar el papel que juega la incidencia de la radiación en la fisiología de dos especies con microhábitat diferente.

- * Cuantificar el contenido de metabolitos con actividad antioxidante en hojas de individuos expuestos y bajo sombra de *T. brachycaulos* y *B. karatas*; durante las temporadas de sequía y lluvia.

- * Describir y cuantificar los caracteres morfoanatómicos de individuos expuestos y bajo sombra de *T. brachycaulos* y *B. karatas*; durante las temporadas de sequía y lluvia.

- * Determinar, en la lámina foliar, la distribución de las antocianinas a través del mesófilo de individuos expuestos y bajo sombra de *T. brachycaulos* y *B. karatas*; durante las temporadas de sequía y lluvia.

- * Cuantificar las antocianinas totales en hojas de individuos expuestos y bajo sombra de *T. brachycaulos* y *B. karatas*; durante las temporadas de sequía y lluvia.

SITIO DE ESTUDIO

La presente investigación se realizó dentro del Parque Nacional de Dzibilchaltún, (21°05' N y 89° 03' W, 10 msnm; a 15 km al norte de la ciudad de Mérida y 20 km al sur del puerto de Progreso) en el estado de Yucatán, México. El sitio está caracterizado por un bosque transicional seco a árido en el sistema Holdridge (Thien et al., 1982) y según Miranda y Hernández X (1963) corresponde a la transición entre la selva baja caducifolia y selva baja caducifolia con cactáceas candelabriformes. De acuerdo a los valores registrados en la estación meteorológica del sitio (datos de julio de 2006 a diciembre de 2008), la precipitación media anual es de 800 a 1500 mm de lluvia con un promedio de temperatura de 25.8°C (máximo de 41.5°C y mínimo de 9.4 °C; Figura 2.2). Este ambiente se caracteriza porque la mayoría de los árboles (~70%) pierden sus hojas durante la marcada estación de sequía (diciembre a mayo, Mondragón et al., 2004; Valdez-Hernández et al., 2009). El estrato arbóreo está dominado por las leguminosas, siendo las especies más comunes *Caesalpinia gaumeri* Greenm, *Acacia pennatula* (Schkecht & Cham) Benth, *Acacia gaumeri* Blake, *Piscidia piscipula* (L.) Benth., *Apoplanesia paniculata* Presl., y *Gymnopodium floribundum* Rolfe. Esta última es una de las especies arbóreas encontradas con mayor frecuencia y abundancia en la comunidad vegetal de la zona de estudio y sirve como hospedero de un gran número de especies e individuos epífitos. *G. floribundum* se caracteriza por tener corteza fisurada, así como una superficie rugosa, lo que permite la adhesión de los apéndices plumosos de las semillas de *Tillandsia brachycaulos*, favoreciendo la colonización del forofito (Mondragón et al., 2004).

ESPECIES DE ESTUDIO

***Tillandsia brachycaulos* Schltdl.** (Figura 1.2 A) se distribuye ampliamente en las selvas secas y desiertos de México y Centroamérica, y generalmente se encuentra desarrollándose como epífita (Mondragón et al., 2004; Ramírez et al., 2005). Dentro de la península de Yucatán es posible encontrarla en todos los tipos de vegetación selvática, e.g., selva baja, selva baja inundable, selva mediana subcaducifolia, selva mediana sub-perennifolia y selva alta perennifolia, siendo más abundante en las selvas bajas caducifolias. *T. brachycaulos* presenta metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) (Martin, 1994; Benzing, 1998), el cual junto con las condiciones oligotróficas (crecimiento bajo condiciones de pocos nutrientes) del ámbito epífita determinan tasas de crecimiento lentas y su tipo ecológico puede clasificarse como tipo V (Tabla 1.1; Benzing, 2000). Es una planta herbácea de forma arrosada de 10 hasta 20 cm de altura en la madurez, con capacidad de generar nuevos individuos tanto por semilla

como por propagación vegetativa. Sus rosetas son monocárpicas, es decir, mueren después del evento reproductivo (~1.5 años). La arquitectura que presenta el conjunto de rametos que conforma cada geneto de *T. brachycaulos* puede ser descrita como tipo "guerrilla" es decir, un macizo de rametos (c.a. cinco rametos) en donde el contacto entre rametos hermanos es mucho mayor que el contacto entre rametos de otros genetos (Lovett-Doust, 1981; Hutchings, 1997).

Es una planta herbácea de forma arrosetada de 10 a 15 cm de altura en la madurez, con capacidad de generar nuevos individuos tanto por semilla como por propagación vegetativa. Sus rosetas son monocárpicas, es decir, mueren después del evento reproductivo (~1.5 años). La arquitectura que presenta el conjunto de rametos que conforma cada geneto de *T. brachycaulos* puede ser descrita como tipo "guerrilla" es decir, un macizo de rametos en donde el contacto entre rametos hermanos es mucho mayor que el contacto entre rametos de otros genetos (Lovett-Doust, 1981; Hutchings, 1997).

***Bromelia karatas* L.** (Figura 1.2. B) es una bromeliácea terrestre, arrosetada que alcanza gran tamaño (talla ~ 1.5 a 3 m), formando colonias de varias plantas debido a la producción de rosetas por rizomas basales (dos a tres rosetas). Las hojas cuentan con espinas marginales recurvadas como defensa contra grandes herbívoros. Presenta la vía fotosintética CAM y su tipo ecológico puede ser clasificado de tipo II (Tabla 1.1), con un sistema de raíces de absorción en el suelo y con raíces apogeotróficas; con tricomas foliares de absorción sobre la base de las hojas. Su morfología puede clasificarse como raíces tipo tanque ("tank-root type"; Pittendrigh, 1948; Benzing, 2000) y sus hojas se caracterizan por presentar moderada succulencia, estomas hundidos y cutícula delgada, que son caracteres xeromórficos que, junto con la vía CAM, garantizan la economía del agua necesaria para sobrevivir largos períodos de sequía en habitats secos y calientes (Benzing, 2000). Esta especie se distribuye en la selva baja caducifolia, la selva baja espinosa, la selva mediana y en la vegetación de dunas (Ramírez et al., 2005).



Figura 1.2. Especies de estudio: *Tillandsia brachycaulos* (A) y *Bromelia karatas* (B).

REFERENCIAS

- Andrade, J.L., E. de la Barrera, C. Reyes-García, M.F. Ricalde, G. Vargas-Soto and J. Cervera (2007).** *El metabolismo ácido de las crasuláceas: Diversidad, Fisiología ambiental y productividad.* Boletín de la Sociedad Botánica de México, 81, 37-50.
- Benzing, D.H. (1990).** *Vascular epiphytes.* New York. Cambridge University Press.
- Benzing, D.H. (1998).** *Vulnerabilities of tropical forests to climate change: the significance of resident epiphytes.* Climatic Change, 39, 519-549.
- Benzing, D.H. (2000).** *Bromeliaceae - Profile of an adaptative radiation.* Cambridge University Press. Cambridge, Gran Bretaña.
- Bullock, S.H., H.A. Mooney and E. Medina (1995).** *Seasonally dry tropical forests.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Cavallero, L., D. López and I.M. Barberis (2009).** *Morphological variation of Aechmea distichantha (Bromeliaceae) in a Chaco forest: habitat and size-related effects.* Plant Biology, doi:10.1111/j.1438-8677.2008.00123.x.
- Cervantes, S.E., E.A. Graham and J.L. Andrade (2005).** *Light microhabitats, growth and photosynthesis of an epiphytic bromeliad in a tropical dry forest.* Plant Ecology, 179, 107-118.
- Ceusters, J., A.M. Borland, E. Londers, V. Verdoodt, C. Godts and M.P. De Proft (2009).** *Differential usage of storage carbohydrates in the CAM bromeliad Aechmea 'Maya' during acclimation to drought and recovery from dehydration.* Physiologia Plantarum, doi: 10.1111/j.1399-3054.2008.01186.x.
- Challenger, A. (1998).** *Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y futuro.* Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad (CONABIO). México.
- Crayn, D.M., K. Winte and J.A.C. Smith (2004).** *Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habitat in the neotropical family Bromeliaceae.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 3703-3708.
- Cushman, J. (2001).** *Crassulacean acid metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments.* Plant Physiology, 127, 1439-1448.
- Cushman, J. (2005).** *Crassulacean acid metabolism: recent advances and future opportunities.* Functional Plant Biology, 32, 375-380.
- Demmig-Adams, B. and W.W. Adams III (1992).** *Photoprotection and other responses of plants to high light stress.* Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 43, 599-626.

- Fetcher, N.,** S.F. Oberbauer and R.L. Chazdon (1994). *Physiological ecology of plants*. University of Chicago Press. Chicago.
- Fernandes, J.,** R.M. Chaloub and F. Reiner (2002). *Influence of nitrogen supply on the photoprotective response of Neoregelia cruenta (Bromeliaceae) under high and low light intensity*. Functional Plant Biology, 29, 757-764.
- Foyer, C.H.,** M. Lelandais and K.J. Kunert (1994). *Photooxidative stress in plants*. Physiologia Plantarum, 92, 696-717.
- Gentry, A.H.** (1995). "Diversity and floristic composition of neotropical dry forests", in *Seasonally Dry Tropical Forests*, Bullock, S.H., H.A. Mooney and E. Medina (eds). Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Gould, K.S.,** J. McKelvie and K.R. Markham (2002). *Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury*. Plant, Cell and Environment, 25, 1261-1269.
- Graham, E.A.** and J.L. Andrade (2004). *Drought tolerance associated with vertical stratification of two co-occurring epiphytic bromeliads in a tropical dry forest*. American Journal of Botany, 9, 699-706.
- Griffiths, H.,** U. Lüttge, K.H. Stimmel, C.E. Crook, N.M. Griffiths and J.A. Smith (1986). *Comparative ecophysiology of CAM and C₃ bromeliads III. Environmental influences on CO₂ assimilation and transpiration*. Plant Cell and Environment, 9, 385-393.
- Haslam, R. P.,** A.M. Borland and H. Griffiths (2002). *Short-term plasticity of CAM expression in the epiphytic bromeliad Tillandsia usneoides*. Functional Plant Biology, 29, 749-746.
- Hernandez-X., E.** and F. Miranda (1963). *Los tipos de vegetación de México y su calificación*. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 28, 106.
- Hutchings, M.** (1997). "Resource allocation patterns in clonal herbs and their consequences for growth", in *Plant Resource Allocation. Physiological Ecology Series*, Bazzaz, F.A. and J. Grace (eds). Academic Press. USA.
- Karpinski, S.,** C. Escobar, B. Karpinska, G. Creissen and P.M. Mullineaux (1997). *Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in Arabidopsis during excess light stress*. The Plant Cell, 9, 627-640.
- Karpinski, S. H.** Reynolds, B. Karpinska, G. Wingsle, G. Creissen, and P. Mullineaux (1999). *Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in Arabidopsis*. Science, 284, 654-657.
- Kessler, M.** (2002). *Species richness and ecophysiological types among Bolivian bromeliad communities*. Biodiversity and Conservation, 11, 987-1010.

- Kluge, M. and I.P. Ting (1978).** *Crassulacean acid metabolism. Analysis of an Ecological Adaptation.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Koeppen, W. (1948).** *Climatología. Un estudio de los climas de la tierra.* México; Buenos Aires. Fondo de Cultura Económica.
- Long, S.P., S. Humphries and P.G. Falkowski (1994).** *Photoinhibition of photosynthesis in nature.* Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 45, 633-662.
- Lovett-Doust, L. (1981).** *Population dynamics and local specialization in a clonal perennial (Ranunculus repens). I. The dynamics of ramets in contrasting habitats.* Journal of Ecology, 69, 743-755.
- Lüttge, U. (1997).** *Physiological ecology of tropical plants.* Springer. Alemania.
- Maass, J.M., J.M. Vose, W.T. Swank and A. Martínez-Yrizar (1995).** *Seasonal changes of leaf area index (LAI) on a tropical deciduous forest in west México.* Forest Ecology and Management, 74, 171-180.
- Martin, E. G. (1994).** *Physiological ecology of the Bromeliaceae.* Botanical Review, 60, 1-82.
- Matsubara, S., C.H. Krause, J. Aranda, A. Virgo, K.G. Beiser, P. Jahns and K. Winter (2009).** *Sun-shade patterns of leaf carotenoid composition in 86 species of neotropical forest plants.* Functional Plant Biology, 36, 20-36.
- Maxwell, K., H. Griffiths, A. Borland, A. Young, M. Broadmeadow & C. Fordham. 1995.** *Short-term photosynthetic responses of the C₃-CAM epiphyte Guzmania monostachya var. monostachya to tropical seasonal transitions under field conditions.* Australian Journal of Plant Physiology. 22. 771-781.
- Mittler, R. (2002).** *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance.* Trends in Plants Science, 7, 405-410.
- Maxwell, K., H. Griffiths, A. Borland, A. Young, M. Broadmeadow & C. Fordham. 1995.** *Short-term photosynthetic responses of the C₃-CAM epiphyte Guzmania monostachya var. monostachya to tropical seasonal transitions under field conditions.* Australian Journal of Plant Physiology. 22. 771-781.
- Martin, E. G. (1994).** *Physiological ecology of the Bromeliaceae.* Botanical Review, 60, 1-82.
- Mittler, R. (2002).** *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance.* Trends in Plants Science, 7, 405-410.
- Mollinedo, P.A. (2006).** *Antioxidant activity of bolivian plant secondary metabolites.* PHD Thesis. Department of organic chemistry. Lund University. Sweden.
- Mondragón, D., R. Durán, I. Ramírez and T. Valverde (2004).** *Temporal variation in the demography of the clonal epiphyte Tillandsia*

- brachycaulos* (Bromeliaceae) in the Yucatán Peninsula, México. *Journal of Tropical Ecology*, 20, 189-200.
- Nimmo, H.G.** (2003). *How to tell the time: the regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in Crassulacean acid metabolism (CAM) plants*. *Biochemical Society Transactions*, 31, 728-730.
- Niyogui, K.K.** (1999). *Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 333-359.
- Noctor, G.** and C.H. Foyer (1998). *Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249-279.
- Orellana, R., M. Balam-Ku, I. Bañuelos-Robles, E. García, J.A. González-Iturbe, F. Herrera-Cetina, J. Vidal-López** (1999). "Evaluación climática", in *Atlas de Procesos Territoriales de Yucatán*. A. García de Fuentes, J. Córdoba y Ordóñez and Chico Ponce de León P (eds). Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán. pp. 163–182.
- Payton, P., R. Webb, D. Kornyejev, R. Allen and A. S. Holaday** (2001). *Protecting cotton photosynthesis during moderate chilling at high light intensity by increasing chloroplastic antioxidant enzyme activity*. *Journal of Experimental Botany*, 52, 365. 2345-2354.
- Pierce, S., K. Winter and H. Griffiths** (2002). *The role of CAM in high rainfall cloud forests: an in situ comparison of photosynthetic pathways in Bromeliaceae*. *Plant Cell and Environment*, 25, 1181-1189.
- Pittendrigh, C.S.** (1948). The bromeliad-Anopheles-malaria complex in Trinidad. I. The bromeliad flora. *Evolution*, 2, 58-89.
- Ramírez, I.M., G. Carnevali and F. Chi** (2005). *Guía Ilustrada de las Bromeliaceae de la porción mexicana de la península de Yucatán*. Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Reyes-García, C., H. Griffiths, E. Rincon and P. Huante**. 2008. *Niche differentiation in tank and atmospheric epiphytic bromeliads of a seasonally dry forest*. *Biotropica*, 40, 168-175.
- Rhodes, D. and A. Nadoska-Orczyk** (2001). *Plant stress physiology*. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, 1-7.
- Rzedowski, J.** (2006). *Vegetación de México*. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Scandalios, J.G** (1992). *Molecular biology of free radical scavenging systems*. *Current Communications in Cell and Molecular Biology* 5. North Carolina State University, Raleigh.
- Steyn, W.J., S.J.E. Wand, D.M. Holcroft and G. Jacobs** (2002). *Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection*. *New Phytologist*, 155, 349-361.

- Tausz, M., H. Šircelj and D. Grill (2004).** The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *Journal of Experimental Botany*, 55, 1955-1962.
- Thien, L.B., A. S. Bradburn and A.L. Welden (1982).** *The woody vegetation of Dzibilchaltún, a maya archaeological site in Northwest Yucatan, Mexico.* Middle American Research Institute. Tulane University, New Orleans.
- Valladares, F. (2004).** *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante.* Capítulo 12. Ministerio de medio ambiente. Madrid, España.
- Valdez-Hernández, M., J.L. Andrade, P.C. Jackson and M. Rebolledo-Vieyra (2009).** *Phenology of five tree species of a tropical dry forest in Yuactán, Mexico: effects of environmental and physiological factors.* *Plant and Soil*. DOI 10.1007/s11104-009-0142-7.
- Winkel-Shirley, B. (2002).** *Biosynthesis of flavonoids and effects of stress.* *Plant Biology*, 5, 218-223.
- Winter, K. and J.A.C. Smith (1996).** "An introduction to crassulacean acid metabolism: biochemical principles and biological diversity", in *Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, Ecophysiology and Evolution*, Winter, K. and J.A.C. Smith. (eds). Springer. Berlin, Alemania.
- Zotz, G. and P. Hietz (2001).** *The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions.* *Journal of Experimental Botany*, 52, 2067-2078.

Capítulo II

Respuestas ecofisiológicas de dos bromeliáceas CAM en una selva baja caducifolia de Yucatán bajo condiciones contrastantes de luz.

INTRODUCCIÓN

El balance entre la energía que es absorbida como luz y la que es fotoquímicamente convertida y usada para el metabolismo es crítico para las plantas (Hüner et al., 2002). La alteración de esta energía en homeostasis puede tener como consecuencia una amplia variedad de respuestas, desde una disminución en la regulación de la eficiencia fotoquímica a corto plazo, hasta cambios morfológicos en las hojas, y el irreversible daño del aparato fotosintético a largo plazo (Pérez-Torres et al., 2004). La exposición a alta radiación, produce una alteración en el funcionamiento de las células, en forma combinada o separada con las altas temperaturas.

Por otra parte, y aunque la excitación excesiva de las moléculas de la fotosíntesis puede ocurrir incluso a moderadas intensidades de luz, diferentes condiciones de estrés ambiental limitan la capacidad de las plantas para utilizar la energía lumínica a través de la fotosíntesis (Demming-Adams & Adams, 1992). Bajo un exceso de energía lumínica los electrones de los pigmentos fotosintéticos son excitados por la energía incidente y este exceso de energía puede perderse por disipación calorífica o fluorescencia, o por ambas (Maxwell & Johnson, 2000). La alta radiación daña tanto los tejidos epidérmicos como los subepidérmicos, las paredes celulares se vuelven más finas afectando su integridad estructural (Flint et al., 1984). Las concentraciones de clorofila a y b disminuyen considerablemente debido a una fotodecoloración de la clorofila (Matile et al., 1999). El exceso de fotones es rápidamente disipado en forma de calor (Adams et al., 1995; Niyogi, 2000), sin embargo, cuando la absorción de la energía lumínica excede la capacidad de la fotosíntesis, y los mecanismos de fotoprotección han sido sobresaturados, ocurre la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, siglas en inglés; Niyogi, 1999; Asada, 1999).

La vía fotosintética del metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) se ha originado muchas veces en diversas familias de plantas como en las bromeliáceas (Benzing, 1990), principalmente como un mecanismo de ahorro de agua; y ciertas plantas pueden cambiar de fotosíntesis C_3 a CAM o tener diferentes grados de CAM, dependiendo de la cantidad de luz, el estado hídrico y la edad de la planta, y de esta forma maximizar la fotosíntesis (Benzing, 1990; Maxwell et al., 1995; Winter y Smith, 1996). La

frecuencia de las bromeliáceas CAM está relacionada con la exposición a la luz y la disponibilidad de agua, ambos factores dentro del dosel y a través de diferentes regiones geográficas (Smith et al., 1986; Zotz y Hietz, 2001). La alta capacidad fotosintética asociada a las plantas adaptadas a alta radiación, tanto C₃ como CAM, proporciona cierta protección, aunque CAM puede proporcionar fotoprotección adicional a través del mantenimiento del transporte de electrones (Griffiths et al., 1986; Maxwell et al., 1995). De esta forma, en plantas adaptadas a la sombra, la vía CAM puede aportar una respuesta más rápida a los haces de luz, haciendo más eficiente el transporte de electrones (Skillman et al., 1999; Andrade et al., 2004).

Los miembros de la familia Bromeliaceae, epifitas y terrestres, muestran una amplia variedad de estrategias de uso de luz; las diferentes especies varían desde aquellas adaptadas a sitios con alta radiación presentando altos valores de saturación a la luz y bajos contenidos de clorofila, hasta las adaptadas a la sombra con valores bajos de saturación de luz y, que presentan fotodegradación y fotoinhibición cuando se encuentran sujetas a alta irradiación (Griffiths & Maxwell, 1999; Benzing, 2000; Stuntz & Zotz, 2001). Se ha encontrado que estos rangos fisiológicos están relacionados con el hábitat de las especies, desde desiertos hasta bosques lluviosos (Benzing & Renfrow, 1971; Smith et al., 1986), así como con la distribución local de las epifitas a través de un gradiente de altura y de intensidad de luz en el dosel (Griffiths & Maxwell, 1999). Lo anterior refleja la alta capacidad de aclimatación de las bromeliáceas a ambientes cambiantes de intensidad lumínica (Maxwell et al., 1992; Griffiths & Maxwell, 1999; Martin et al., 1999; Keller & Lüttge, 2005).

Entre los factores involucrados en la distribución de las bromeliáceas, en los diferentes tipos de ambientes y dentro de cada microambiente, el agua es el factor más importante. Sin embargo, existen varios factores intrínsecos y extrínsecos (aislados o combinados) que es necesario tomar en cuenta, ya que éstos limitan el crecimiento y supervivencia de las bromeliáceas. Entre los factores intrínsecos se encuentran el hábito de crecimiento, la fotoinhibición, la vía fotosintética, la morfología y el tamaño de los individuos, en tanto que entre los extrínsecos se incluyen la disponibilidad de nutrimentos, la cantidad de sustrato, la fenología del forofito (u hospedero), la intensidad de luz, la disponibilidad de agua y la velocidad del viento (en el caso de las especies epifitas), así como la coexistencia con otras bromeliáceas y las interacciones con otros organismos (Andrade et al., 2004).

Uno de los factores intrínsecos determinante para el éxito de las especies en diferentes ambientes y microambientes es la plasticidad en la fotosíntesis. En la selva baja caducifolia, durante la temporada de sequía el

mayor factor limitante es la disponibilidad de agua. Las plantas se encuentran sometidas a estrés hídrico, altas temperaturas, y a una mayor frecuencia de días despejados y con alta radiación. Esta combinación de factores puede resultar en una disminución en la productividad fotosintética, provocar la fotoinhibición de la fotosíntesis e incluso la destrucción fotooxidativa del aparato fotosintético (Krauze & Weis, 1991; Osmond, 1994). La fotoinhibición es provocada por la pérdida en el funcionamiento del fotosistema II (PSII), que se manifiesta como una disminución, transitoria o permanente, en la eficiencia cuántica de la fotosíntesis. La fotoinhibición puede ser el resultado del fotodaño directo en los PSII y también de la fotoprotección.

La fotoprotección involucra diferentes mecanismos que previenen que el exceso de energía lumínica absorbida durante la fotosíntesis dañe las células fotosintéticas. En algunas especies las respuestas de fotoprotección son rápidas, e.g. algunas especies de helechos epífitos aumentan la concentración de carotenoides y α -tocoferol después de la exposición a alta radiación (Tausz et al., 2001). El nivel de fotoprotección de una especie en particular, puede evaluarse a través de parámetros como la fluorescencia de la clorofila, que es un indicador de los procesos del funcionamiento fotosintético en donde la emisión de la fluorescencia refleja los cambios en la eficiencia fotoquímica y la disipación en forma de calor (Del & Toivonen, 2003). Asimismo, permite medir fácilmente ciertas variables fotosintéticas, como el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (F_v/F_m ; fluorescencia variable/fluorescencia máxima), que puede ser un buen indicador del desempeño fotosintético de la planta, con valores de 0.8-0.83 para plantas no fotoinhibidas (Maxwell & Johnson, 2000); las mediciones de la disipación no fotoquímica (non-photochemical quenching; NPQ), que estiman la capacidad de fotoprotección mediante la formación reversible del carotenoide zeaxantina inducido por la luz y el daño a largo plazo o fotoinhibición; las mediciones de eficiencia fotoquímica (yield, Φ PSII), que es una medida del estado de oxidación de la plastoquinona Q_A , es decir la proporción de centros de reacción del PSII que se encuentran en estado abierto; y la tasa de transporte de electrones (ETR) que refleja la eficiencia con la cual la energía de excitación capturada por los pigmentos antena es transferida hacia los aceptores de electrones en los centros de reacción del PSII (Johnson et al., 1993; Demming-Adams et al., 1995; Maxwell & Johnson, 2000; Horton et al., 1996, ver ANEXO I).

Los estudios de la fluorescencia de la clorofila contribuyen al entendimiento de la naturaleza de utilización de luz por las plantas CAM; ya que se ha observado que plantas que crecen en sitios más expuestos muestran una reducción en su capacidad fotosintética al medio día, aumentando su protección al fotodaño; en tanto que las plantas de sitios

sombreados son más eficientes utilizando la energía lumínica para fotosíntesis y menos eficientes para disipar el exceso de energía lumínica (Martin et al., 1999). En condiciones de campo, los mecanismos de fotoprotección dependen de los cambios de temperatura y estos a su vez dependen de la intensidad lumínica. Los climas caracterizados por altas temperaturas y alta radiación normalmente están acompañados por baja disponibilidad de agua y, en severas condiciones, estos factores pueden causar disfunciones en los centros de reacción de los fotosistemas, y en las reacciones sucesivas del transporte de electrones, además de alterar la fotofosforilación y el funcionamiento de diferentes enzimas que participan en la fijación de carbono (Jung & Niyogui, 2008; Triantaphylidès & Havaux, 2009).

Con el fin de responder las preguntas sobre la capacidad fisiológica de las plantas expuestas y bajo sombra de dos especies de bromeliáceas CAM, *Tillandsia brachycaulos* y *Bromelia karatas*, que se encuentran ante un ambiente con fluctuaciones estacionales de intensidad lumínica y disponibilidad de agua, se realizó una comparación de los parámetros de fluorescencia de la clorofila (ETR, NPQ, Yield, Fv/Fm), la concentración de los pigmentos fotosintéticos, el potencial hídrico y la acumulación de ácidos orgánicos en plantas del Parque Nacional Dzibilchaltún, Yucatán.

MATERIALES Y MÉTODOS

Trabajo de campo

El presente trabajo se realizó dentro del Parque Nacional de Dzibilchaltún, (21°05' N y 89° 03' W, 10 msnm; a 15 km al norte de la ciudad de Mérida y 20 km al sur del puerto de Progreso) en el estado de Yucatán, México. El sitio está caracterizado por un bosque transicional seco a árido en el sistema Holdridge (Thien et al., 1982). En el sitio de estudio se determinó la ubicación y las condiciones microambientales de los individuos bajo condiciones de sombra y expuestos, de las especies de *Tillandsia brachycaulos* (especie epífita) y *Bromelia karatas* (especie terrestre). Los individuos en estudio de la especie epífita *T. brachycaulos* se encuentran principalmente sobre hospederos de *Gymnopodium floribundum* (Polygonaceae), que es una especie con recambio de hojas. Se seleccionaron seis árboles hospederos, en donde se eligieron seis individuos de *T. brachycaulos*, tres de cada microambiente, de cada uno de los individuos se tomaron mediciones de la altura a la base del forofito, así como diámetro y la altura a la que se encontraban desde el suelo. En el caso de la bromeliácea terrestre *B. karatas*, se tomaron mediciones de diámetro y la talla de los individuos. Las mediciones y la colecta de muestras para los análisis fisiológicos se realizaron en hojas de plantas maduras, durante la mitad de la estación de lluvia (septiembre 2006), al inicio de la estación de sequía (marzo 2007), a la mitad de la estación de sequía (abril 2007), al final de la estación de sequía (mayo 2007) y al final de la estación de lluvia (noviembre 07).

Caracterización de las condiciones ambientales

Los parámetros ambientales en las temporadas y días de medición fueron obtenidos de los datos registrados en la estación meteorológica de Dzibilchaltún. Los parámetros que se midieron fueron la humedad relativa (%), el déficit de presión de vapor (DPV; kPa), el flujo de fotones para la fotosíntesis (FFF; $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), precipitación (mm) y temperatura ambiental (°C).

Caracterización de microambiente lumínico

Para determinar la cantidad y el porcentaje de radiación incidente sobre las plantas expuestas y de sombra, se realizaron mediciones del FFF, con un medidor de cuantos (LI250-A, LI-COR, Lincoln, Nebraska, EUA) conectado a un sensor de cuantos (LI190SA, LI-COR, Lincoln, Nebraska, EUA), durante la estación de lluvia y sequía, en seis plantas de cada especie, tres plantas bajo sombra y tres expuestas. Todas las mediciones se realizaron durante la

primer semana de cada mes, cada tres horas durante todo el día, con el sensor colocado a una altura de aproximadamente 20 mm sobre cada planta. Al mismo tiempo, para determinar el microambiente, se registró la humedad relativa con un sigrómetro de onda (HR; %), y la temperatura ambiental (°C), la del suelo y la de las hojas con un termómetro infrarrojo.

Mediciones de fluorescencia

Se hicieron mediciones de la fluorescencia de la clorofila (F_v/F_m ; fluorescencia variable/fluorescencia máxima) y parámetros relacionados (la eficiencia no fotoquímica, NPQ; el rendimiento cuántico del fotosistema II, Φ_{PSII} ; y la tasa de transporte de electrones, ETR) con un medidor de fluorescencia portátil (Mini-PAM, Walz, Alemania). Las mediciones se hicieron durante las temporadas de lluvia y de sequía en seis individuos de cada especie, en donde tres estaban expuestos a alta radiación y tres bajo sombra. Se tomaron mediciones pre-alba de F_v/F_m entre las 5:30 y 6:00 am, cuando las plantas están terminando el período de oscuridad y los fotosistemas se encuentran abiertos, y de esta forma determinar fotoinhibición en las plantas. Durante el curso de un día se hicieron mediciones cada tres horas (5:00, 8:00, 11:00, 14:00 y 17:00 h) de la ETR, del NPQ, así como de la Φ_{PSII} y del FFF.

Curvas de respuesta a la luz

Se realizaron curvas de respuesta a la luz estacionales, tanto para plantas expuestas como de sombra, para determinar el punto de saturación a la luz. Las plantas se aclimataron a la oscuridad cubriéndolas con una bolsa negra por aproximadamente 20 minutos (Figura 2.1) y para determinar el punto de saturación a la luz se aplicaron 10 pulsos de luz de aproximadamente $0 - 1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y los resultados fueron registrados en el medidor de fluorescencia.



Figura 2.1. Aclimatación de las plantas a la oscuridad al medio día, durante la temporada de lluvia. *Bromelia karatas* (A) y *Tillandsia brachycaulos* (B).

Potencial hídrico

Se realizó la colecta de hojas, de tres a seis individuos de plantas expuestas y de sombra de *T. brachycaulos* y de *B. karatas*, durante cada estación de muestreo. Las mediciones del estatus hídrico se tomaron durante prealba y al medio día y las hojas fueron transportadas al laboratorio en frío para hacer las mediciones con el medidor de potencial hídrico WP4 (Decagon, Devices, Inc. Washington, USA). Las hojas se cortaron en piezas cuadradas, hasta cubrir el área de la cubeta de medición del instrumento (la cantidad de hojas estaba dada por el tamaño de las cubetas del instrumento).

Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

Para determinar la concentración de clorofila y carotenoides se colectaron 20 hojas de tres a seis individuos de plantas expuestas y bajo sombra de cada una de las especies, a las 0800 h, durante cada estación de muestreo,

y fueron transportadas en frío al laboratorio. Los pigmentos fueron extraídos de acuerdo al procedimiento de Hendry & Price (1993): se tomaron muestras de hojas (50 a 100 mg de peso fresco); el tejido fue macerado con 2 ml de acetona al 80% en frío y a los extractos obtenidos se les determinó la absorbancia con un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU650), las lecturas se hicieron para clorofila a 645 nm y 663 nm y para carotenoides totales a 470 nm. Las concentraciones de pigmentos se calcularon con las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{mol/gpf}) = (12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}) \times 1.119$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{mol/gpf}) = (22.9 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663}) \times 1.102$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{mol/gpf}) = \frac{(A_{470} + 0.114 \times A_{663} - 0.638 \times A_{645}) \times V \times 10^3}{112.5 \times \text{peso fresco}}$$

Donde:

A= absorbancia

V= volumen del extracto

gpf= gramo de peso fresco

Variación en el contenido de ácidos orgánicos

La fluctuación diurna de pH y la concentración de ácidos orgánicos, característicos del CAM, está dada como la diferencia entre los niveles de éstos, determinados al final y al comienzo del fotoperíodo del día siguiente. Se colectaron muestras, durante las temporadas de lluvia y de sequía, al atardecer y prealba, de hojas de 1.54 cm² de área, con ayuda de un sacabocados. El material vegetal se cortó y se conservó en etanol en tubos de 1.5 ml. La extracción del contenido celular se realizó por ebullición para eliminar el etanol, triturando el material vegetal, y mezclándolo con 10 ml de agua destilada durante 15 minutos y, posteriormente se agregaron 50 mL de agua destilada, el sobrenadante resultante se tituló con NaOH 0.005 N hasta un pH de 7; el pH se midió con un potenciómetro (Oakton® pH 510 series; Percy et al., 1989; Zotz & Andrade 1998). La acidificación fue estimada a partir de la concentración del ión hidrógeno (H⁺) durante la tarde menos la de prealba. La concentración del H⁺ fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{mmol H}^+ \text{ m}^{-2} = \frac{\text{L de NaOH} \times [\text{NaOH}]}{\text{área (m}^2\text{)}} \times 1000$$

Donde:

L= litros de NaOH

[NaOH]= concentración de hidróxido de sodio (0.005 mol/L)

Análisis estadísticos

Para determinar diferencias entre temporadas, exposición (plantas expuestas y bajo sombra), y entre horas de medición (ciclo diurno) para cada especie, se realizó un análisis de varianza de tres vías (ANOVA) para cada uno de los parámetros de fluorescencia (NPQ, ETR y Φ PSII), flujo de fotones para la fotosíntesis (FFF) y temperatura (T). En el caso del potencial hídrico, los ácidos orgánicos y la concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofila total y carotenoides), se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), para determinar diferencias entre temporadas, exposición (plantas expuestas y bajo sombra) de cada especie. En el caso de diferencias significativas entre los factores, se realizó una prueba de Tukey. Los análisis se hicieron con el paquete estadístico JMP (SAS, Institute Inc NC, U.S.A).

RESULTADOS

1. Caracterización ambiental del sitio, durante el período de trabajo

Durante dos años (2006-2008), se obtuvieron datos ambientales de la estación meteorológica instalada en el sitio de estudio, cabe mencionar que para el año 2006 solo se obtuvieron los datos a partir del mes de junio. En la Figura 2.2 se muestra el diagrama ombrotérmico para el sitio de estudio en donde se observa una marcada estacionalidad, caracterizadas por la temperatura y la precipitación; en donde la temporada de lluvia es de junio a septiembre y, la temporada de sequía de febrero a mayo. La precipitación para 2006, 2007 y 2008 fue de 809.093 mm, de 1177.66 mm y de 1464.77 mm, respectivamente, con lluvias ocasionales durante las temporadas de sequía. Los valores de precipitación por arriba de la línea punteada indican un superávit de lluvia (valores con más de 100 mm). La temperatura media anual fue de 26.4°C, de 25.6°C y de 25.5°C para 2006, 2007 y 2008 respectivamente. La temperatura máxima registrada fue de 41.5°C (mayo de 2008) y la mínima de 9.4°C (diciembre de 2008).

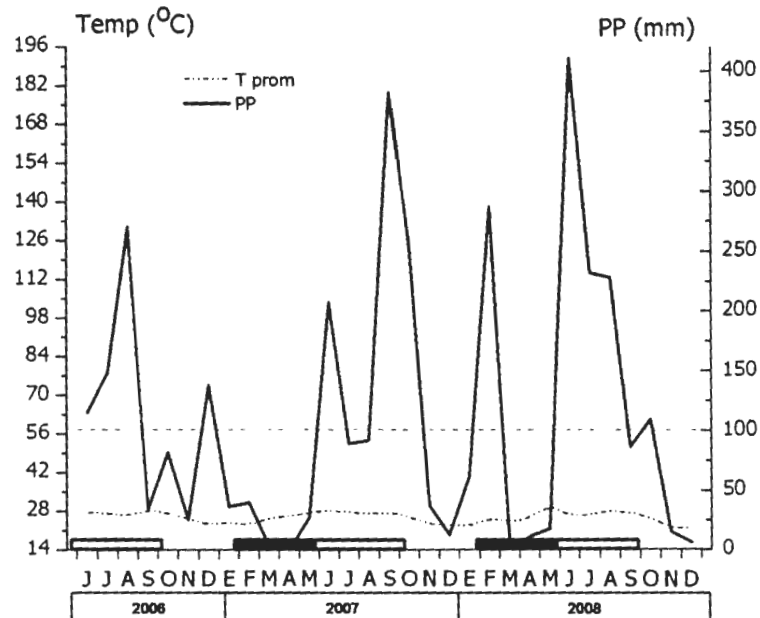


Figura 2.2. Diagrama ombrotérmico para el sitio de estudio de junio de 2006 a diciembre de 2008. Los rectángulos blancos indican la temporada de lluvia y los rectángulos negros indican la temporada de sequía. La línea punteada en los 100 mm de precipitación, indica un superávit.

En la Figura 2.3 se muestran los valores para el flujo de fotones para la fotosíntesis (FFF) por día, que determina la cantidad de luz que llega al sitio, así como el déficit de presión de vapor (DPV) que mide el poder secante del aire, siendo un estimador de la demanda atmosférica de humedad en los diferentes momentos de medición y un elemento de caracterización general del clima del sitio de estudio. Durante la temporada de sequía el FFF diario es bajo y se presenta un aumento en el DPV, característico de la temporada de sequía, cabe mencionar que durante esta temporada se presentan menos horas luz, aunque la luz llega directa, y nos demuestra la marcada estacionalidad del sitio. Por otro lado, durante la temporada de lluvia se observa un aumento en el FFF, debido a que los días son más largos y se presentan más horas luz en los días despejados, también se observa una disminución del DPV, ocasionado por el aumento en la humedad del aire.

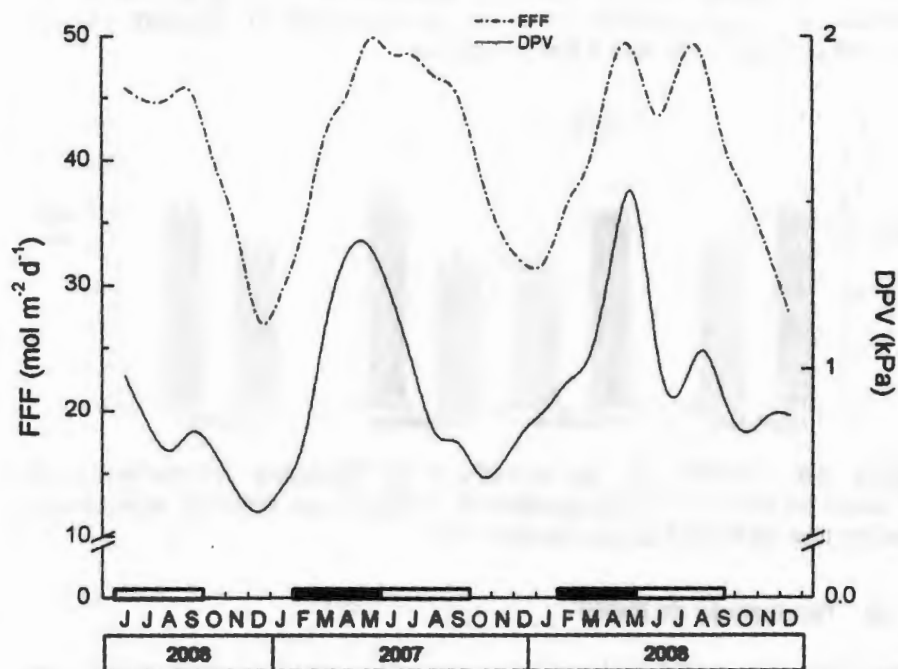


Figura 2.3. Diagrama de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) y déficit de presión de vapor (DPV) para el sitio de estudio de junio de 2006 a diciembre de 2008. Los rectángulos blancos indican la temporada de lluvia y los rectángulos negros indican la temporada de sequía.

2. Caracterización del ambiente lumínico y el microambiente

La primera caracterización para determinar el microambiente lumínico de los individuos, se realizó durante la temporada de lluvia de 2006. Los individuos fueron clasificados como expuestos y bajo sombra de acuerdo al porcentaje de radiación incidente, a partir de las mediciones del flujo de fotones para la fotosíntesis (FFF; $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Además de las mediciones de FFF, también se tomaron otros parámetros microambientales como la temperatura de la planta, del suelo y del ambiente para las dos especies.

Para tratar de disminuir el error entre los parámetros fisiológicos, se tomaron mediciones de la talla de las plantas, para que las plantas empleadas de ambas especies fueran del mismo tamaño. De esta forma, las plantas empleadas se seleccionaron de individuos maduros que no estuvieran en período reproductivo (floración), de aproximadamente el mismo tamaño, y en clones de no más de tres ramets. En la figura 2.4 se muestra el tamaño de los individuos empleados para cada una de las especies, en donde se observa que no hay diferencias en diámetro y altura, entre las plantas expuestas y las de sombra.

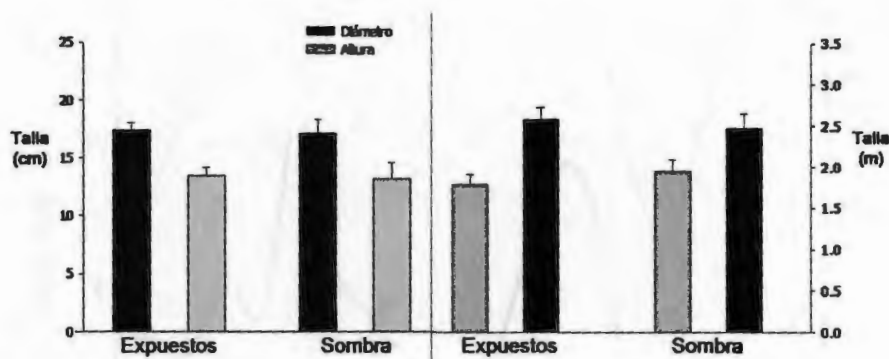


Figura 2.4. Tamaño de los individuos de *Tillandsia brachycaulos* (A, unidades en cm) y *Bromelia karatas* (B, unidades en metros), expuestos y bajo sombra. Los valores son medias $\pm$ EE.

a) Temporada de lluvia

Para determinar el FFF de las plantas expuestas y bajo sombra, se tomaron 10 mediciones de la radiación incidente sobre seis individuos de *T. brachycaulos* y se calculó el porcentaje de radiación. En la figura 2.5, se muestran los resultados observados para el FFF en un ciclo diurno, en donde la cantidad de FFF total se refiere a la cantidad de FFF sobre el dosel, al medio día se observa el mayor FFF, siendo las plantas expuestas

las que recibieron la mayor cantidad de FFF (Figura 2.5 A). Se observan diferencias significativas entre el porcentaje de radiación recibida entre las plantas expuestas (65%) y las de sombra (15%; Figura 2.5 B). En cuanto al ciclo diurno de la temperatura de la hoja, (Figura 2.5 C) se observa un aumento después del medio día que está relacionado con el aumento en la radiación; no se observan diferencias significativas entre las plantas expuestas y bajo sombra durante las mediciones matutinas, sin embargo, en las mediciones después del medio día (14:00 y 17:00 h) se observan diferencias significativas, siendo las plantas bajo sombra las que presentan la mayor temperatura.

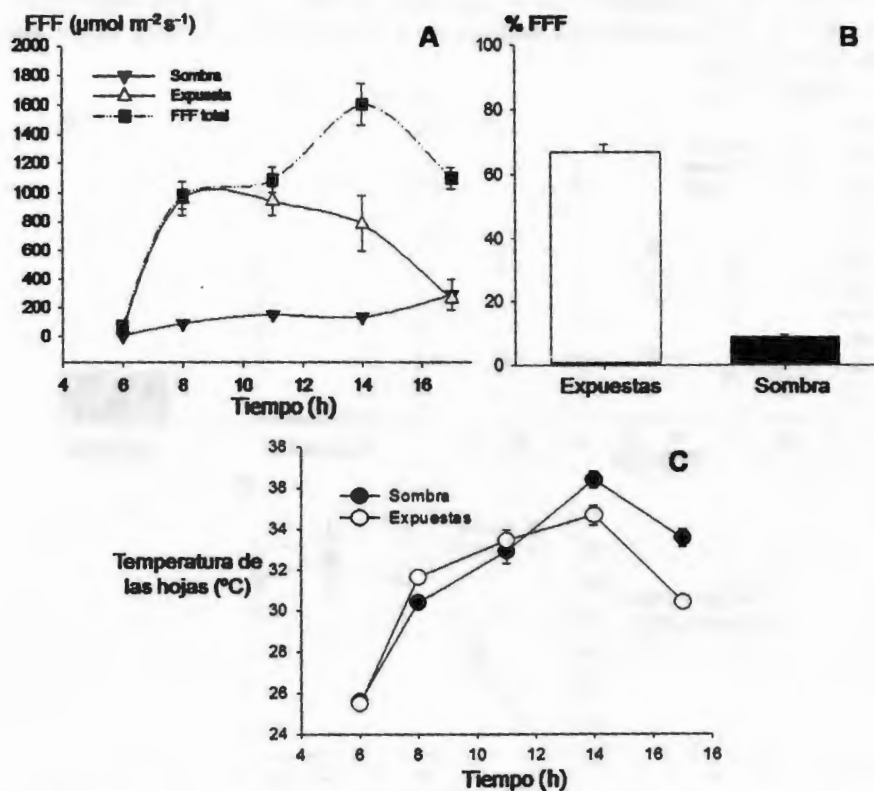


Figura 2.5. Caracterización del microambiente lumínico para *Tillandsia brachycaulos* durante la temporada de lluvia. A, Flujo de fotones para la fotosíntesis (FFF) total y FFF sobre los individuos bajo sombra y expuestos; B, Porcentaje del FFF sobre las plantas expuestas y bajo sombra; C, temperatura de los individuos bajo sombra y expuestos. Los valores son medias $\pm$ EE, n=6 replicas por hora de medición.

Para el caso de *B. karatas* se realizaron 10 mediciones de la radiación incidente sobre seis individuos de plantas expuestas y bajo sombra; se registró la temperatura de las plantas, y se calculó el promedio y el porcentaje de radiación con mediciones cada tres horas (Figura 2.6). Al medio día se observa la mayor cantidad de FFF total, siendo las plantas expuestas las que recibieron la mayor cantidad de radiación, cabe mencionar que en este caso, el FFF de las plantas es muy similar al FFF total (Figura 2.6 A). Se observan diferencias significativas entre el porcentaje de radiación recibida entre las plantas expuestas (80%) y las de sombra (20%; Figura 2.5 B). En cuanto al ciclo diurno de la temperatura de las hojas (Figura 2.5 C) se observa un aumento después del medio día, que está relacionado con el aumento en la radiación; y no se observan diferencias significativas entre las plantas expuestas y bajo sombra durante todas las horas de medición.

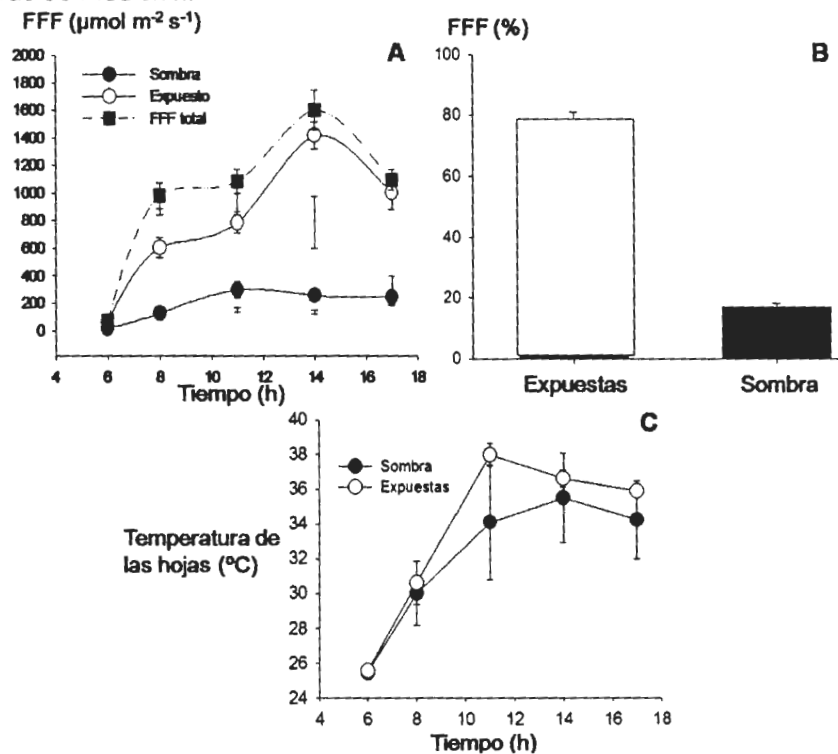


Figura 2.6. Caracterización de microambiente lumínico para *Bromelia karatas* durante la temporada de lluvia. **A**, Flujo de fotones para la fotosíntesis (FFF) total y FFF sobre los individuos bajo sombra y expuestos; **B**, Porcentaje de FFF en las plantas expuestas y bajo sombra; y **C**, temperatura de los individuos bajo sombra y expuestos. Los valores son medias $\pm$ EE, $n=6$ replicas por hora de medición.

Las temperaturas del suelo y del ambiente en los micrositios expuestos y bajo sombra se pueden observar en la Figura 2.7. En el caso de la temperatura del suelo, en los micrositios expuestos se observan diferencias significativas entre las horas de medición de plantas expuestas y bajo sombra, registrándose una mayor temperatura al medio día en los micrositios expuestos (40 °C; 11:00 y 14:00 h) comparados con los micrositios de sombra (38 °C; 14:00 h). En el caso de la temperatura del microambiente, en las mediciones matutinas (5:00 a 11:00 h), no se observan diferencias significativas entre micrositios expuestos y bajo sombra. En las mediciones al medio día (14:00 h) se observan diferencias significativas entre micrositios expuestos y bajo sombra, siendo los sitios bajo sombra los que presentan una mayor temperatura (33 °C) comparado con los sitios expuestos (35 °C).

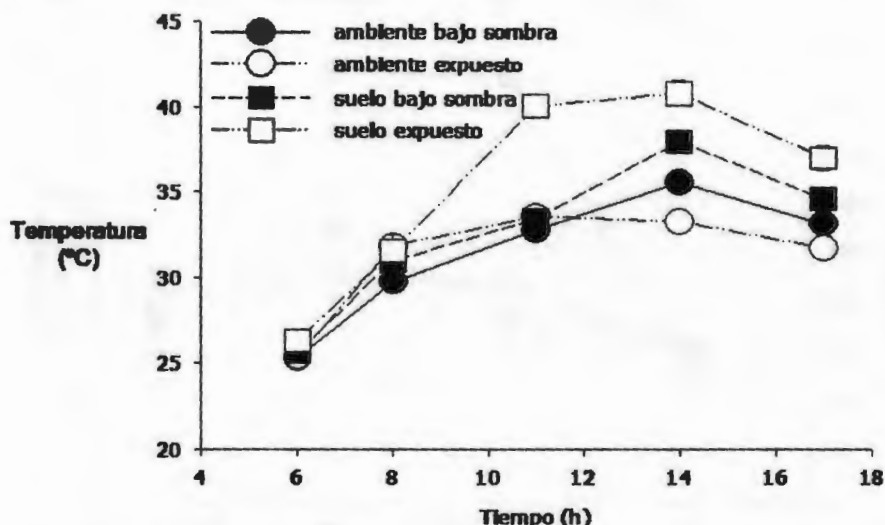


Figura 2.7. Temperaturas del ambiente y del suelo en los micrositios expuestos y bajo sombra, registradas durante un ciclo diurno en la temporada de lluvia. Los valores son medias $\pm$ EE, $n=6$ replicas por hora de medición.

b) Temporada de sequía

De la misma forma que en la temporada de lluvia, durante la temporada de sequía se registraron las mediciones de las condiciones microambientales para individuos expuestos y bajo sombra de *T. brachycaulos* y *B. karatas*, evaluándose el flujo de fotones para la

fotosíntesis (FFF, $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$), la temperatura de la planta ($^{\circ}\text{C}$), del suelo ($^{\circ}\text{C}$) y del ambiente ($^{\circ}\text{C}$), así como de los sitios abiertos. Las mediciones se realizaron cada tres horas, durante un ciclo diurno, tratando de llevar a cabo las salidas de campo durante la primera semana de cada mes. En la Figura 2.8 se presentan los datos ambientales para los sitios abiertos, cercanos a los microambientes que se trabajaron, en donde se observó que los valores del FFF total, de temperatura ambiental y del suelo, alcanzan su máximo valor entre las 11:00 y las 14:00 h. En cuanto a la temperatura del suelo y del ambiente no presentaron diferencias significativas; y comparando las horas de medición, únicamente la medición de la temperatura del ambiente y del suelo a las 14:00 h presentaron diferencias significativas, siendo mayor la temperatura del ambiente.

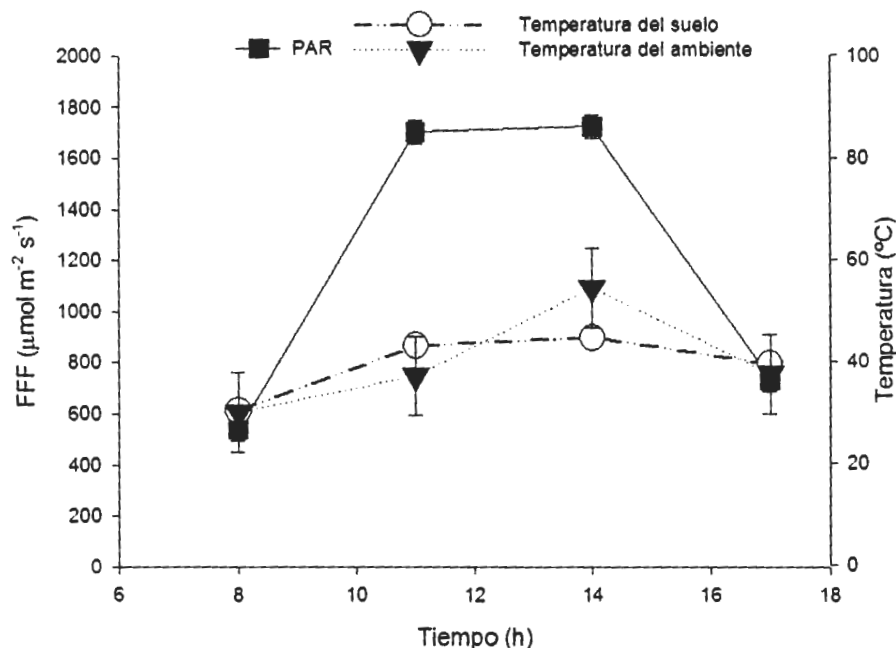


Figura 2.8. Cambios diurnos en el flujo de fotones para la fotosíntesis (FFF) incidentes temperatura ambiental y del suelo de sitios expuestos para un día representativo de la temporada de sequía (6 de mayo 2007). Los valores son medias $\pm$ EE, $n=6$ replicas por hora de medición.

En la figura 2.9 se presentan los resultados registrados de la temperatura (del suelo y del microambiente) y el porcentaje de FFF para los individuos expuestos y bajo sombra de *T. brachycaulos* durante la temporada de sequía. Se observaron diferencias significativas en la

temperatura del suelo entre sitios expuestos y bajo sombra y entre las horas de medición siendo el medio día cuando se presenta un aumento de temperatura. En cuanto a la temperatura del microambiente se observaron diferencias significativas entre las horas de medición (11:00 y las 14:00 h) y no se observaron diferencias significativas entre plantas expuestas y bajo sombra. Las mayores temperaturas se alcanzaron al medio día (11:00 y 14:00 h). En cuanto al porcentaje del FFF se observaron diferencias significativas entre los individuos expuestos (72%) y bajo sombra (18%; Figura 2.9B). Por otro lado, la temperatura de las hojas (Figura 2.9 C), no se observaron diferencias significativas entre las plantas expuestas y bajo sombra; y se observa un aumento de temperatura después del medio día, el cual está relacionado con el aumento en el FFF.

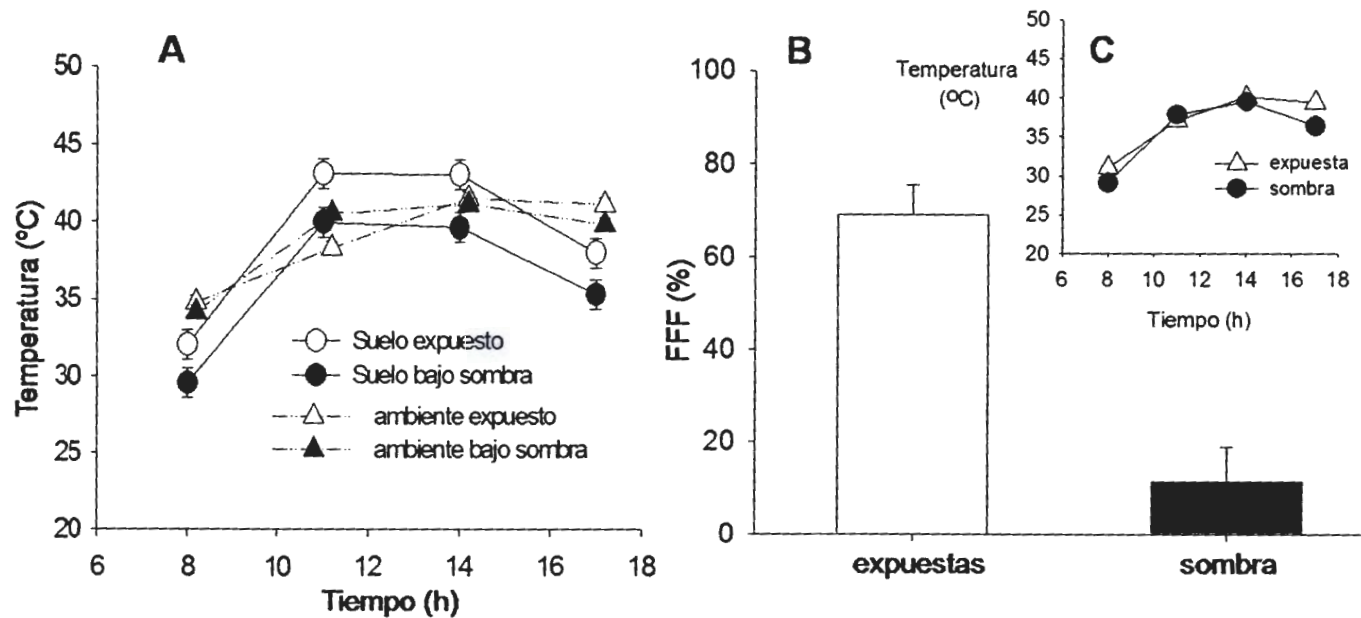


Figura 2.9. Caracterización de las condiciones microambientales de *T. brachycaulos* durante la temporada de sequía, de los micrositos de individuos expuestos y bajo sombra. **A**, temperatura del suelo y del ambiente de individuos expuestos y bajo sombra; **B**, Porcentaje de radiación (FFF) en las plantas expuestas y bajo sombra; y **C**, temperatura de la planta. Los valores son medias $\pm$ EE, $n = 3$ individuos.

En la figura 2.10 se presentan los resultados de las condiciones microambientales durante la temporada de sequía para *B. karatas*, en donde la temperatura del suelo presento diferencias significativas entre sitios expuestos y bajo sombra en la medición de las 14:00 h; por otro lado, en cuanto a la temperatura del microambiente no se observaron diferencias significativas entre plantas expuestas y bajo sombra, y únicamente en la medición de las 14:00 h se observan diferencias significativas. El microambiente expuesto presenta el máximo de temperatura alrededor del medio día cuando el FFF es más intenso (11:00 y 14:00 h; Figura 2.10 A). En cuanto al porcentaje de FFF se observan diferencias significativas entre las plantas expuestas (60%) y bajo sombra (40%; Figura 2.10B). En cuanto a la temperatura de las plantas (Figura 2.10C), no se observan diferencias significativas entre plantas expuestas y bajo sombra; y entre las horas de medición, únicamente en la medición de las 14:00 h se observan diferencias significativas entre los individuos expuestos y bajo sombra, que podría ser resultado de una baja capacidad de las plantas para disipar el calor.

En la tabla 2.1, se resume el FFF total y para cada microambiente para las plantas expuestas y bajo sombra de *T. brachycaulos* y *B. karatas* durante la temporada de lluvia y de sequía. Confirmando que las plantas expuestas de ambas especies recibieron mayor FFF durante la temporada de sequía que las plantas bajo sombra.

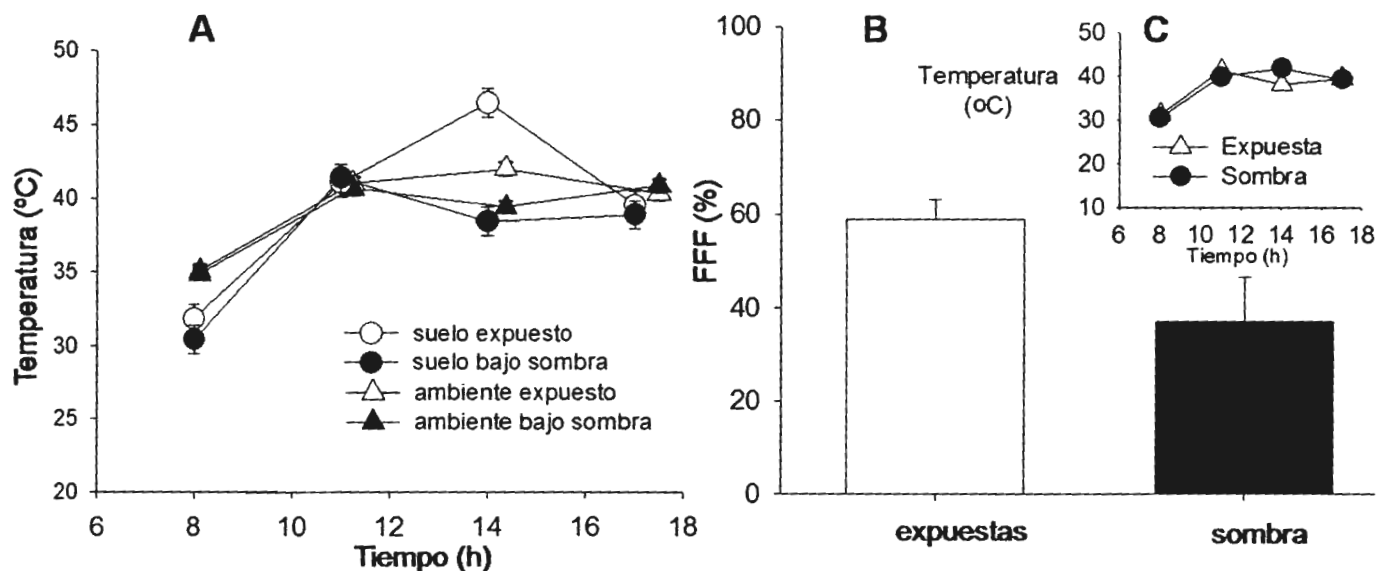


Figura 2.10. Caracterización de las condiciones microambientales de *B. karatas* durante la temporada de sequía. **A**, temperatura del suelo y del ambiente de individuos expuestos y bajo; **B**, Porcentaje de radiación en las plantas expuestas y bajo sombra; y **C**, temperatura en las hojas de individuos bajo sombra y expuestos. Los valores son medias $\pm$ EE, $n=3$ individuos.

Tabla 2.1. Variación del microambiente lumínico estacional de plantas expuestas y bajo sombra de *T. brachycaulos* y *B. karatas*. FFF, flujo de fotones para la fotosíntesis ($\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$).

Especie	Temporada	FFF ($\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$)	
		Expuesta	Sombra
<i>T. brachycaulos</i>	Lluvia	32.13 ± 4.82	2.32 ± 0.13
	Sequía	37.90 ± 2.04	15.22 ± 1.28
<i>B. karatas</i>	Lluvia	34.54 ± 5.45	3.35 ± 0.62
	Sequía	46.11 ± 2.47	33.01 ± 3.44
Total	Lluvia	Ambiente expuesto	47.289
	Sequía		44.071

3. Fluorescencia

a) Curvas de respuesta a la luz

En la Figura 2.11 se muestran los datos estacionales en cuanto a la eficiencia del uso de luz para individuos de *T. brachycaulos* aclimatados a la oscuridad (20 minutos). Durante la mitad de la temporada de lluvia (Figura 2.11A) tanto plantas expuesta como de sombra, presentan un valor alto en el punto de saturación a la luz ($\sim 800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) así como una mayor ETR ($\sim 30 \mu\text{equiv m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Por otra parte, durante la temporada de sequía (Fig. 2.11B, C y D) se observó que la tasa máxima de ETR disminuye ($\sim 18 \mu\text{equiv m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a una baja saturación lumínica (menos de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y no se observan diferencias significativas entre plantas expuestas y de sombra; un comportamiento similar ocurre al final de la temporada de lluvia (Figura 2.11E).

Para el caso de *B. karatas* (Figura 2.12), tanto las plantas expuestas como las de sombra durante la temporada de lluvia presentaron altos punto de saturación a la luz. A mitad de la temporada de lluvia (Figura 2.12A), las plantas presentaron un alto punto de saturación a la luz ($>1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), con una alta ETR ($\sim 120 \mu\text{equiv m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Asimismo, al inicio de la temporada de sequía (Figura 2.12B) se observó una disminución del punto de saturación a la luz y de la ETR ($800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $50 \mu\text{equiv m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente); conforme avanza la temporada de sequía la actividad fotosintética disminuye (ETR, Figura 2.12C), siendo más evidente al final de

la temporada de sequía (Figura 2.12D) con una disminución de la ETR ($50 \mu\text{equiv m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a baja radiación ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

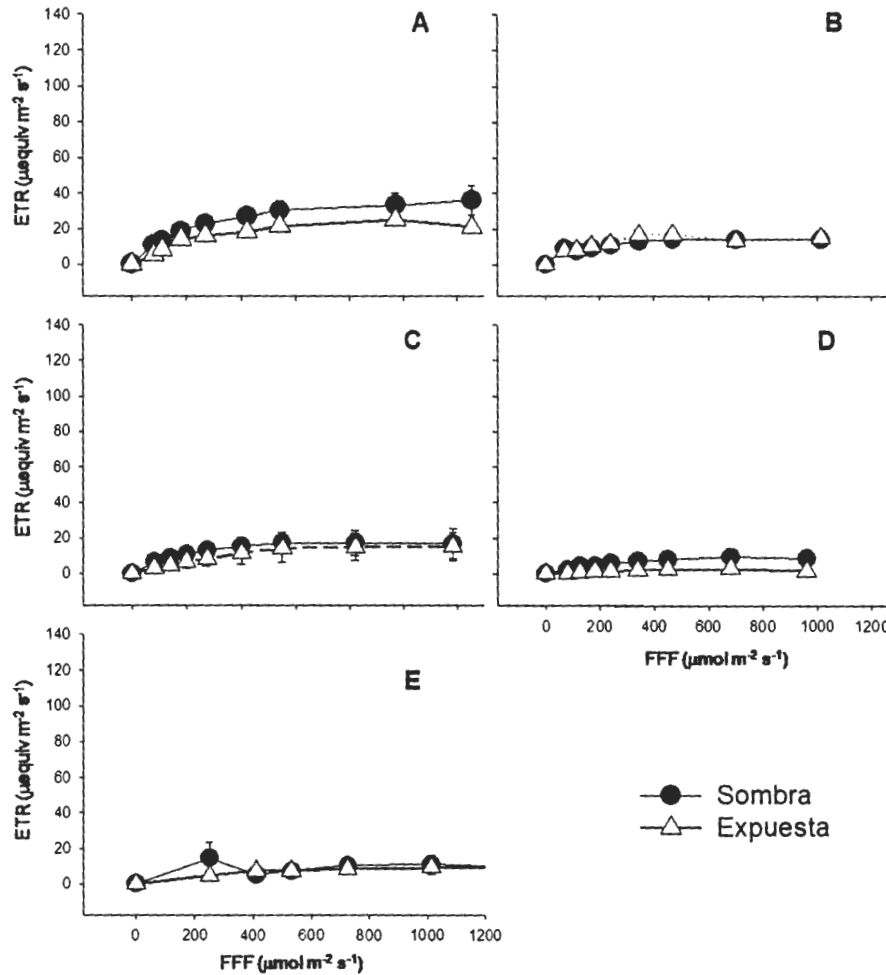


Figura 2.11. Curvas de respuesta a la luz de *T. brachycaulos* para individuos expuestos y bajo sombra. Las figuras muestran los valores de respuesta a la luz (FFF) y la ETR registradas al medio día para las diferentes temporadas. **A.** Mitad de la temporada de lluvias; **B,** inicio de la temporada de sequía; **C,** mitad de la temporada de sequía; **D,** final de la temporada de sequía y **E,** final de la temporada de lluvia. Los valores son medias $\pm$ EE, n = 3 plantas.

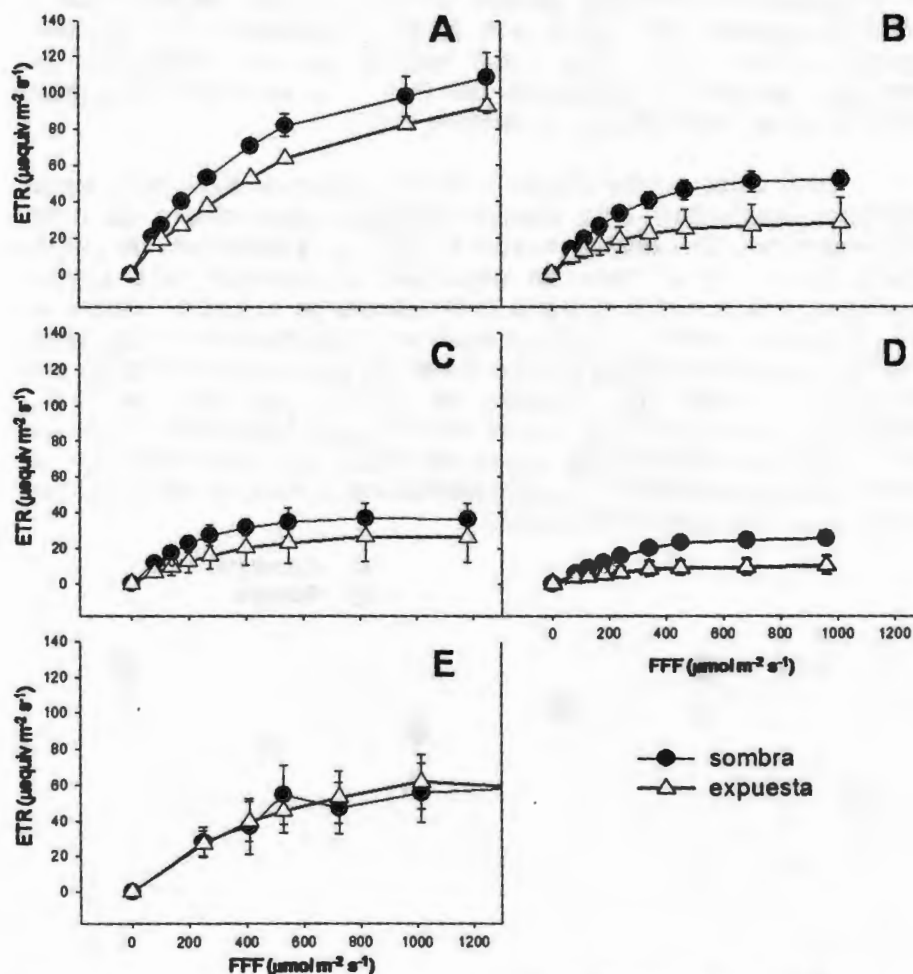


Figura 2.12. Curvas de respuesta a la luz de *B. karatas* para individuos expuestos y bajo sombra. Las figuras muestran los valores de respuesta a la luz (FFF) y la ETR registrados al medio día para las diferentes temporadas. A. Mitad de la temporada de lluvias; B, inicio de la temporada de sequía; C, mitad de la temporada de sequía; D, final de la temporada de sequía y E, final de la temporada de lluvia. Los valores son medias $\pm$ EE, $n=3$ plantas.

b) Fluorescencia máxima del PSII (F_v/F_m)

La fluorescencia o eficiencia máxima cuántica del PSII fue registrada al amanecer, cuando las plantas aun están aclimatadas a la oscuridad (prealba; $\Delta F/F_m = F_v/F_m$). Este índice muestra una clara correlación del porcentaje de centros funcionales del PSII y la actividad fotosintética (Anderson et al., 1997; Maxwell & Johnson, 2000).

En *T. brachycaulos* (Figura. 2.13), los valores de F_v/F_m presentaron diferencias significativas entre plantas expuestas y bajo sombra, así como entre estaciones. Únicamente durante el inicio de la temporada de sequía (marzo 2007) no se observan diferencias significativas entre plantas expuestas y bajo sombra. Durante la temporada de sequía el valor de F_v/F_m disminuyó, tanto en individuos expuestos como de sombra, sugiriendo fotoinhibición del fotosistema II (PSII) siendo las plantas de sombra las más susceptibles, puesto que muestran los valores más bajos de F_v/F_m . Finalmente, y aún cuando los valores de F_v/F_m para *T. brachycaulos* fueron bajos durante la temporada de sequía, los niveles de F_v/F_m observados en ambas especies no denotan un daño permanente al PSII, demostrando que las plantas presentan fotoinactivación.

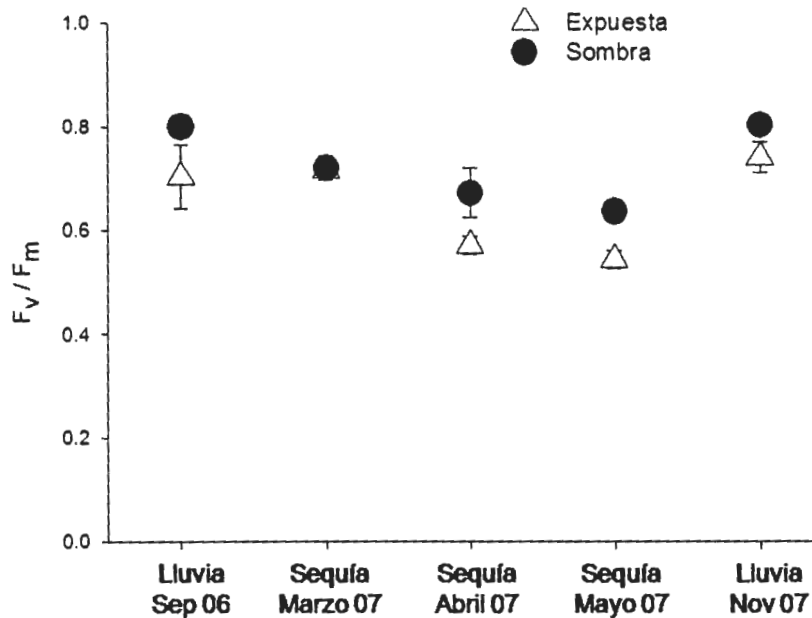


Figura 2.13. Fluorescencia máxima del fotosistema II (F_v/F_m) de *T. brachycaulos* para las plantas expuestas y bajo sombra de mediciones durante el amanecer. Los valores son medias $\pm$ EE, $n=3$.

En el caso de *B. karatas* (Figura 2.14), los valores de F_v/F_m no presentaron diferencias significativas estacionales y entre plantas expuestas y bajo sombra. Los valores de F_v/F_m fueron altos (plantas expuestas, ~ 0.8 ; plantas bajo sombra, ~ 0.75), reflejando que los centros funcionales del PSII no se encuentran dañados.

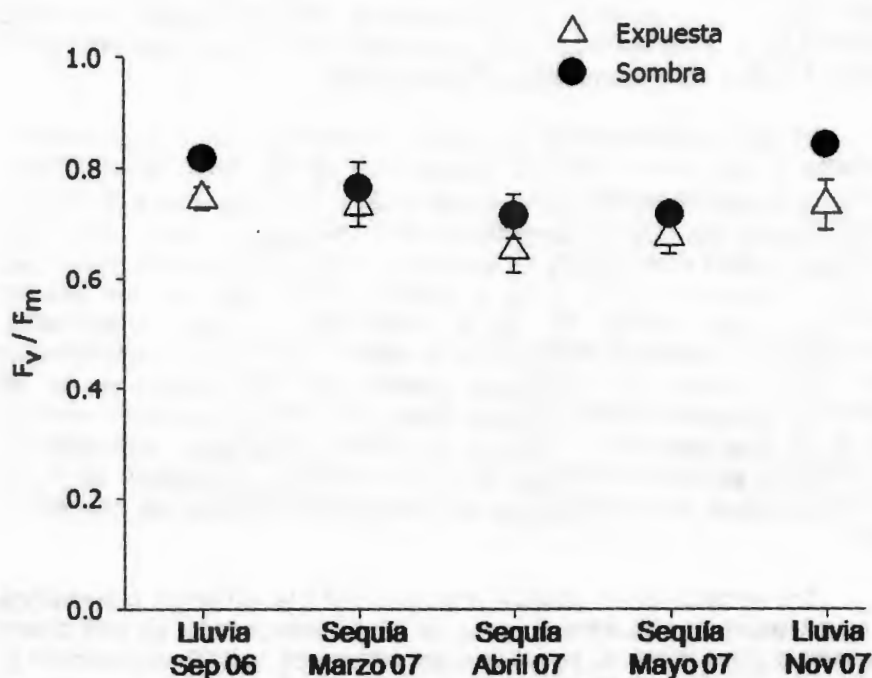


Figura 2.14. Fluorescencia máxima del fotosistema II (F_v/F_m) de *B. karatas* para las plantas expuestas y bajo sombra de mediciones durante el amanecer. Los valores son medias $\pm$ EE, $n=3$.

c) Parámetros relacionados con fluorescencia de la clorofila

Con el fin de determinar el efecto de la alta radiación sobre la capacidad fotosintética de plantas expuestas y bajo sombra de *T. brachycaulos* (Figura 2.15) y *B. karatas* (Figura 2.16), durante las temporadas de lluvia y de sequía, se evaluaron los cambios estacionales y diurnos de los parámetros de la fluorescencia de la clorofila: tasa de transporte de electrones (ETR), el flujo de fotones para la fotosíntesis (FFF), la disipación no fotoquímica (NPQ), la temperatura de la planta y el rendimiento efectivo del PSII (Φ PSII).

El efecto estacional de la alta radiación se ve reflejado en los parámetros de fluorescencia. Como se había observado en las curvas de luz, los valores de ETR en *T. brachycaulos* son bajos durante las temporadas de lluvia y sequía. Se observó que el ETR aumenta en un ciclo diurno (Figura 2.15B), principalmente durante la temporada de sequía indicando mayor actividad fotosintética durante la hora de mayor radiación (Figura 2.15B) y mayor temperatura (Figura 2.15D). Para *B. karatas*, los valores de la ETR son altos, y no se observan diferencias entre estaciones (Figura 2.16A). Esta actividad está relacionada con el aumento en el FFF (Figura 2.16B) y de la temperatura (Figura 2.16D).

Durante la temporada de sequía, a pesar de que *T. brachycaulos* mantiene funcional la actividad fotosintética (ETR), tanto NPQ (Figura 2.15C) como Φ PSII disminuyen (Figura 2.15E). La regulación a la baja de Φ PSII debería significar el aumento de NPQ (Nogués & Baker, 2000). Sin embargo, el NPQ para plantas de sombra se mantiene constantemente bajo durante la temporada de lluvia y sequía; en el caso de las plantas expuestas, los valores de NPQ presentan cambios estacionales, disminuyendo durante la temporada de sequía. Tanto en *T. brachycaulos* como en *B. karatas*, el rendimiento cuántico del PSII (Φ PSII) es alto al amanecer. Durante la temporada de lluvia, y al inicio de la temporada de sequía, al final del día los valores de Φ PSII aumentaron, demostrando recuperación en la funcionalidad del PSII. Durante la temporada de lluvia, también se observa una recuperación funcional al aumentar los valores de Φ PSII.

En el caso de *B. karatas* (Figura 2.16A) la actividad fotosintética (ETR) presenta valores altos, y como se había mencionado, es una planta adaptada a sitios abiertos, por lo que los valores de la ETR aumentaron al medio día y el Φ PSII disminuye al aumentar el FFF. Los valores de NPQ son bajos entre estaciones, excepto al final de la temporada de sequía (mayo07), donde se observó un aumento de la NPQ, que podría estar relacionado con una disminución del Φ PSII.

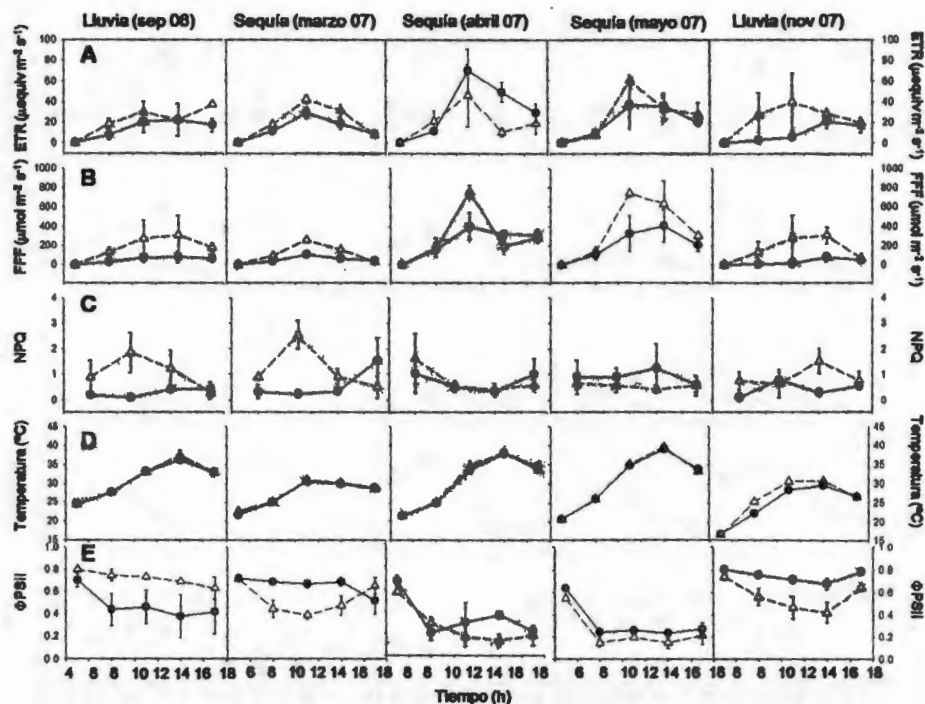


Figura 2.15. Parámetros de fluorescencia de la clorofila de *T. brachycaulos*. En la figura se muestran los patrones estacionales de: **A)** tasa de transporte de electrones (ETR), **B)** Flujo de fotones para la fotosíntesis (FFF), **C)** disipación no fotoquímica (NPQ), **D)** temperatura de la hoja, **E)** rendimiento cuántico del fotosistema II (ΦPSII). Los valores son medias $\pm$ EE, $n=3$. Los símbolos representan plantas expuestas (Δ) y bajo sombra ($\bullet$).

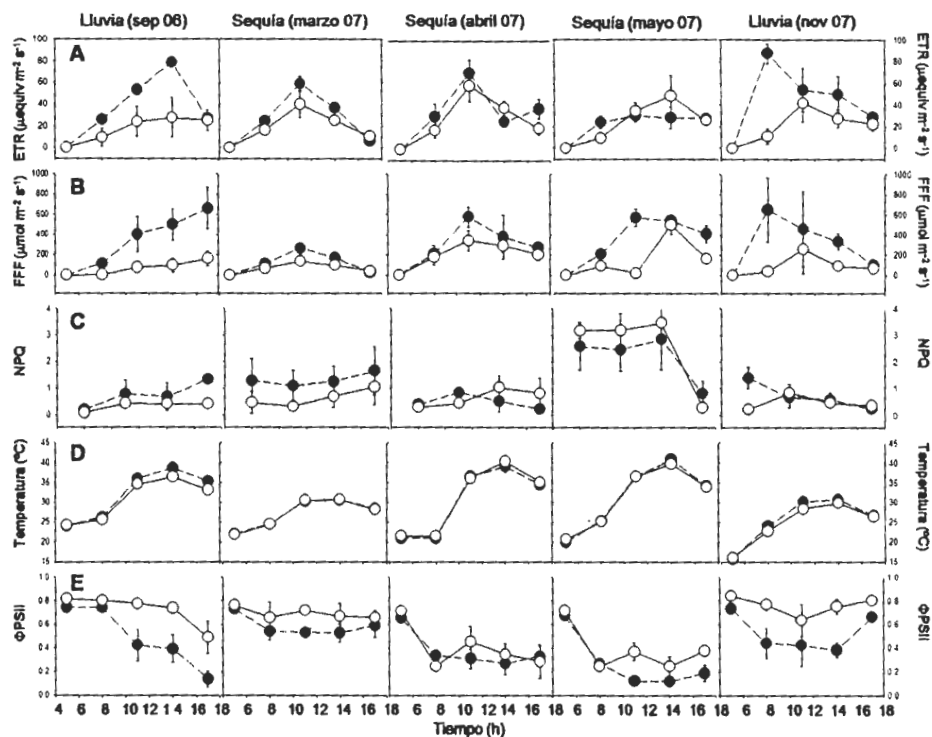


Figura 2.16. Parámetros de fluorescencia de la clorofila de *B. karatas*. En la figura se muestran los patrones estacionales de a) tasa de transporte de electrones (ETR), b) flujo de fotones para la fotosíntesis (FFF), c) eficiencia no fotoquímica (NPQ), d) temperatura de la hoja, e) rendimiento cuántico del fotosistema II (ΦPSII). Los valores son medias $\pm$ EE, n=3. Los símbolos representan plantas expuestas (Δ) y bajo sombra ($\bullet$).

4. Potencial hídrico (Ψ)

Las plantas expuestas y bajo sombra de *T. brachycaulos* presentan bajo potencial hídrico durante la temporada de sequía (Figura 2.17), y no se observan diferencias significativas entre las plantas colectadas al amanecer y al medio día. Sin embargo, durante la mitad de la temporada de sequía (abril, 2007) se observan diferencias de potencial hídrico entre plantas expuestas y bajo sombra y entre la hora de medición, observándose mayor déficit hídrico (-2.3 MPa) en las mediciones del medio día de las plantas bajo sombra.

En el estatus hídrico de las hojas de *B. karatas* no se observaron diferencias estacionales de potencial hídrico (Figura 2.18), entre plantas expuestas y bajo sombra, y entre las horas de medición. Los valores de potencial hídrico tanto para la temporada de sequía como de lluvia presentan valores intermedios de potencial hídrico (entre -1 y -1.7 MPa).

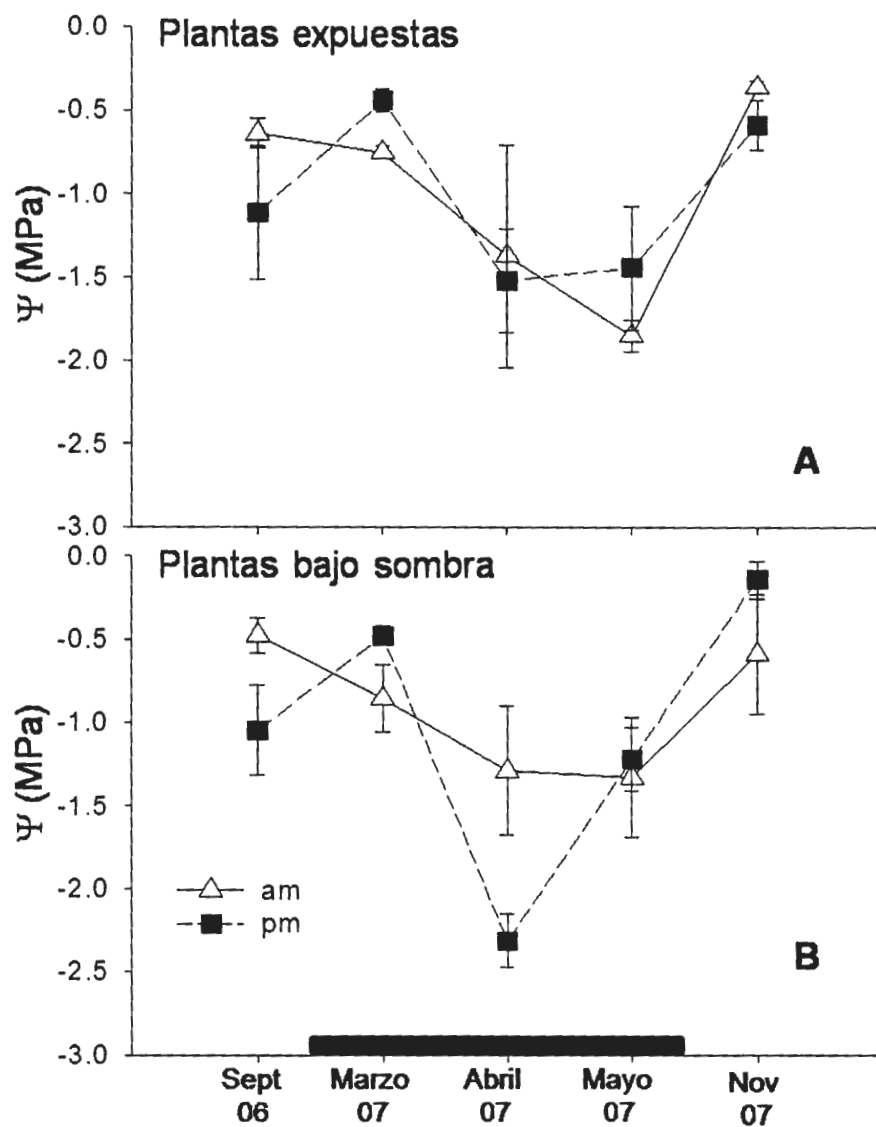


Figura 2.17. Potencial hídrico al amanecer y al medio día, para los plantas expuestas (A) y bajo sombra (B) de *T. brachycaulos*. Los valores son medias $\pm$ EE, $n=3-6$. La línea negra representa la temporada de sequía.

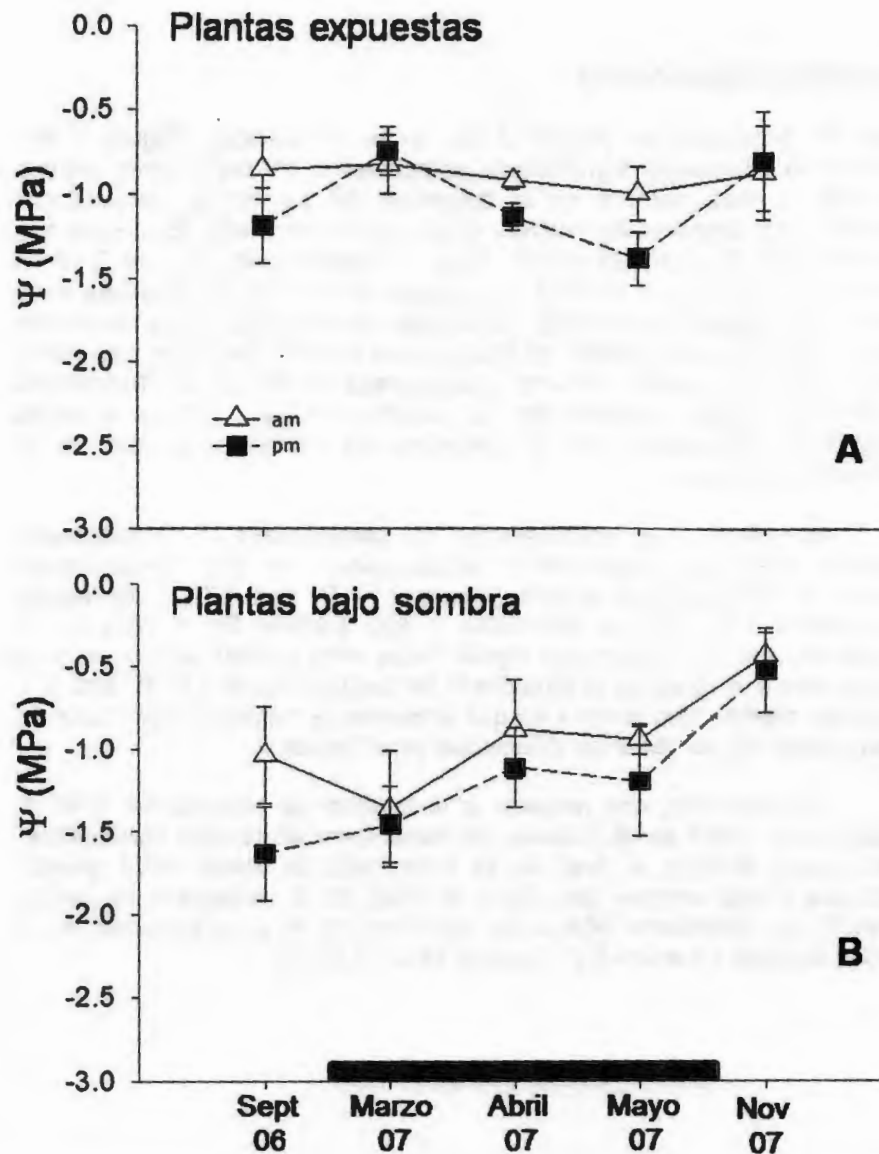


Figura 2.18. Potencial hídrico en la mañana y al medio día, para las plantas bajo sombra (A) y expuestas (B) de *B. karatas*. Los valores son medias $\pm$ EE, $n=3-6$. La línea negra representa la temporada de sequía.

5. Pigmentos fotosintéticos

Tanto *T. brachycaulos* (Figura 2.19) como *B. karatas* (Figura 2.20), presentaron diferencias significativas estacionales, así como entre plantas expuestas y bajo sombra en el contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila total, carotenoides totales y la relación clorofila a/b). En cuanto a la concentración de clorofilas totales tanto *T. brachycaulos* (Figura 2.19 A) como *B. karatas* (Figura 2.20 A) presentaron diferencias significativas entre plantas expuestas y bajo sombra, mostrando una respuesta típica de plantas de sol y de sombra, en donde las plantas bajo sombra presentan una mayor concentración de clorofila. Durante la temporada de sequía, se observó una disminución de la concentración de clorofilas totales. Ambas especies presentaron disminución en el contenido de clorofilas al final de la temporada de sequía.

En cuanto a la concentración de carotenoides, *T. brachycaulos* presentó diferencias significativas estacionales, con alta concentración durante la temporada de sequía (Figura 2.19 B, abril 07), y diferencias significativas entre plantas expuestas y bajo sombra. En el caso de *B. karatas* se observan diferencias significativas entre plantas expuestas y de sombra solo a la mitad de la temporada de sequía (Figura 2.20 B, abril 07), siendo las plantas bajo sombra las que presentan la mayor concentración de carotenoides. No se observan diferencias estacionales.

Por otro lado, con respecto a la relación de clorofila a:b tanto *T. brachycaulos* como en *B. karatas*, no presentaron diferencias significativas estacionales, aunque al final de la temporada de lluvia, entre plantas expuestas y bajo sombra (sep 06) y la mitad de la temporada de sequía (mayo07) se observaron diferencias significativas; el valor promedio de la relación clorofila a:b es de 2.2 (Figura 2.19 C y 2.20 C).

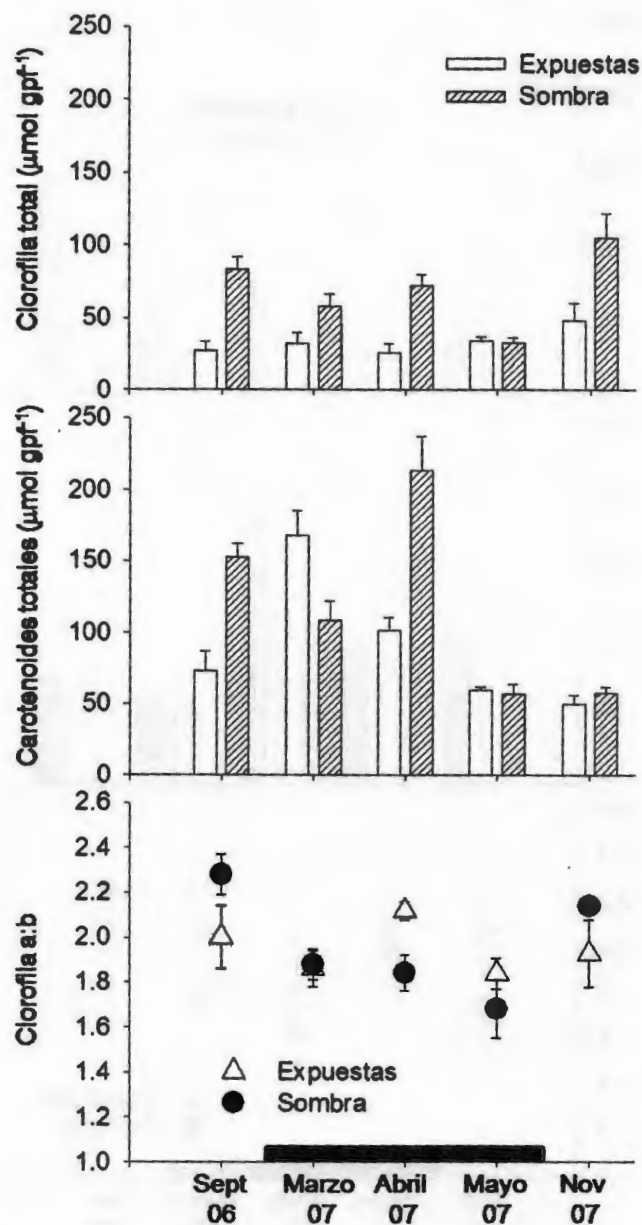


Figura 2.19. Cuantificación estacional de los pigmentos fotosintéticos de plantas expuestas y bajo sombra de *T. brachycaulos*. $n= 3-6$ individuos $\pm$ EE. La línea negra representa la temporada de sequía.

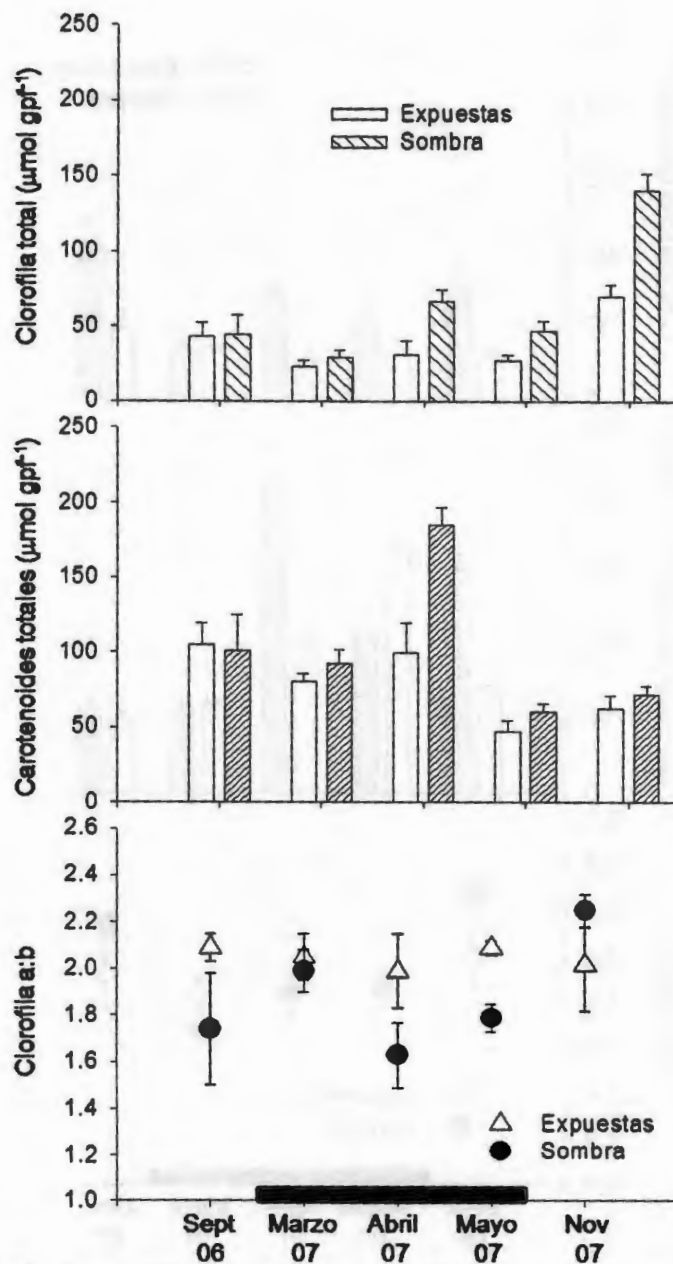


Figura 2.20. Cuantificación estacional de los pigmentos fotosintéticos de plantas expuestas y bajo sombra de *B. karatas*. $n = 3-6$ individuos $\pm$ EE. La línea negra representa la temporada de sequía.

6. Variación del contenido de ácidos orgánicos (ΔH^+)

La determinación de la acidez del tejido es una medida indirecta de la asimilación nocturna de CO_2 , incluyendo la asimilación directa y el CO_2 producido durante la respiración y la re-asimilación. Por lo tanto, un incremento en la acidez del tejido indica un incremento de la asimilación de CO_2 (Nobel, 1991; Osmond et al., 1994). De esta forma, la variación en el contenido de ácidos orgánicos titulables refleja la acumulación nocturna y el consumo diurno de ácido málico para sintetizar carbohidratos.

Las plantas de *T. brachycaulos* (Figura 2.21), presentaron valores bajos de ΔH^+ comparado con los altos valores de *B. karatas* (Figura 2.22). *T. brachycaulos*, presentó diferencias significativas estacionales, siendo la temporada de mayor sequía (mayo) cuando se observó una disminución considerable de los ácidos orgánicos ($17 \text{ mmol H}^+ \text{ m}^{-2}$), recuperándose durante la temporada de lluvia ($82 \text{ mmol H}^+ \text{ m}^{-2}$); no se observaron diferencias significativas entre las plantas expuestas y bajo sombra.

En el caso de *B. karatas* (Figura 2.22), se observó un alto contenido de ácidos orgánicos, típicos de bromeliáceas terrestres (Martin, 1994). Se observaron diferencias significativas entre plantas expuestas y bajo sombra, así como entre estaciones; las plantas bajo sombra presentaron los valores más bajos. La mayor disminución de ΔH^+ se observó durante la temporada de sequía, cuando las plantas se encuentran bajo condiciones de mayor FFF (marzo y abril 07). Por otro lado, en el mes de mayo, cuando las condiciones de sequía son más intensas, se observa un aumento considerable de ΔH^+ , que coincide con un registro de precipitación (ver diagrama ombrotérmico, Figura 2.2).

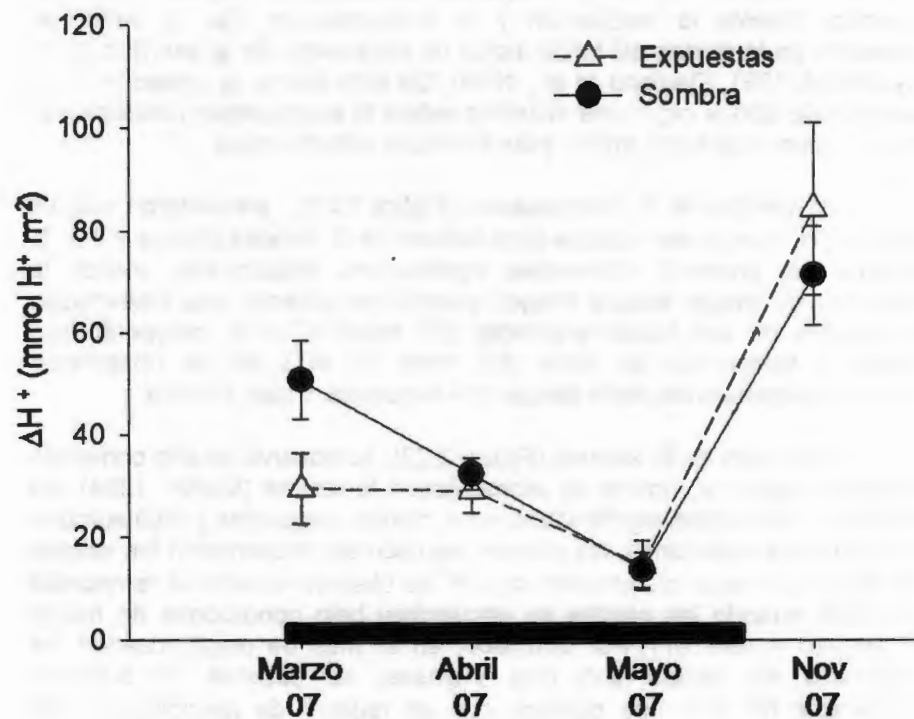


Figura 2.21. Acidez titulable estacional de *T. brachycaulos* de plantas expuestas y bajo sombra. Los valores son medias $\pm$ EE, $n=3-6$ individuos por especie por condición de luz. La línea negra representa la temporada de sequía.

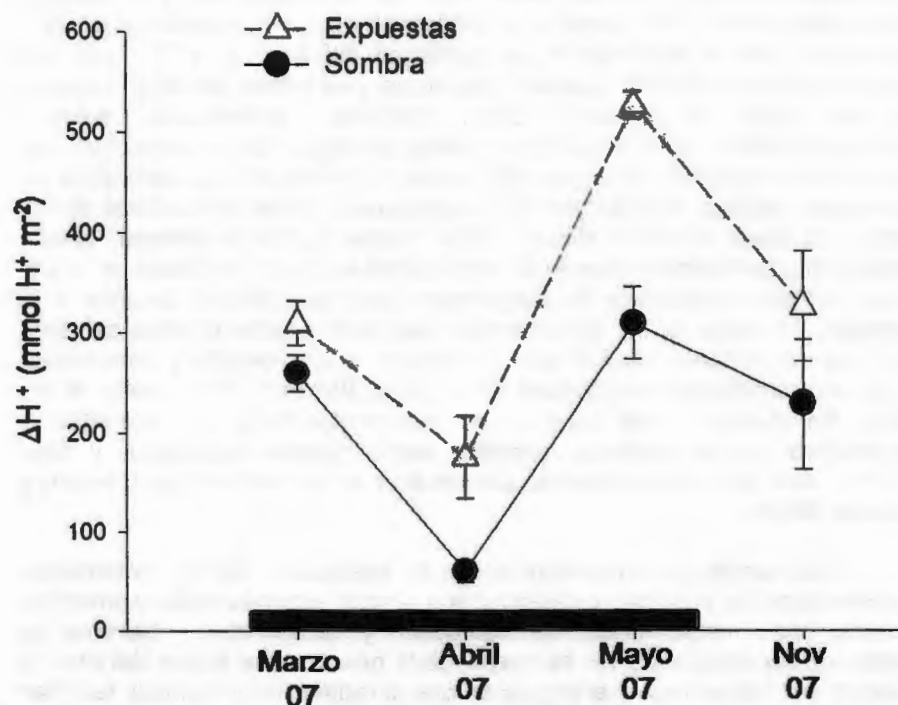


Figura 2.22. Acidez titulable estacional de *B. karatas* de plantas expuestas y bajo sombra. Los valores son medias $\pm$ EE, $n=3-6$ individuos por especie por condición de luz. La línea negra representa la temporada de sequía.

DISCUSIÓN

La selva baja caducifolia de Dzibilchaltún presenta un tipo de vegetación clasificado como selva baja caducifolia. En este sentido, durante la temporada de sequía, la precipitación disminuye o es casi nula y se observa un aumento en el DPV, durante la temporada de lluvia, disminuye el DPV ocasionado por el aumento en la humedad del aire, y la FFF por día aumenta debido a que los días son más largos y se presentan más horas luz en los días despejados. Estos cambios ambientales influyen significativamente sobre el comportamiento fisiológico de las especies. Las variaciones ambientales estacionales, aunado a la naturaleza caducifolia de los árboles vecinos, pueden cambiar dramáticamente las condiciones de luz dentro del dosel (Zotz & Winter, 1994; Nobel & De la Barrera, 2004), creando microambientes altamente modificados en donde, además de la luz, se alteran las condiciones de temperatura, la disponibilidad de agua y la humedad del suelo; y así la capacidad para aclimatare a estos cambios puede ser importante para el establecimiento, supervivencia y crecimiento de algunas bromeliáceas (Maxwell et al., 1995; Benzing, 2000; Bader et al., 2009). En cuanto a las condiciones microambientales de humedad y temperatura no se observan cambios entre plantas expuestas y bajo sombra, pero si entre estaciones, confirmando lo encontrado por Graham y Andrade (2004).

Los resultados obtenidos sobre la evaluación de los parámetros microambientales permiten establecer que ambas especies están sometidas a variaciones estacionales de radiación y temperatura. Durante la temporada de sequía el FFF es mayor dado que en esta época del año, la variación del fotoperíodo y el ángulo en que la radiación es recibida, resultan en un aumento de radiación sobre el dosel debido a la reducción en la cobertura de nubes (Figura 2.3; Théry, 2001). Por lo tanto se observa un incremento importante en la temperatura de las plantas, en el suelo y del ambiente. Adicionalmente, durante la temporada de sequía las plantas de sombra de *T. brachycaulos* y de *B. karatas* reciben de 30% a 40% más radiación que durante la temporada de lluvia, debido a la naturaleza caducifolia de las especies vecinas (Tabla 2.1).

Durante la temporada de lluvia, el FFF (Figura 2.5 y 2.6) sobre las plantas expuestas y bajo sombra, reflejan las condiciones lumínicas en el microambiente para ambas especies, en donde se observó que la cantidad de FFF para ambas condiciones disminuyó. Por otra parte, la temperatura de las plantas aumenta al medio día, como resultado de un incremento en la radiación. En *T. brachycaulos* las hojas de los individuos bajo sombra presentan una mayor temperatura que los expuestos, posiblemente porque no tienen la capacidad de disipar el exceso de calor de su microambiente,

originado por el aumento de las temperaturas tanto ambiental como del suelo (Fig. 2.5; Cervantes et al., 2005). *T. brachycaulos*, muestra estratificación vertical y puede ocurrir desde pocos centímetros sobre el suelo hasta la punta de los árboles hospederos (Mondragón et al., 1999) y como consecuencia de su naturaleza epifita y por depender de un forofito para desarrollarse, el FFF recibido en el microambiente de sombra fue mayor durante la temporada de sequía que durante la temporada de lluvia. Durante la temporada de lluvia los árboles hospederos han recuperado su follaje, por lo tanto se observan diferencias en el FFF entre individuos expuestos (63% en lluvia; 70% en sequía) y bajo sombra (10% en lluvia; 20% en sequía).

En el caso de *B. karatas*, por su hábito preferentemente terrestre, el FFF sobre los individuos expuestos es muy similar al FFF total de los sitios abiertos tanto para la temporada lluvia como de sequía, siendo las plantas de sombra, las que presentaron diferencias significativas de FFF entre temporadas (individuos expuestos: 80% en lluvia; 60 % en sequía; y bajo sombra: 18% en lluvia; 40% en sequía). Durante la temporada de lluvia los individuos expuestos registraron una alta temperatura tanto de sus hojas como en su microambiente (Figura 2.7), reflejando su hábito de crecimiento bajo condiciones de alta radiación.

Por otro lado, en cuanto a la actividad fotosintética de las plantas aclimatadas a la obscuridad de ambas especies, cuando se aplican diferentes intensidades de luz, esta actividad disminuye considerablemente, principalmente bajo condiciones de sequía, observándose una recuperación durante la temporada de lluvia cuando las condiciones ambientales son más favorables. En *T. brachycaulos* durante la temporada de sequía las curvas de saturación a luz se expresan muy bajos niveles de FFF con una disminución en ETR, incrementando durante la temporada de lluvia. Lo anterior indica que los fotosistemas de *T. brachycaulos* no llegan a dañarse, presentando un eficiente ETR, y bajo condiciones favorables pueden incrementar su eficiencia en el uso de luz para la fotosíntesis. Tomando en cuenta que tanto las plantas tanto expuestas como de sombra de *T. brachycaulos* responden a baja saturación de luz, puede afirmarse que en términos de adaptación, *T. brachycaulos* presenta características típicas de plantas de sombra. Sin embargo, es importante mencionar que las plantas epifitas pueden encontrarse desde los sitios expuestos en lo alto del dosel, con un ambiente de alto FFF, hasta en las partes bajas del árbol hospedero con un exceso de sombra (Cervantes et al., 2005; Andrade et al., 2004). De esta forma, la adaptación está determinada por el genotipo y resulta de la adaptación genética al ambiente lumínico prevaleciente en el hábitat.

En el caso de *B. karatas*, presentó alta actividad fotosintética, reflejado por un alto punto de saturación a la luz, demostrando su alta capacidad de adaptación a sitios expuestos, al continuar con su actividad fotosintética aun en condiciones de alta radiación. Aunque, a medida que avanza la temporada de sequía, presentó una disminución de la actividad fotosintética (Figura 2.12), confirmando que la actividad fotosintética no solo depende de la intensidad lumínica, sino también de la disponibilidad de agua. Los resultados muestran que *B. karatas* puede recuperar su actividad fotosintética (Fig. 2.12E) cuando las condiciones hídricas son favorables.

Ambas especies, durante las temporadas de lluvia y de sequía, presentan altos valores de ETR, lo que parece ser una respuesta relacionada con las propiedades ópticas de las hojas. Sin embargo, y aunque aparentemente las hojas de plantas expuestas y de sombra tienen propiedades ópticas similares, las hojas de plantas de sombra son más eficientes que las expuestas para absorber la luz para fotosíntesis (Lee & Graham 1986; Lee et al. 1990). De esta forma, la adaptación bajo sombra está relacionada con la eficiencia del uso de la energía lumínica disponible. Por lo tanto, las plantas de sombra utilizan una mayor proporción de su capacidad fotosintética en la síntesis y mantenimiento de la maquinaria fotosintética, que las plantas expuestas.

En cuanto a la eficiencia cuántica del PSII (F_v/F_m), la disminución de F_v/F_m en función de la luz, usualmente es un indicador de la alteración en el aparato fotosintético, a nivel de su conversión cuántica y transporte de electrones (Lichtenthaler & Burkart, 1999), dando como resultado una disminución de la actividad fotosintética de la planta. En varios grupos de plantas, cuando son aclimatadas a alta radiación, la tendencia general es una disminución de la actividad fotosintética (Porter, 2000). Dicha disminución en los valores de F_v/F_m se debe probablemente a procesos de protección de disipación calorífica (Porter, 2000). Esta tendencia se mantuvo en plantas expuestas de *T. brachycaulos* en donde los valores de F_v/F_m fueron inferiores a 0.8, indicando la preferencia de *T. brachycaulos* por los ambientes sombreados.

A pesar de que *T. brachycaulos* es una bromeliácea mejor adaptada a sitios de sombra, también la podemos encontrar en sitios expuestos, en donde las condiciones lumínicas son más intensas, en este caso presentó baja capacidad de fotoprotección, ocasionada por la baja capacidad de disipar el exceso de energía de excitación (Demming-Adams & Adams, 1996). A largo plazo, se puede presentar fotoinhibición del PSII, determinada por la progresiva disminución de F_v/F_m durante la temporada de sequía, aunque los niveles de F_v/F_m observados en ambas especies no denotan un daño permanente al PSII. En este sentido, *T. brachycaulos*

presentó fotoinactivación del fotosistema II (F_v/F_m), este parámetro previene el transporte de electrones hacia el oxígeno, evitando daño oxidativo. Por lo anterior, la fotoinactivación puede actuar como un dispositivo de seguridad, protegiendo a todo el sistema de daño generalizado (e.g. *Guzmania monostachia*, Maxwell et al. 1992; *Clusia uvitana*, Zotz and Winter 1994; Nielsen and Orcutt, 1996). Graham & Andrade (2004), sugieren que los individuos de *T. brachycaulos* bajo condiciones de alto FFF presentan daño a largo plazo, como consecuencia del daño fotooxidativo que ocurre cuando disminuye la fijación de CO_2 ; sin embargo, esta reducción no es ocasionada por alta radiación, ya que F_v/F_m puede recuperarse durante la temporada de lluvia (~0.8), como consecuencia de los mecanismos regulatorios que protegen a los componentes del PSII. Por lo tanto, no se debiera atribuir un daño importante del aparato fotosintético y la disminución de F_v/F_m estaría dentro de los rangos normales de supervivencia de la especie en su hábitat natural (Xiong et al., 2000). En el caso de *B. karatas*, los valores de F_v/F_m (0.7 y 0.8) indican que los centros funcionales del PSII no se encuentran dañados, por lo tanto no presentan fotoinhibición. Confirmando lo encontrado en otras especies de bromeliáceas terrestres bajo alta radiación (e.g. *Aechmea magdalénæ*; Pfitsch & Smith 1988; Königer et al., 1995; Skillman & Winter, 1997), tienen la capacidad de incrementar la concentración de pigmentos del ciclo de las xantofilas, presentando valores altos de F_v/F_m (0.8), evitando fotoinhibición (Königer et al., 1995).

Durante la temporada de sequía, *T. brachycaulos* presenta un aumento en ETR y *B. karatas* no presenta cambios estacionales. Esta respuesta está relacionada con el hecho de que ambas especies son CAM, y *B. karatas* es una especie fuertemente CAM; por consiguiente ambas especies cuentan con reservas de CO_2 que les permiten conservar altas tasas de transporte de electrones, y su respuesta fotosintética es dependiente de la magnitud del flujo de fotones, así como de la hora del día en que la radiación es recibida, lo que influye en la capacidad de la planta para generar CO_2 endógeno (Griffiths et al., 1986, Maxwell et al., 1995).

En el caso de *T. brachycaulos*, a pesar de tener la capacidad de mantener la actividad fotosintética, relacionada con ETR, durante la temporada de sequía, la actividad tanto de NPQ (Figura 2.15c) como del rendimiento cuántico del PSII (ΦPSII ; Figura 2.15e) disminuyen. La regulación a la baja de ΦPSII debería significar el aumento de NPQ (Nogués & Baker, 2000), sin embargo, el NPQ, se mantiene constantemente bajo en las plantas de sombra durante ambas temporadas; en el caso de las plantas expuestas, los valores de NPQ presentan cambios estacionales disminuyendo durante la sequía, indicando que los fotosistemas son rápidamente saturados debido a que la radiación excede la capacidad de las plantas para disipar el calor. Lo anterior se ve reflejado en ΦPSII , en donde

un aumento de ETR, asociado a un aumento de radiación, da como resultado un proceso de inactivación de Φ PSII y, por lo tanto, NPQ y Φ PSII se mantienen bajos durante el día, ayudando a disminuir el daño oxidativo. Las plantas expuestas de *T. brachycaulos* absorben mucho más energía de la que puede usar, así cuando las plantas no pueden dispersar de forma segura la energía excedente, entonces la clorofila pasa a un estado de sobreexcitación, presentándose fotoinactivación.

En ambas especies, los valores al amanecer del Φ PSII son altos, indicando que los fotosistemas se encuentran abiertos, saturándose a lo largo del día, produciéndose disipación fotoquímica (fluorescencia) y no fotoquímica (calor y ciclo de las xantofilas). En el caso de la temporada de lluvia, y al inicio de la temporada de sequía, durante un ciclo diurno los valores de Φ PSII se recuperaron al finalizar el día, indicando que no se produjo daño permanente del aparato fotosintético. Finalmente, durante la temporada de lluvia los valores de Φ PSII indican que el aparato fotosintético se encuentra en un estado relajado. Para *B. karatas*, se observó alta eficiencia del PSII y valores altos de F_v/F_m que están relacionados con la capacidad de estas plantas para adaptarse a los sitios abiertos. De esta forma, los procesos fotoquímicos a nivel del PSII han demostrado ser más sensibles durante la temporada de sequía; bajo esta situación la capacidad fotosintética puede verse afectada principalmente por una disminución en el número total de los centros del PSII en estado funcional y por cambios en la eficiencia de los centros funcionales (Φ PSII). La disminución del número de centros funcionales está relacionado con la integridad de la maquinaria fotosintética, por lo que, bajo condiciones de estrés hídrico severo, el PSII podría dañarse permanentemente.

Por otro lado, la temporada de sequía en el sitio de estudio es regular y prolongada alcanzándose, en ocasiones, los 30 días de sequía. El estado hídrico en las hojas de plantas expuestas y de sombra de *T. brachycaulos* presentaron variación estacional (Figura 2.17), siendo la temporada de sequía cuando se presenta el mayor déficit hídrico. *T. brachycaulos* crece en un ambiente epífita sometido a constante estrés hídrico y expuestas a la acción de los vientos (Andrade et al., 2004); presentando diferencias de potencial hídrico entre temporadas, con bajo potencial hídrico en las plantas de sombra. Estas diferencias podrían ser atribuidas al hecho de que para la familia Bromeliaceae, las fuentes de agua como el rocío y la niebla son muy importantes, ya que estas plantas absorben agua a través de los tricomas, acumulan ácido málico durante la noche (CAM) y disminuyen el potencial osmótico foliar, con lo que aumentan su capacidad de absorción del rocío (Andrade, 2003; Graham & Andrade, 2004). Las plantas bajo sombra son más susceptibles de estrés hídrico, ya que el rocío podría no estar disponible, debido a la intervención en la colecta

del rocío por las ramas de los árboles hospederos. La recuperación del potencial hídrico durante la temporada de lluvia, se debe a que el agua llega al sustrato de *T. brachycaulos* directamente de la lluvia o por escurrimiento a través de las ramas y troncos; en algunas epífitas se ha observado que la ganancia de agua ocurre porque las raíces pueden crecer dentro de paquetes de suelo acumulado en el tronco o directamente sobre la corteza del mismo (Andrade et al., 2004).

En las hojas de bromeliáceas terrestres no se tienen registros de la presencia de tricomas de absorción (Reyes-García & Griffiths, 2009), y por lo tanto el agua de rocío no es una opción de fuente de agua para *B. karatas*; esta bromeliácea no presenta diferencias estacionales de potencial hídrico, que podría explicarse por la capacidad de la planta para acumular agua en los tejidos o a su hábito de crecimiento terrestre, ya que posee raíces de absorción que le permite tener acceso a otras fuentes de agua, como en algunas plantas CAM que pueden presentar ascenso hidráulico® (e.g. *Yucca schidigera*, Yoder y Nowak, 1999). Reyes-García & Griffiths (2009) sugieren que es necesario el estudio de los cambios estacionales en el sistema de raíces para *B. karatas*, así como un análisis de cómo los interpsos de lluvia en la temporada de sequía son lo suficientemente intensos para infiltrarse en el suelo y de esta forma activar la asimilación de agua por las raíces. Estas respuestas han sido observadas en diferentes grupos funcionales que se desarrollan en desiertos, y que dependen de los eventos aislados de lluvia durante la temporada de sequía para su supervivencia (Reynolds et al., 2004).

A pesar de que *T. brachycaulos* presenta valores de déficit hídrico y *B. karatas* no muestra diferencias estacionales en su Ψ , por ser plantas CAM tienen la capacidad de evitar daños fisiológicos (e.g. reducción de la eficiencia del PSII, deterioro del metabolismo de las proteínas y la síntesis de aminoácidos), causados por la sequía a través, de un mecanismo denominado retraso en la desecación (Tyree et al., 2002). Este se expresa a través de la asimilación nocturna de CO_2 , la presencia de cutículas gruesas, y la baja frecuencia de estomas y succulencia. La succulencia y la apertura nocturna de los estomas son mecanismos que favorecen la tolerancia a sequía de las plantas CAM (Mauseth, 2004). Estos mecanismos de conservación de agua permiten que en estas plantas el tejido fotosintético

® El ascenso hidráulico es el movimiento pasivo de agua desde las raíces hacia capas de suelo con menores potenciales hídricos, mientras otras partes del sistema radical, ubicadas en capas más húmedas, generalmente en profundidad, están absorbiendo agua.

se mantenga húmedo, cuando el suelo alcanza valores de Ψ inferiores a -1.5 MPa. El agua almacenada en el tejido succulento (parénquima medular), permite que los Ψ de las hojas no sean inferiores a -2.0 MPa durante la temporada de sequía, manteniendo así la apertura estomática, la actividad del tejido fotosintético y la continuidad de la fotosíntesis a bajo potencial hídrico (Goldstein et al., 1991; Lüttge, 2004; Pimienta-Barrios et al., 2006). Lo anterior confirma que *T. brachycaulos* y *B. karatas* son plantas tolerantes a la sequía ya que, al igual que muchas plantas de desierto, no pueden evadir la sequía y tienen que continuar con la fotosíntesis cuando los valores de Ψ en el suelo son bajos.

Por otro lado, las bromeliáceas tanto epifitas como terrestres, pueden aclimatarse y desarrollarse bajo diferentes intensidades de luz presentando cambios en el contenido de pigmentos fotosintéticos (Maxwell et al., 1992; Griffiths & Maxwell, 1999; Graham & Andrade, 2004). Como ocurre en muchas especies, tanto *T. brachycaulos* como *B. karatas* presentaron una mayor concentración de clorofilas totales en las plantas bajo sombra, en ambas temporadas. Una mayor concentración de clorofilas en las plantas bajo sombra, significa que se requieren más unidades fotosintéticas para poder capturar los paquetes de fotones que pasan a través del dosel como haces de luz. De esta forma, las plantas de sombra muestran un aparato fotosintético eficiente en cuanto al uso de la radiación.

Ambas especies presentan disminución en el contenido de clorofilas al final de la temporada de sequía, esta respuesta permite minimizar la absorción de luz cuando se presenta mayor radiación y de esta forma evitar daño a los fotosistemas. Cuando no todos los fotones absorbidos por las clorofilas pueden ser utilizados en los procesos fotoquímicos, las plantas responden a través de mecanismos para disipar el exceso de energía y evitar que las membranas fotosintéticas y las clorofilas sean dañadas, produciéndose fotodegradación y por consiguiente reducción o pérdida de la capacidad fotosintética (Φ PSII). El exceso de luz en las plantas afecta directamente los centros de reacción del PSII. De esta forma, la acumulación de energía de excitación que no puede ser eficientemente canalizada hacia la ruta fotoquímica provoca la rápida destrucción de una de las subunidades proteicas del PSII (proteína D1; Anderson & Aro, 2004; Strid et al., 2004).

En el caso de la relación de la clorofila a:b (chl a:b) es un carácter particular de aclimatación de muchas plantas que crecen bajo variaciones ambientales de radiación, esta relación expresa alteraciones en la cantidad de los complejos de pigmentos proteicos cosechadores de luz (LHC; Anderson et al., 1986). Típicamente, la relación clorofila a:b disminuye, y la cantidad de clorofila asociada con los LHC incrementará como una

respuesta a baja radiación. En contraste a esto, tanto *T. brachycaulos* como *B. karatas*, no presentan diferencias estacionales en la relación clorofila a:b (Figuras 2.19 y 2.20), esta respuesta indica que los LHC no sufren modificaciones (Osborne et al., 1994), y como en el caso de *Tradescantia albiflora* (Kunth), a pesar de no presentar modificaciones, presenta alteraciones de la actividad de transporte de electrones, fosforilación y fijación de carbono bajo variaciones de la intensidad lumínica (Adamson et al., 1991). Estos resultados demuestran que *T. brachycaulos* y *B. karatas*, tienen la capacidad de aclimatare a un amplio rango de ambientes desde sitios de sombra hasta totalmente expuestos, contrario a los reportes para *T. brachycaulos* de ser una planta de sombra obligada (Griffiths & Maxwell, 1999).

La función de los carotenoides no es solo la de actuar como pigmento accesorio, sino también participa en la disipación de la energía en exceso, a través de pigmentos del ciclo de las xantófilas (NPQ) y en la detoxificación de las formas reactivas de oxígeno que se forman durante el proceso de fotosíntesis. Algunas bromeliáceas como *B. humilis* y *Aechmea magdalenae*, bajo condiciones de alta radiación se benefician de los carotenoides, en especial de la zeaxantina, para disminuir el daño oxidativo por saturación de luz (Skillman & Winter, 1997; Königer et al., 1995). Sin embargo, los valores de NPQ que presentaron *T. brachycaulos* y *B. karatas* disminuyeron (Figuras 2.15c y 2.16c), de esta forma, la producción de carotenoides no fue suficiente para el funcionamiento de NPQ produciéndose fotoinactivación del PSII.

Por otro lado, el contenido de ácidos orgánicos que reflejan de manera indirecta la asimilación de CO₂, presentaron variación estacional en las plantas de *T. brachycaulos*. Durante la temporada de sequía, se observó una disminución considerable del contenido de ácidos orgánicos; sin embargo, durante la temporada de lluvia tanto plantas expuestas como de sombra, aumentan el contenido de ácidos orgánicos en sus tejidos; indicando alta flexibilidad fisiológica para adaptarse a diferentes microambientes. En el caso de *B. karatas*, la mayor disminución de ΔH^+ se observó en las plantas expuestas durante la temporada de sequía (abril 07), aumentando durante la temporada de lluvia, indicando que *B. karatas* es capaz de aclimatare a amplias condiciones ambientales, principalmente a un amplio intervalo de luz. El incremento nocturno de acidez está correlacionado con la asimilación neta de CO₂; *T. brachycaulos* y *B. karatas* presentan un ritmo típico de acidificación y desacidificación del metabolismo CAM. Durante la temporada de sequía la radiación incrementa y por lo tanto disminuye la descarboxilación de malato. Durante las condiciones de estrés pronunciadas (mayor duración de la sequía y alta radiación) se produce reciclamiento del CO₂, debido al cierre estomático. Esto permite proteger el

aparato fotosintético y mantener en equilibrio el metabolismo hasta que las condiciones sean favorables. La disminución de la concentración interna de CO_2 , se ve reflejada en una disminución de la tasa de transporte de electrones como respuesta de fotoprotección (ver Fig 2.11D y 2.12D).

Durante la temporada de lluvia, el incremento de ácidos orgánicos se ve favorecido y, por lo tanto, la fotosíntesis. Las plantas bien hidratadas muestran asimilación de CO_2 durante la noche y solo cerca del 12% de este CO_2 es fijado durante el día (Graham & Andrade, 2004). La disminución de ácidos orgánicos durante la temporada de sequía puede explicarse por un aumento de la temperatura durante la noche y por un alto DPV durante el día (ver Fig. 2.3; Andrade, 2003). Además, para evitar la transpiración, las especies CAM, tienden a mostrar apertura estomática durante la noche, reduciendo así la acidez nocturna.

CONCLUSIONES

Durante la temporada de sequía, cuando las condiciones ambientales son extremas (alta radiación y sequía), *T. brachycaulos* y *B. karatas* muestran respuestas típicas de aclimatación a fotoprotección a través de la disipación térmica y la disminución de la actividad fotosintética, reflejada por la actividad de ETR a diferentes pulsos de luz, disminución de la fluorescencia y de la concentración de la clorofila, demostrando que la maquinaria fotosintética fue inactivada por deshidratación y alta radiación, indicando un proceso de regulación más que de inactivación de los centros de reacción del PSII. Ambas especies presentan un aumento en la concentración de carotenoides, lo que podría permitir disipar la energía en forma de calor, sin embargo, esto no fue suficiente para evitar fotoinactivación del PSII en *T. brachycaulos*. Las variables fisiológicas evaluadas, demuestran que *T. brachycaulos* presenta alta flexibilidad fisiológica y por lo tanto puede adaptarse a diferentes microambientes dentro del dosel. Mientras que *B. karatas*, a pesar de aclimatarse bien a sitios bajo sombra, es una planta adaptada a sitios con alta radiación, y por lo tanto tiene mecanismos fisiológicamente eficientes para evitar daño.

REFERENCIAS

- Adams, W.W. III, B. Demmig-Adams, A.S. Verhoeven and D.H. Barker** (1995). *Photoinhibition during winter stress –involvement of sustained xanthophyll cycle-dependent energy-dissipation*. Australian Journal of Plant Physiology, 22, 261-276.
- Adamson, H.Y., W.S. Chow, J.M. Anderson, M. Vesik and M.W. Sutherland** (1991). *Photosynthetic acclimation of Tradescantia albiflora to growth irradiance: morphological, ultrastructural and growth responses*. Physiologia Plantarum, 82, 353-359.
- Anderson, J.M.** (1986). *Photoregulation of the composition, function and structure of thylakoid membranes*. Annual Review of Plant Physiology, 37, 93-136.
- Anderson, J.M., G.D. Price, W.S. Chow, A.B. Hope and M.R. Badger** (1997). *Reduced levels of cytochrome b₆ complex in transgenic tobacco leads to marked photochemical reduction of the plastoquinone pool, without significant change in acclimation to irradiance*. Photosynthesis Research, 53, 215-227.
- Aro, E.M. and B. Anderson** (2001). "Photodamage and D1 protein turnover in photosystem II", in *Advances in photosynthesis and respiration; Regulation of Photosynthesis*, Aro, E.M. and B. Anderson (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. pp 377-393.
- Andrade, J.L.** (2003). *Dew deposition on epiphytic bromeliad leaves: an important event in a Mexican tropical dry deciduous forest*. Journal of Tropical Ecology, 19, 479-488.
- Andrade, J.L., E.A. Graham and G. Zotz** (2004). "Determinantes morfofisiológicos y ambientales de la distribución de epifitas en el dosel de bosques tropicales", in *Fisiología ecológica en plantas. Mecanismos y respuestas a estrés en los ecosistemas*. H. Marino Cabrera (ed). Valparaíso, Chile. pp. 139-156.
- Asada, K.** (1999). *The water-water cycle in chloroplast: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons*. Annual Review of Plant Molecular Biology, 50, 601-639.
- Bader, M.Y., G. Menke and G. Zotz** (2009). *Pronounced drought tolerance characterizes the early life stages of the epiphytic bromeliad Tillandsia flexuosa*. Functional Ecology, 23, 472-479.
- Benzing, D.H. and A. Renfrow** (1971). *The significance of photosynthetic efficiency to habitat preference and phylogeny among tillandsioid bromeliads*. Botanical Gazette, 132, 19-30.
- Benzing, D.H.** (1990). *Vascular epiphytes*. New York. Cambridge University Press.

- Benzing, D.H.** (2000). *Bromeliaceae - Profile of an adaptative radiation*. Cambridge University Press, Cambridge, Gran Bretaña.
- Cervantes, S.E.,** E.A. Graham and J.L. Andrade (2005). *Light microhabitats, growth and photosynthesis of an epiphytic bromeliad in a tropical dry forest*. *Plant Ecology*, 179, 107-118.
- Del, J.** and P. Toivonen (2003). *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology*. Kluwer academic. N.J. USA.
- Demmig-Adams, B.** and W.W. Adams III. (1992). *Photoprotection and other responses of plants to high light stress*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43, 599-626.
- Demming-Adams, B.,** W.W. Adams III, B.A. Logan and A. Verhoeven (1995). *Xanthophyll cycle-dependent energy dissipation and flexible photosystem II efficiency in plants acclimated to light stress*. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22, 249-260.
- Flint, S.D.,** P.W. Jordan and M.M. Caldwell (1984). *Plant protective response to enhanced UV-B radiation under field conditions: leaf optical properties and photosynthesis*. *Photochemistry and Photobiology*, 41, 95-99.
- Goldstein, G.,** J. Andrade and P.S. Nobel (1991). *Differences in water relations parameters for the chlorenchyma and the parenchyma of Opuntia ficus-indica under wet versus dry conditions*. *Australian Journal of Plant Physiology*, 18, 95-107.
- Graham, E.A.,** and J.L. Andrade (2004). *Drought tolerance associated with vertical stratification of two co-occurring epiphytic bromeliads in a tropical dry forest*. *American Journal of Botany*, 91, 699-706.
- Griffiths, H.,** U. Lüttge, K.H. Stimmel, C.E. Crook, N.M. Griffiths and J.A.C. Smith (1986). *Comparative ecophysiology of CAM and C₃ bromeliads. III. Environmental influences on CO₂ assimilation and transpiration*. *Plant, Cell and Environment*, 9, 385-393.
- Griffiths, H.** and K. Maxwell (1999). *In memory of C.S. Pittendrigh: Does exposure in forest canopy relate to photoprotective strategies in epiphytic bromeliads?* *Functional Ecology*, 13, 15-23.
- Hendry, G.A.F.** and A.H. Price. (1993). "Stress indicators: chlorophylls and carotenoids", in Hendry, G.A.F. and Gie J.P. (eds). *Methods in comparative plant ecology*. Chapman and Hall London.
- Horton, P.,** A. Ruban and R. Walters (1996). *Regulation of light harvesting in green plants*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 655-684.
- Hüner, N.P.A.,** A.G. Wilson, K.E. Miskiewicz, M. Krol and G. Öquist (2002). *Energy sensing and photostasis in photoautotrophs*. Elsevier Science. BV. Amsterdam.
- Johnson, G.N.,** A.J. Young, J.D. Scholes and P. Horton (1993). *The dissipation of excess excitation-energy in British plant-species*. *Plant, Cell and Environment*, 16, 673-679.

- Jung, H.S.** and K.K. Niyogi (2008). "Molecular analysis of photoprotection of photosynthesis", in Demming-Adams, B., W.W. Adams III and A.K. Mattoo (eds). *Photoprotection, photoinhibition, gene regulation and environment*. Springer Science Business Media B.V. pp. 127-143.
- Keller, P.** and U. Lüttge (2005). *Photosynthetic light-use by three bromeliads originating from shaded sites (Ananas ananassoides, Ananas comosus cv. Panare) and exposed sites (Pitcairnia pruinosa) in the medium Orinoco basin, Venezuela*. *Biologia Plantarum*, 49, 73-79.
- Königer, M.,** G.C. Harris, A. Virgo and K. Winter (1995). Xanthophyll-cycle pigments and photosynthetic capacity in tropical forest species. a comparative field study on canopy, gap and understory plants. *Oecologia*, 104, 280-290.
- Krause, G.H.** and E. Weiss (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42, 313-349.
- Lee, D. W.,** R.A. Bone S.L. Tarsis and D. Storch (1990). *Correlates of leaf optical properties in tropical forest sun and extreme-shade plants*. *American Journal Botany*, 77, 370-380.
- Lee, D.W.** and R. Graham (1986). *Leaf optical properties of rain forest sun and extreme shade plants*. *American Journal of Botany*, 73, 1100-1108.
- Logan, B.,** D. Barker, B. Demming-Adams and W.W. Adams (1996). Acclimation of leaf carotenoid composition and ascorbate levels to gradients to gradients in the light environment within an Australian rainforest. *Plant, Cell and Environment*, 19, 1083-1090.
- Lüttge, U.** (2004). *Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM)*. *Annals of Botany*, 93, 629-652.
- Matile, P.,** S. Hörtensteiner and H. Thomas (1999). *Chlorophyll degradation*. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 50, 67-95.
- Martin, E. G.** (1994). *Physiological ecology of the Bromeliaceae*. *Botanical Review*, 60, 1-82.
- Martin, C.E.,** A. Tüffers, W. Herpich and D. von Willert (1999). *Utilization and dissipation of absorbed light energy in the epiphytic crassulacean acid metabolism bromeliad Tillandsia ionantha*. *International Journal of Plant Sciences*, 160, 307-313.
- Mauseth, J.D.** (2004). *The structure of photosynthetic succulent stems in plants other than cacti*. *International Journal of Plant Sciences*, 165, 1-9.
- Maxwell, C.,** H. Griffiths, A.M. Borland., M.S.J. Broadmeadow and C.R. McDavie (1992). *Photoinhibitory responses of the epiphytic bromeliad Guzmania monostachia during the dry season in Trinidad maintain photochemical integrity under adverse conditions*. *Plant Cell and Environment*, 15, 37-47.

- Maxwell, K.,** H. Griffiths, A. Borland, A. Young, M. Broadmeadow and C. Fordham (1995). *Short-term photosynthetic responses of the C₃-CAM epiphyte Guzmania monostachya var. monostachya to tropical seasonal transitions under field conditions*. Australian Journal of Plant Physiology, 22, 771-781.
- Maxwell, K.** and G. Johnson (2000). *Chlorophyll fluorescence –a practical guide*. Journal of Experimental Botany, 51, 659-668.
- Mondragón, D.,** R. Durán, I. Ramírez and I. Olmsted (1999). *Populations dynamics of Tillandsia brachycaulos Schltdl. (Bromeliaceae) in Dzibilchaltún National Park, Yucatán*. Selbyana, 20, 250-255.
- Méthy, M.,** C. Damesin and S. Ramba (1996). *Drought and photosystem II activity in two Mediterranean oaks*. Annals of Forest Science, 53, 255-262.
- Niyogi, K.K.** (1999). *Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 50, 333-359.
- Niyogi, K.K.** (2000). *Safety valves for photosynthesis*. Current Opinion in Plant Biology, 3, 455-460.
- bel, P.S.** (1991). *Achievable productivities of certain CAM plants: basis for high values compared with C₃ and C₄ plants*. New Phytologist, 119, 183-205.
- Nobel, P.S.** and E. De la Barrera (2004). *CO₂ uptake by the cultivated hemiepiphytic cactus, Hylocereus undatus*. Annals of Applied Biology, 144, 1-8.
- Nogués, S.** and N.R. Baker (2000). *Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation*. Journal of Experimental Botany, 51, 1309-1317.
- Osborne, B.A.,** G.T. Clabby, D. Horsley and P.F. Nolan (1994). *Is acclimation required for success in high light environments? A case study using Mycelis muralis (L) Dumont (Asteraceae)*. New Phytologist, 127, 363-375.
- Osmond, C.B.** (1994). "What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants", in Baker, N.R. and J.R. Boyer (eds). *Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanism to the field..* BIOS Scientific Publishers Limited. Oxford. United Kingdom. pp. 1-24.
- Pearcy, R.W.,** J. Ehleringer, H.A. Mooney and P.W. Rundel (1989). *Plant physiological ecology: field methods and instrumentation*. Chapman and Hall, U.K.
- Pérez-Torres, E.,** A. García, J. Dinamarca, M. Alberdi, A. Gutiérrez, M. Gidekel, A. G. Ivanov, N. P.A. Hüner, L.J. Corcuera and L. A. Bravo (2004). *The role of photochemical quenching and antioxidants in photoprotection of Deschampsia antarctica*. Functional Plant Biology, 31, 731-741.

- Pfitsch, W.A.** and A.P. Smith (1988). *Growth and photosynthesis of Aechmea magdalenae, a terrestrial CAM plant in a tropical moist forest, Panama*. Journal of Tropical Ecology, 4, 199-207.
- Pimienta-Barrios, E.,** J. Zafudo-Hernández and J. García-Galindo (2006). *Fotosíntesis estacional en plantas jóvenes de Agave tequilana*. Agrociencia, 40, 699-709.
- Reyes-García, C.** and H. Griffiths (2009). "Ecophysiological studies of perennials of the bromeliaceae family in a dry forest: strategies for survival", in *Perspectives in biophysical plant ecophysiology: A tribute to Park S. Nobel*, De la Barrera, E. and W.K. Smith (eds). Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico. pp. 121-151.
- Reynolds, J.F.,** P.R. Kemp, K. Ogle and R.J. Fernández (2004). *Modifying the 'pulse-reserve' paradigm for deserts of North America: precipitation pulses, soil water, and plant responses*. Oecologia, 141, 194-210.
- Skillman, J.B.** and K. Winter (1997). *High photosynthetic capacity in a shade-tolerant crassulacean acid metabolism plant*. Plant Physiology, 113, 441-450.
- Skillman, J.B.,** M. García and K. Winter (1999). *Whole-plant consequences of crassulacean acid metabolism for a tropical forest understory plant*. Ecology, 5, 1584-1593.
- Smith, J.A.C.,** H. Griffiths and U. Lüttge (1986). *Comparative ecophysiology of CAM and C₃ bromeliads. I. The ecology of the Bromeliaceae in Trinidad*. Plant, Cell and Environment, 9, 359-376.
- Strid, A.,** W. Soon Chow and J.M. Anderson (1994). *UV-B damage and protection at the molecular level in plants*. Photosynthesis Research, 39, 475-489.
- Stuntz, S.** and G. Zotz (2001). *Photosynthesis in vascular epiphytes: a survey of 27 species of diverse taxonomic origin*. Flora, 196, 132-141.
- Tausz, M.,** P. Hietz and O. Briones (2001). *The significance of carotenoids and tocopherol in photoprotection of seven epiphytic fern species of a Mexican cloud forest*. Australian Journal of Plant Physiology, 28, 775-783.
- Thien, L.B.,** A. S. Bradburn and A.L. Welden (1982). *The woody vegetation of Dzibilchaltún, a maya archaeological site in Northwest Yucatan, Mexico*. Middle American Research Institute. Tulane University, New Orleans.
- Théry, M.** (2001). *Forest light and its influence on habitat selection*. Plant Ecology, 153, 251-261.
- Triantaphyllides, C.** and M. Havaux (2009). *Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling*. Trends in Plant Science, 4, 219-228.

- Tyree, M.T., G. Vargas, B.M.J. Engelbrecht and T.A. Kursar (2002).** *Drought until death do us part a case study of the desiccation-tolerance of a tropical moist forest seedling-tree Licania platypus (Hemsl) Fritsch.* Journal of Experimental Botany, 53, 2239-2247.
- Winter, K. and J.A.C. Smith (1996).** "An introduction to crassulacean acid metabolism: biochemical principles and biological diversity", in *Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, Ecophysiology and Evolution*, Winter, K. and J.A.C. Smith (eds). Springer. Berlin, Germany.
- Xiong, F.S.S., E.C. Mueller and T.A. Day (2000).** *Photosynthetic and respiratory acclimation and growth response of antarctic vascular plants to contrasting temperature regimes.* American Journal of Botany, 87, 700-710.
- Yoder, C.K. and R.S. Nowak (1999).** *Hydraulic lift among native plant species in the Mojave desert.* Plant and soil, 215, 93-102.
- Zotz, G. and J.L. Andrade (1998).** *Water relations of two co-occurring epiphytic bromeliads.* Journal of Plant Physiology, 152, 545-554.
- Zotz, G. and K. Winter (1994).** *Annual carbon balance and nitrogen use efficiency in tropical C₃ and CAM epiphytes.* New Phytologist, 126, 481-492.
- Zotz, G. and P. Hietz (2001).** *The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions.* Journal of Experimental Botany, 52, 2067-2078.

Capítulo III

Contenido antioxidante en dos especies de bromeliáceas CAM como respuesta a los cambios estacionales de luz en una selva baja caducifolia

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las condiciones ambientales estresantes limitan la capacidad de las plantas para utilizar la energía luminosa absorbida, resultando en una sobreexcitación de los fotosistemas, incluso a intensidades moderadas de luz (Demming-Adams & Adams, 1996). Las plantas que crecen en sitios expuestos con frecuencia presentan un desbalance entre la cantidad de radiación absorbida y la cantidad de radiación para fotosíntesis; lo anterior resulta en una absorción del exceso de luz que ocasiona daño foto-oxidativo, principalmente del fotosistema II (PSII), una de las estructuras más sensibles a estrés abiótico (Asada, 1994). Este desbalance, y el daño resultante del PSII, aumenta si las plantas están expuestas a diferentes combinaciones de estrés abióticos, debido a que las reacciones del Ciclo de Calvin están fuertemente limitadas por los procesos de transporte de luz y de transporte de electrones (Leegood, 1995). Sin embargo, las plantas han desarrollado diversos mecanismos de protección para evitar o disminuir los efectos de la absorción excesiva de radiación; ya sea disminuyendo la intercepción la radiación por medio del movimiento de hojas y cloroplastos, disipando el exceso de energía absorbida en forma de calor, a través del ciclo de las xantofilas y mediante la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS, Logan et al., 1998). La disipación térmica y los mecanismos de protección contra el estrés oxidativo son de particular importancia en plantas expuestas a condiciones extremas de temperatura y/o radiación (Xu et al., 1999; Kornyeyev et al., 2003). Para limitar el daño oxidativo, las plantas utilizan antioxidantes que incluyen enzimas como las catalasas, la peróxido dismutasa, la ascorbato peroxidasa, la monodehidroascorbato reductasa y la glutatión reductasa, además de pequeñas moléculas como ascorbato, glutatión y α -tocoferol (Palojoki & Krinsky, 1992; Perez-Torres et al., 2004).

Para el caso de las plantas con el metabolismo ácido de las crasuláceas, se ha propuesto que esta vía previene la producción de ROS porque durante el día, cuando los estomas están cerrados, la asimilación de CO₂ previene la sobreenergización de la maquinaria fotosintética, controlando la fotoinhibición y el estrés oxidativo bajo niveles moderados de intensidad lumínica y condiciones limitadas de agua (Borland et al., 2000; Osmond & Förster, 2008; Niewiadomska & Borland, 2008). Sin embargo,

cuando las plantas CAM son expuestas a una combinación prolongada de sequía y alta radiación, el PS II es susceptible a la sobreexcitación y sobreredución de elementos redox, como consecuencia de la continua actividad del transporte de electrones después del cierre estomático (Miszalski et al., 2001; Lüttge, 2004). Por otro lado, las plantas CAM poseen efectivos sistemas de respuesta antioxidante con patrones diurnos de expresión y regulación de enzimas (e.g. catalase, superoxide dismutase) y metabolitos antioxidantes (e.g. anthocyanins and flavonoids; Ślesak et al., 2002; Niewiadomska et al., 2004). Niewiadomska & Borland (2008) mencionan que existe poca evidencia que apoye el estrés oxidativo o el daño oxidativo en plantas CAM, y proponen que una interacción entre varios procesos incrementan la actividad enzimática y de los metabolitos involucrados en la eliminación y desactivación de ROS, optimizando el funcionamiento fotosintético de acuerdo a los cambios dinámicos en las concentraciones de CO₂ y O₂ que ocurren durante las fases diurnas de CAM.

Los mecanismos de adaptación a estrés por radiación pueden también depender de productos fotoprotectores en los cloroplastos, e.g. carotenoides del ciclo de las zeaxantinas, así como de la formación de flavonoides que absorben y disipan la energía. La adaptación a diversas intensidades de radiación es específica para cada especie y depende de su capacidad para producir flavonoides y otros metabolitos fotoprotectores (Winkel-Shirley, 2002; Niyogi, 2000). Los flavonoides se biosintetizan en todas las plantas, que aunque comparten una vía biosintética central, poseen una gran variabilidad en la composición química de sus productos finales y en los mecanismos de regulación de su biosíntesis, por lo que la composición y concentración de flavonoides es muy variable entre especies y en respuesta al ambiente. Los flavonoides son sintetizados en el citoplasma y luego migran hacia su destino final en las vacuolas celulares. Cumplen funciones metabólicas importantes en las plantas, algunas funciones son comunes a todas las plantas y otras son específicas de algunos taxones (Chalker-Scott, 1999; Gould et al., 2002). Como ejemplo de dichas funciones, los flavonoides son responsables de la resistencia de las plantas a la luz ultravioleta, intervienen en el transporte de la hormona auxina, y como defensa ante el herbivorismo. Otra función importante es la atracción de los animales polinizadores, a través del color o el olor que dan a la planta o a sus flores (Davies, 2004). La acumulación de antocianinas en los tejidos vegetales indica estrés en las plantas, sin embargo el papel que juegan los flavonoides en la respuesta vegetal al estrés es todavía poco entendido. En muchos casos, estos metabolitos aportan su actividad antioxidante como parte de una respuesta general de la planta al estrés (Winkel-Shirley, 2002; Tanaka et al., 2008).

Los miembros de la familia Bromeliaceae, epifitas y terrestres, muestran una amplia variedad de estrategias de uso de luz, que varía desde especies adaptadas a radiación con altos valores de saturación de luz y bajos contenidos de clorofila; especies adaptadas a la sombra con valores bajos de saturación de luz que presentan fotoblanqueamiento y fotoinhibición (Griffiths & Maxwell, 1999; Benzing, 2000; Stuntz & Zotz, 2001). Estos rangos fisiológicos, pueden estar correlacionados con el hábitat de las especies desde desiertos hasta bosques lluviosos (Benzing & Renfrow, 1971; Smith et al., 1986), así como a la distribución local de las epifitas a través de un gradiente de altura y de intensidades de FFF en el dosel (Griffiths & Maxwell, 1999). La alta capacidad de aclimatare a ambientes cambiantes de luz ha sido descrita en diferentes especies de bromeliáceas (Maxwell et al., 1992; Griffiths & Maxwell, 1999; Martin et al., 1999; Benzing, 2000) y se ha observado que estas son capaces de habitar ambientes con grandes cambios estacionales de FFF.

Con base a lo anterior, se realizó una comparación de la producción de metabolitos con actividad antioxidante y la producción de antocianinas, como un mecanismo de respuesta químico a alta radiación entre individuos de *T. brachycaulos* y *B. karatas*, expuestos y bajo sombra, durante las temporadas de sequía y de lluvia. Este Capítulo fue sometido a Journal of Plant Physiology, en donde se planteó contestar las siguientes preguntas:

¿Producen metabolitos con actividad antioxidante como respuesta a alta radiación *T. brachycaulos* y *B. karatas*? ¿Aumenta la concentración de metabolitos con actividad antioxidante en individuos expuestos durante la temporada de sequía? ¿Producen una mayor cantidad de productos antioxidantes las plantas de sombra bajo condiciones de alta radiación? ¿Está relacionada con la producción de antocianinas la pigmentación roja de las hojas de plantas expuestas? ¿Se presenta como una respuesta para disminuir el fotodaño la producción de antocianinas?

REFERENCIAS

- Asada, K.** (1994). "Mechanisms for scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under light stress", in *Photoinhibition of photosynthesis from molecular mechanisms to the field*, Baker, N.R and J.R. Bowyer (eds). Bios, Oxford. pp. 129-142.
- Benzing, D.H.** (2000). *Bromeliaceae - Profile of an adaptative radiation*. Cambridge University Press. Cambridge, Gran Bretaña.
- Benzing, D.H** and A. Renfrow (1971). *The significance of photosynthetic efficiency to habitat preference and phylogeny among tillandsioid bromeliads*. Botanical Gazette. 132, 19-30.
- Borland, A.M., K. Maxwell** and H. Griffiths (2000). "Photosynthesis: Physiology and Metabolism", in *Ecophysiology of plants with crassulacean acid metabolism*. Leegod, R.C., T.D. Sharkey and S. von Caemmerer (eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 583-605.
- Chalker-Scott, L.** (1999). *Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses*. Photochemistry and Photobiology, 70, 1-9.
- Davies, K.M.** (2004). *Plants pigments and their manipulation*. Oxford: Blackwell Publishing. 352 pp.
- Demmig-Adams, B.** and W.W. III Adams (1996). *The role of xanthophylls cycle carotenoids in the protection of photosynthesis*. Trends in Plant Science, 1, 21-26.
- Gould, K.S., J. McKelvie** and K.R. Markham (2002). *Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury*. Plant, Cell and Environment, 25, 1261-1269.
- Griffiths, H.** and K. Maxwell (1999). *In memory of C.S. Pittenfrigh: Does exposure in forest canopies relate to photoprotective strategies in epiphytic bromeliads?* Functional Ecology, 13, 15-23.
- Kornyeyev, D., B.A. Logan, P.R. Payton, R.D. Allen** and A.S. Holaday (2003). *Elevated chloroplastic glutathione reductase activities decreased chilling-induced photoinhibition by increasing rates of photochemistry, but not thermal energy dissipation, in transgenic cotton*. Functional Plant Biology, 30, 101-110.
- Leegood, R.C.** (1995). "Effects of temperature on photosynthesis and photorespiration", in *Environment and plant metabolism*, Smirnoff, N. (ed). Bios, Oxford. pp. 45-62.
- Logan, A.B., S.C. Grace, W.W. Adams III** and B. Demming-Adams (1998). *Seasonal differences in xanthophyll cycle characteristics and antioxidants in Mahonia repens growing in different light environments*. Oecologia, 116, 9-17.
- Lüttge, U.** (2004). *Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM)*. Annals of Botany, 93, 629-652.

- Martin, C.E., A. Tüffers, W. Herpich and D. von Willert (1999).** *Utilization and dissipation of absorbed light energy in the epiphytic crassulacean acid metabolism bromeliad Tillandsia ionantha.* International Journal of Plant Sciences, 160, 307-313.
- Maxwell, C., H. Griffiths, A.M. Borland., M.S.J. Broadmeadow and C.R. McDavid (1992).** *Photoinhibitory responses of the epiphytic bromeliad Guzmania monostachia during the dry season in Trinidad maintain photochemical integrity under adverse conditions.* Plant Cell and Environment, 15, 37-47.
- Miszalski, Z., E. Niewiadomska, I. Ślesak, U. Lüttge, M. Kluge and R. Ratajczak (2001).** *The effect of irradiance on carboxylating/decarboxylating enzymes and fumarase activities in Mesembryanthemum crystallinum L. leaves exposed to salinity stress.* Plant Biology, 3, 17-23.
- Mittler, R. (2002).** *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance.* Trends in Plant Science, 7, 405-410.
- Niewiadomska, E., B. Karpinska, E. Romanowska, I. Ślesak and S. Karpinski (2004).** *A salinity-induced C₃-CAM transition increases energy conservation in the halophyte Mesembryanthemum crystallinum L. leaves.* Plant and Cell Physiology, 45, 789-794.
- Niewiadomska, E. and A.M. Borland (2008).** "Crassulacean acid metabolism: a cause or consequence of oxidative stress in planta?" in *Progress in Botany* 69, Lüttge, U., W. Beyschlag and J. Murata (eds). Berlin, Springer-Verlag. pp. 247-266.
- Niyogi, K.K. (2000).** *Safety valves for photosynthesis.* Current Opinion in Plant Biology, 3, 455-460.
- Osmond, B. and B. Förster (2008).** "Photoinhibition: then and now", in *Photoprotection, photoinhibition, gene regulation and environment*, Demming-Adams, B., W.W. III, Adams and A.K. Matto (eds). Springer Science. pp. 11-22.
- Palozza, P. and N.I. Krinsky (1992).** *Antioxidants effects of carotenoides in vivo and in vitro: an overview.* Methods in Enzymology, 213, 403-420.
- Pérez-Torres, E., A. García, J. Dinamarca, M. Alberdi, A. Gutiérrez, M. Gidekel, A. G. Ivanov, N. P.A. Hüner, L.J. Corcuera and L. A. Bravo (2004).** *The role of photochemical quenching and antioxidants in photoprotection of Deschampsia antarctica.* Functional Plant Biology, 31, 731-741.
- Ślesak, I., Z. Miszalski, B. Karpinska, E. Niewiadomska, R. Ratajczak and S. Karpinski (2002).** *Redox control of oxidative stress responses in the C₃-CAM intermediate plant Mesembryanthemum crystallinum.* Plant Physiology and Biochemistry, 40, 669-677.

- Smith, J.A.C.**, H. Griffiths and U. Lüttge (1986). *Comparative ecophysiology of CAM and C₃ bromeliads. I. The ecology of the Bromeliaceae in Trinidad*. Plant, Cell and Environment, 9, 359-376.
- Stuntz, S.** and G. Zotz (2001). *Photosynthesis in vascular epiphytes: a survey of 27 species of diverse taxonomic origin*. Flora, 196, 132-141.
- Tanaka, Y.**, N. Sasaki and A. Ohmiya (2008). *Biosynthesis of plants pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids*. The Plant Journal, 54, 733-749.
- Winkel-Shirley, B.** (2002). *Biosynthesis of flavonoids and effects of stress*. Plant Biology, 5, 218-223.
- Xu, Ch. Ch.**, Y.A. Jeon and C.-H. Lee (1999). *Relative contributions of photochemical and non-photochemical routes to excitation energy dissipation in rice and barley illuminated at a chilling temperature*. Physiologia Plantarum, 107, 447-453.

Antioxidant content in two CAM bromeliad species as a response to seasonal light changes in a tropical dry deciduous forest

Claudia González-Salvatierra,^{a,b} José Luis Andrade,^a Fabiola Escalante-Erosa,^b Karolina García-Sosa,^b and Luis Manuel Peña-Rodríguez.^b

^aUnidad de Recursos Naturales and ^bUnidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná, Mérida, Yucatán 97200, México.

SUMMARY

Plants have evolved photoprotective mechanisms to limit photodamage; one of these mechanisms involves the biosynthesis of antioxidant metabolites to neutralize reactive oxygen species generated when plants are exposed to excess light. However, it is known that exposure of plants to conditions of extreme water stress and high light intensity results in their enhanced susceptibility to over-excitation of photosystem II and to photooxidative stress. In this investigation we used the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl reduction assay to conduct a broad survey of the effect of water availability and light exposure conditions in the antioxidant activity of the leaf extracts of two bromeliad species showing crassulacean acid metabolism, one epiphyte, *Tillandsia brachycaulos*, and one terrestrial, *Bromelia karatas*, growing in the tropical dry deciduous forest of Dzibilchaltún National Park, México. The microenvironment of *T. brachycaulos* and *B. karatas* experiences significant diurnal and seasonal light variations, leading to changes in temperature and water vapor pressure deficit; the results obtained showed that, for both bromeliads, the increase in antioxidant activity occurred during the dry season, as a consequence of water stress and higher-light conditions. Additionally, *T. brachycaulos* showed a clear correlation between high light intensity conditions and the content of anthocyanins accumulated under the leaf epidermis, confirming the role of these pigments as photoprotective screens in the leaves. Alternatively, the red coloration under the leaf epidermis of *B. karatas* was not due to anthocyanins, but to other unidentified pigments.

KEYWORDS: Anthocyanins, antioxidant activity, Bromeliaceae, crassulacean acid metabolism, light microenvironments.

ABBREVIATIONS: CAM, crassulacean acid metabolism; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl reactive; TLC, thin layer chromatography; PPF, photosynthetic photon flux; PSII, photosystem II; ROS, reactive oxygen species.

INTRODUCTION

Plant adaptations to avoid damage from excess light include morphological, biochemical, and physiological features. However, the potential for light acclimation is species specific and involves major structural and functional changes in the photosynthetic apparatus (Lambrevia et al., 2006; Lüttge, 2008). During photosynthesis, excessive amounts of light may cause over-energizing (photooxidative stress) and damage of the photosynthetic apparatus, causing photoinhibition (Jung & Niyogi, 2008; Hernández et al., 2006; Lambrevia et al., 2006). Although excess energy is dissipated as heat or fluorescence (Demmig-Adams & Adams III, 1996; Nobel, 2005), under high photosynthetic photon flux (PPF) conditions a number of toxic radicals known as reactive oxygen species (ROS) are produced (Karpinski et al., 1999; Krieger-Liszkay et al., 2008); these radicals represent a threat to the cell because they react with proteins, lipids and DNA, causing rapid cell damage and destroying chloroplast pigments and membrane lipids (Chalker-Scott, 1999; Gould et al., 2002). To prevent damage by ROS, plants use both enzymes and metabolites with antioxidant activity (Shao et al., 2008; Hernández et al., 2009); antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase are capable of removing, neutralizing or scavenging oxy-intermediates in leaves (Gould et al., 2002; Hernández et al., 2006; 2009). Alternatively, metabolites with antioxidant activity include carotenoids, anthocyanins, flavonoids, and molecules such as ascorbic acid (vitamin C), tocopherol (vitamin E), and ferredoxin (Krieger-Liszkay & Trebst, 2006). Most of the antioxidant metabolites accumulate primarily in the epidermis to both scavenge ROS and, presumably, screen solar light in the absence of a photon-scattering indumentum (Steyn et al., 2002; Merzlyack et al., 2005; Tanaka et al., 2008).

It has been proposed that crassulacean acid metabolism (CAM), a mode of carbon acquisition where carbon acquisition occurs mainly at nighttime, prevents ROS production because during daytime, when stomata are closed, CO₂ assimilation prevents the over-energization of the photosynthetic machinery, thus controlling photoinhibition and oxidative stress under moderate levels of light intensity and water-limiting conditions (Borland et al., 2000; Osmond & Förster, 2008; Niewiadomska & Borland, 2008). However, CAM plants exposed to a combination of prolonged, extreme water deficit plus high PPF, are susceptible to over-excitation of photosystem II (PSII) and over reduction of the redox-elements, as a consequence of sustained electron transport behind closed stomata (Miszalski et al., 2001; Lüttge, 2004). Moreover, CAM plants possess effective antioxidative response systems with a diurnal pattern of expression and regulation of antioxidant enzymes (e.g. catalase, superoxide dismutase) and antioxidant metabolites (e.g. anthocyanins and flavonoids; Ślesak et al.,

2002; Niewiadomska et al., 2004). Furthermore, Niewiadomska & Borland (2008) mention that there is little evidence to support oxidative stress or oxidative damage in CAM plants, and propose that an interplay between various processes that increase activity of enzymes and metabolites involved in the destruction and scavenging of ROS, optimize photosynthetic performance in line with the dynamic shifts in CO₂ and O₂ concentrations that occur over the diurnal phases of CAM.

The family Bromeliaceae appears to be unique amongst the monocotyledons in the variety and frequency of occurrence of antioxidant metabolites (e.g. flavones and flavonols; Williams, 1978; Benzing, 2000; Saito & Harborne, 1983). Also, in most bromeliads, their gradual adaptation to high PPF environments may be favoured by the development of reflective cuticles and photoprotective metabolites, leading to an enhancement of photosynthesis and of antioxidant defenses (Maxwell et al., 1995; Benzing, 2000; Steyn et al., 2002; Gould, 2004). This is particularly important in a tropical dry deciduous forest, where bromeliads are exposed to multiple stress factors during the dry season, including a combination of water deficit, high temperature, and high PPF (Benzing, 2000; Graham & Andrade, 2004; Cervantes et al., 2005; Reyes-García & Griffiths, 2009). An additional adaptation of some epiphytic and terrestrial CAM bromeliads is a very plastic light-harvesting system, which acclimates rapidly to contrasting light environments (Maxwell et al., 1992; 1995; Martin, 1994).

The present study evaluated the production of antioxidant metabolites in the leaves of two CAM bromeliads with different growth habitat, *Tillandsia brachycaulos* (epiphytic) and *Bromelia karatas* (terrestrial), in a tropical dry deciduous forest in Yucatan, Mexico. Field measurements of the light environment were measured above individuals in two light microhabitats of both species during the dry and rainy seasons.

MATERIALS AND METHODS

Plant species and study site

Both *Tillandsia brachycaulos* Schltdl. and *Bromelia karatas* L. exhibit CAM photosynthetic pathway (Martin, 1994; Graham & Andrade, 2004; Cervantes et al., 2005). *T. brachycaulos* is an epiphytic bromeliad commonly found in tropical dry forests, moist forests and semi-arid shrublands in southern Mexico and Central America (Mondragón et al., 2004; Ramírez et al., 2005). *B. karatas* is a terrestrial bromeliad which can be found in tropical dry forests, tropical thorn forests, semideciduous tropical forests and coastal dunes (Ramírez et al., 2005).

Measurements and sampling were carried out at the Dzibilchaltún National Park (21°05'N, 89°99'W, 8 m elevation) in Yucatán, México, in the dry (April 2007) and rainy (September 2007) seasons. The site is a subtropical-dry to tropical-arid forest, with a maximum canopy height of 8 m (Mondragón et al., 2004; Cervantes et al., 2005). The rainfall pattern is markedly seasonal; with mean annual rainfall and temperature of 700 mm and 25.8 °C, respectively (Thien et al., 1982). A marked dry season (March-May; where most trees are leafless) occurs between an early dry season (November-February) and a rainy season (June-November; Orellana, 1999).

Light microsite characterization

The light environment was characterized using hemispherical photography. A digital picture (Nikon Coolpix 4300, Japan) was taken from above each plant with a fish-eye lens (Nikon FC-E8 0.21x, Japan), during dry and rainy seasons to quantify the gap fraction distribution above the plant, and hence the directional distribution of diffuse PPF in the understory. Images were processed using WINPHOT version 5.0 (1996, ter Steege, The Netherlands). Six individuals growing under the shaded lower canopy or on exposed sites were located and selected for both species. Individuals of each species were grouped according to the total PPF received daily during the dry season: fully exposed to direct sunlight (80-90 % total daily PPF) and shaded (20-30 % total daily PPF).

Antioxidant activity

Leaf extraction. Leaves from ten individuals of *T. brachycaulos* and five individuals of *B. karatas* were collected each season (dry and rainy), under both light regimes. Ground fresh leaves of both species were extracted with ethanol at room temperature for 24 h. The resulting slurry was filtered, first

through a cotton plug and then through filter paper (Whatman No.1). The solvent was evaporated under reduced pressure at 35 °C, using a rotary evaporator (BÜCHI RE111, Germany), to yield the corresponding ethanolic crude extract. Portions (500 mg) of the crude ethanolic extract were fractionated by either successive sonication with n-hexane and ethylacetate (3 h, 100 mL) in an ultrasonic bath (Cole-Parmer Instrument Company, USA), or by successive liquid-liquid partition of an aqueous (3:2 water/methanol) suspension with n-hexane (2:1, 1:1, 1:1, v/v), ethyl acetate (2:1, 1:1, 1:1, v/v) and water-saturated n-butanol (1:4 v/v), to produce the corresponding low, medium and high polarity fractions. Both the ethanolic crude extracts and the purified fractions were analyzed by thin layer chromatography (TLC) and evaluated for their content of antioxidant metabolites. Chromatographic analyses were performed on 5x5 cm silica gel plates (E.M. Merck DC Alufolien, 0.2 mm thickness). Elution was carried out using a mixture of dichloromethane/methanol/water (14:7:1) as the eluant and the resulting chromatograms were visualized using a solution of 4% phosphomolybdic acid, containing a trace of ceric sulfate, in 5 % sulfuric acid, followed by gentle heating.

Antioxidant activity was determined by evaluating the reduction of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany), following the procedures below:

a) *Qualitative assay.* Crude extracts and purified fractions were spotted on a TLC plate and eluted as described previously. The resulting chromatograms were sprayed with DPPH (0.2 % weight/volume) and the presence of antioxidant metabolites was detected 24 h later by observing yellow spots against a purple background (Nanjo et al., 1996).

b) *Quantitative assay.* To prepare the calibration curve, a 0.1 mM methanol solution of DPPH and five dilutions (0.038, 0.217, 1.195, 6.59 and 36.36 µg/mL) of L-ascorbic acid (Sigma, Germany) in methanol were prepared (Molyneux, 2003). The initial DPPH concentration was calculated from the calibration curve using the equation determined by linear regression. The antioxidant activity measurements were carried out by adding aliquots of DPPH solution to a methanol solution of the crude extracts and purified fractions. After 30 min, the absorbance was measured at 517 nm using a spectrophotometer (model SM 110215, Dubuque, Iowa USA), and the percentage of remaining DPPH was calculated using the formula $\%(\text{DPPH})_{\text{rim}} = [(\text{Abs DPPH } 0.1 \text{ mM})_{t=0} / (\text{Abs DPPH sample})_{30}] * 100$ (Brand-Williams et al., 1995; Sánchez- Moreno et al., 1999). Spectrometric measurements were made using methanol as a blank; DPPH solutions were freshly prepared in methanol every day and kept protected from light. Ascorbic acid (1 %) was used as positive control. An equal volume of the

solvent employed to dissolve the samples tested was added to the control tubes. The assay was run three times with the same sample.

Assay for total anthocyanins

Tissue-specific localization. Five exposed and five shaded plants were processed during dry and rainy seasons. The localization of anthocyanins was estimated on hand transverse sections of fresh leaf tissue stained with 1M HCl, as reported by Gould et al. (2002), and observed using a light microscope with photographic facility (Nikon, Coolpix L12). Red regions of the laminae were sectioned and the histological location of the red pigmentation noted under bright field microscopy.

Extraction and determination. The extraction of anthocyanins was carried out following Neff & Chory (1998). Fresh leaves (0.05 g) collected from exposed and shaded plants (n=5), during dry and rainy seasons, were ground in liquid nitrogen, resuspended in methanol-1 % HCl, and left in the dark for 24 h, at 4 °C. Solids were separated by centrifugation (5000 g for 5 min) and the absorbance of the supernatant was read at 530 nm using a spectrophotometer (Beckman Coulter DU650). Total anthocyanins content was determined according to the equation given by Yang et al. (2008).

Statistical analysis

The qualitative DPPH assay was performed in triplicate and all data were tested for differences in concentration of antioxidant metabolites in terms of season (dry/rainy) and PPF levels (shaded/exposed), using Kolmogorov-Smirnov test comparing two independent samples. Differences between treatments of the anthocyanin assay were established using a two-way ANOVA. A simple regression analysis was performed to describe the correlation between incident PPF and total anthocyanin content during rainy and dry seasons for both species (STATISTICA software, version 7).

RESULTS

Microsites light characterization

Average PPF above the canopy during clear days was $43.6 \pm 2.16 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ in the dry season (9 h light period) and $46.0 \pm 3.96 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ in the rainy season (12 h light period). The average percentage of total daily PPF received by shaded and exposed plants of *T. brachycaulos* during the dry season was $35 \pm 1.3 \%$ and $78.5 \pm 2.5 \%$, respectively (Figure 3.1B and 3.1F), and $14.3 \pm 2.3 \%$ and $65.5 \pm 1.2 \%$ in the rainy season (Figure 3.1A and 3.1E). During the dry season, shaded and exposed plants of *B. karatas* averaged $65.24 \pm 2.3 \%$ and $80.67 \pm 1.5 \%$ of total daily PPF, respectively (Figure 3.1D and 3.1H); while during the rainy season shaded and exposed plants averaged $30.86 \pm 1.4 \%$ and $80.15 \pm 0.95 \%$ of total PPF, respectively (Figure 3.1C and 3.1G). In general, shaded plants of *B. karatas* and of *T. brachycaulos* received an average of 2.5 and 1.5 times more PPF, respectively, in the dry season than in the rainy season.

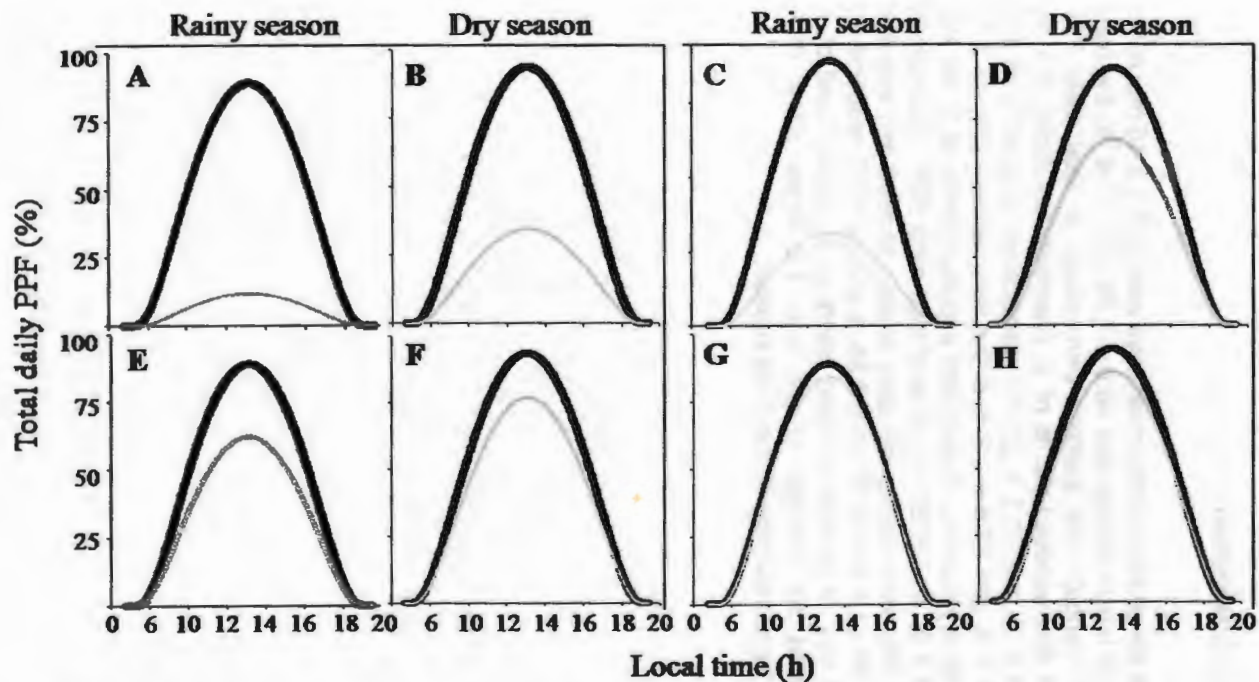


Figure 3.1. Percentage of total daily photosynthetic photon flux (PPF) received relative to the top canopy in Dzibilchaltún, Mexico, for a clear day during dry (April 18, 2007) and rainy (September 15, 2007) seasons. Individual plants of *T. brachycaulos* (A-B and E-F) and *B. karatas* (C-D and G-H) in two light conditions: shaded (A-D) and exposed (E-H) plants. Black line: above canopy PPF; gray line: below canopy PPF. Data obtained using the report file of the fisheye photograph analysis with the program WinPhot 5.0.

Antioxidant activity

Qualitative assay. The degree of antioxidant activity of the samples tested was determined from observation of the intensity of yellow-colored spots on a purple background, when TLC-chromatograms were sprayed with a DPPH solution. Testing of the ethanolic extracts from the two bromeliads showed a strong antioxidant activity in both species; fractionation of the extracts allowed the localization of the potentially-active components in the high polarity fractions (Table 3.1), suggesting that most antioxidant metabolites were polar and hydrophilic.

Table 3.1. Qualitative antioxidant activity of crude extracts and purified fractions from *T. brachycaulos* and *B. karatas*.

	Sample evaluated	<i>Tillandsia brachycaulos</i>	<i>Bromelia karatas</i>
	Crude extract	***	***
sonication fractions	Hexane	*	*
	Ethyl acetate	**	**
	Residue	***	***
liquid-liquid fractions	Hexane	*	*
	Ethyl acetate	**	**
	Butanol	***	***

Low activity: *, medium activity: **, high activity: ***

Quantitative assay. The antioxidant activity of the extracts of *T. brachycaulos* and *B. karatas* and their corresponding fractions confirmed that their highest antioxidant content was similar in both the crude extracts and high polarity fractions of the two species. The quantitative evaluation of the antioxidant activity of the various organic extracts allowed the determination of the seasonal effects in shaded and exposed plants (Figure 3.2). While exposed plants of *T. brachycaulos* showed significant differences in antioxidant activity between seasons ($P < 0.001$; $29.31 \pm 0.57 \mu\text{g/mL}$ in dry and $27.59 \pm 0.48 \mu\text{g/mL}$ in rainy seasons), shaded plants did not ($P > 0.10$). Alternatively, during the dry season, exposed plants of *T. brachycaulos*

exhibited a higher antioxidant activity ($29.31 \pm 0.57 \mu\text{g/mL}$; $P < 0.005$; Kolmogorov-Smirnov test) than shaded plants ($25.00 \pm 1.04 \mu\text{g/mL}$; Figure 3.2A). For *B. karatas*, a higher antioxidant activity was found in exposed plants during both dry ($27.60 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$) and rainy seasons ($26.12 \pm 0.75 \mu\text{g/mL}$; $P < 0.025$; Figure 3.2B), while shaded plants showed significant differences in antioxidant activity between dry and rainy seasons ($25.68 \pm 1.11 \mu\text{g/mL}$ and $26.61 \pm 4.61 \mu\text{g/mL}$, respectively; $P > 0.005$).

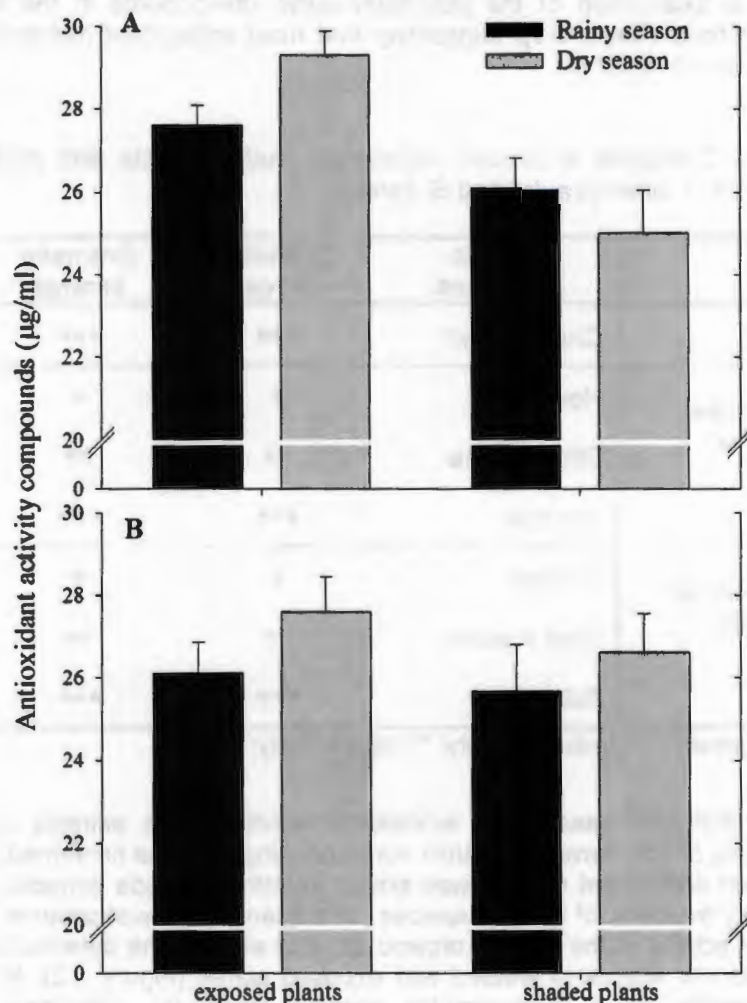


Figure 3.2. Total concentration of metabolites with antioxidant activity for *T. brachycaulos* (A) and *B. karatas* (B) under two light conditions: exposed and shaded plants, during dry and rainy seasons in Dzibilchaltún, Mexico. Data are means $\pm$ SE ($n=27$); $P < 0.05$.

Assay for total anthocyanins

Conventional microscopy of HCl-treated leaf cross-sections showed red areas suggesting anthocyanin accumulation in both adaxial and abaxial epidermis of *T. brachycaulos* (Figure 3.3A - 3.3B), and in the adaxial epidermis of *B. karatas*, for exposed plants during the dry season (Figure 3.3C - 3.3D).

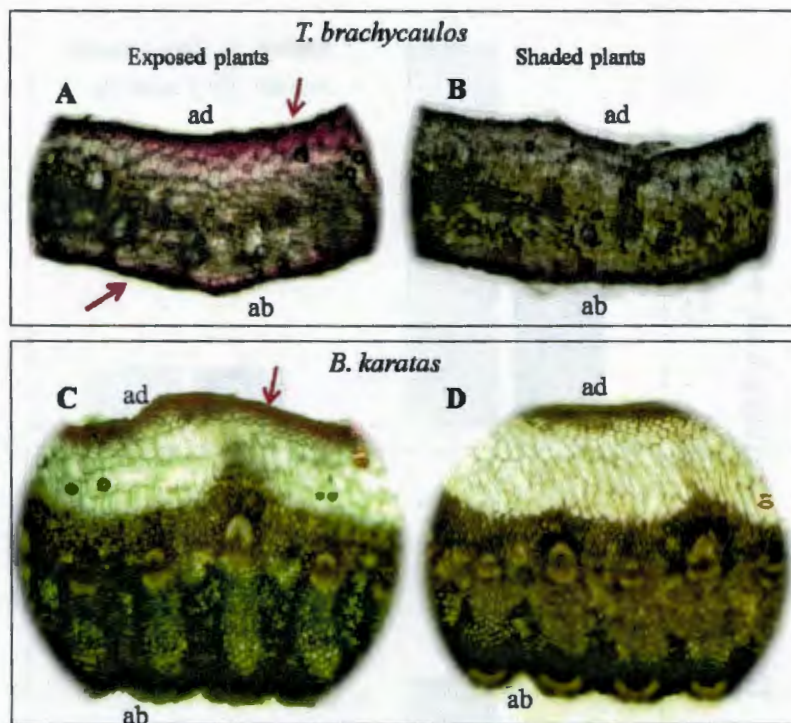


Figure 3.3. Optical microscopy photograph (40X) of transverse leaf sections of *T. brachycaulos* (A-B) and *B. karatas* (C-D) in two light conditions: exposed (A and C) and shaded plants (B and D) during dry season. **ad**: adaxial epidermis; **ab**: abaxial epidermis. Arrows indicate zones with high amount of anthocyanins.

Red areas in leaves were larger and darker in exposed individuals of *T. brachycaulos* plants than in exposed plants of *B. karatas*. Although exposed plants of *T. brachycaulos* showed significant seasonal differences in anthocyanin content (0.67 ± 0.05 mg/g FW and 0.45 ± 0.03 mg/g FW, for dry and rainy seasons, respectively; $P < 0.05$; Figure 3.4A), no significant

differences were found in shaded plants during the rainy or dry seasons (0.101 ± 0.013 mg/g FW and 0.102 ± 0.005 mg/g FW, respectively; $P > 0.05$). In general, *B. karatas* showed a lower anthocyanin content than that of *T. brachycaulos*, although exposed plants did show seasonal differences (0.160 ± 0.015 mg/g FW and 0.063 ± 0.009 mg/g FW, for dry and rainy, respectively; $P < 0.05$; Figure 3.4B).

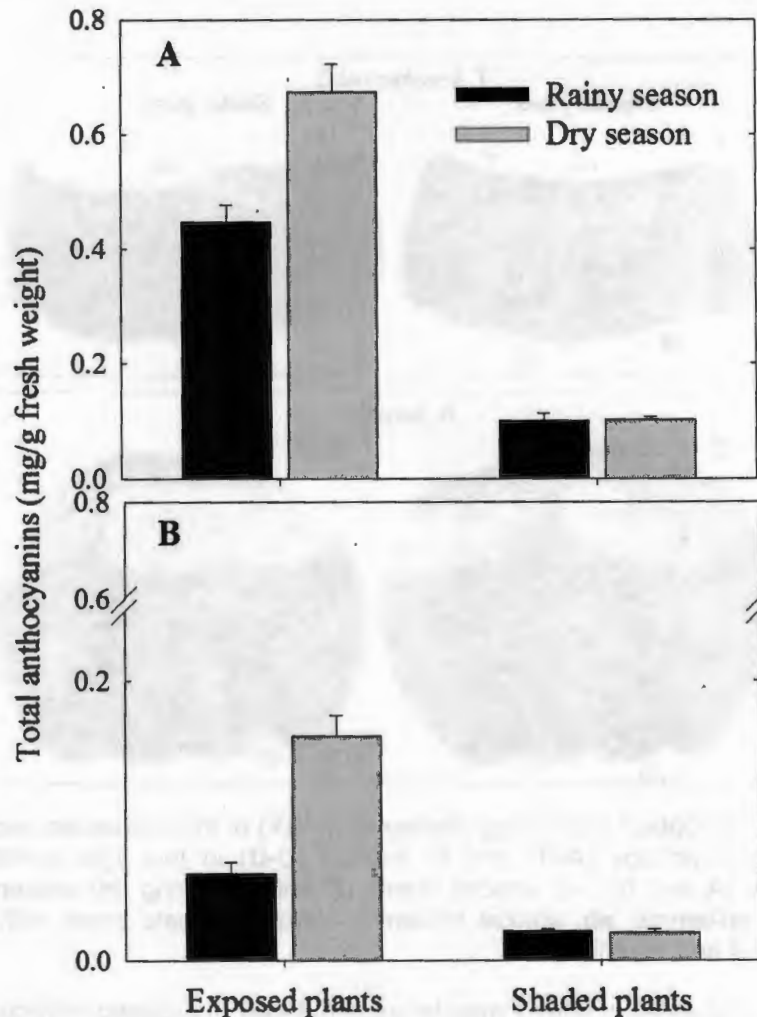


Figure 3.4. Total anthocyanins concentration for leaves of *T. brachycaulos* (A) and *B. karatas* (B) in two light conditions: exposed and shaded plants, during the rainy and dry seasons.

A high linear correlation was found between total anthocyanin content and total daily PPF received by *T. brachycaulos* (Figure 3.5A; $r^2=0.75$, $P=0.001$ and $r^2=0.89$, $P=0.001$ for dry and rainy seasons, respectively). For *B. karatas*, a similar correlation was not significant (Figure 3.5B; $r^2=0.40$, $P=0.054$ and $r^2=0.60$, $P=0.009$ for dry and rainy seasons, respectively).

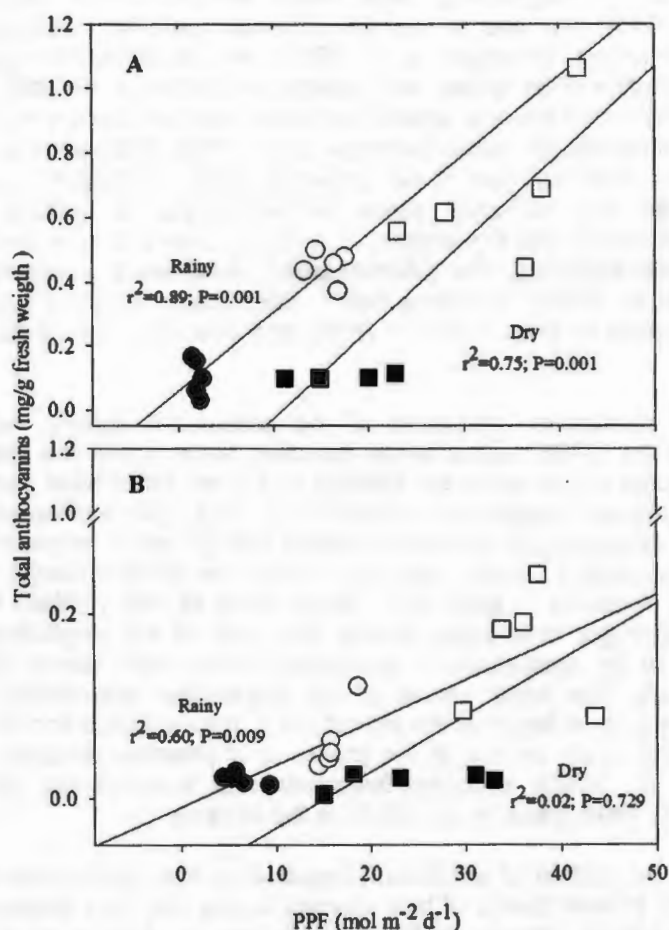


Figure 3.5. Correlation between incident photosynthetic photon flux (PPF) and total anthocyanins for leaves of *T. brachycaulos* (A) and *B. karatas* (B) during the dry and rainy seasons. Open symbols: exposed plants; closed symbols: shaded plants; squares: dry season; circles: rainy season. Regression lines and P values are indicated in the figures (significant at $P<0.05$)

DISCUSSION

Although the average daily PPF above the canopy was slightly higher during the rainy season (mainly because the days were longer), shaded plants of *B. karatas*, and shaded and exposed plants of *T. brachycaulos* received more PPF during the dry season than during the rainy season, because of the deciduousness of neighboring trees. Many tropical rosette plants, often possessing CAM, are able to tolerate extremely wide light intensities and their rapid changes (Merzlyak et al., 2005). In this particular tropical dry forest, *T. brachycaulos* grows and reproduces better in partially shaded microsites within the canopy, where the individuals can capture more water and better dissipate the heat (Cervantes et al., 2005; Andrade et al., 2009). It has been reported that CAM prevents ROS production, controlling photoinhibition and oxidative stress (Niewiadomska & Borland, 2008), nevertheless, during the dry season, *T. brachycaulos* shows a decrease in photosynthetic efficiency and photoinhibition (Graham & Andrade, 2004; Cervantes et al., 2005), indicating that *T. brachycaulos* is more susceptible to over-excitation of photosystem II (PSII) and over reduction of the redox-elements.

The qualitative evaluation of the antioxidant activity, using the reduction of the DPPH radical as an indicator, showed that the antioxidant activity detected in the leaf crude extracts of the two bromeliads was mainly due to their polar components (Table 3.1). This was confirmed by the quantitative determination of the antioxidant activity, which showed that the strongest antioxidant activity occurred in both the crude extracts and the high-polarity fractions (Figure 3.2). Since none of the purified fractions showed a stronger antioxidant activity than that of the originating crude extracts, all of the evaluations of antioxidant activity were carried out using crude extracts. The polar nature of the metabolites responsible for the antioxidant activity detected in the extracts of *T. brachycaulos* and *B. karatas* suggest that it might be due to the presence of phenolic products (Brand-Williams et al., 1995), including flavonoids and anthocyanins (Sánchez-Moreno et al., 1999; Espín et al., 2000), in the extracts.

The production of antioxidant metabolites was very similar for both exposed and shaded plants of both species during the rainy season, which indicates that these species do not increase their production of antioxidant metabolites under higher PPF, when water stress is not a factor. However, the higher antioxidant activity of exposed and shaded plant species during the dry season, suggests that both *T. brachycaulos* and *B. karatas* use their antioxidant defenses under water deficit conditions, as a part of their CAM activity to reduce photo-oxidative damage. These results are in agreement with previous reports from a wide variety of light- and water-stressed plants

in several ecosystems where they use higher amounts of antioxidant metabolites to prevent irreversible oxidative damage (Frankel & Berenbaum, 1999). The increase in antioxidant activity detected in the leaves of exposed plants of *T. brachycaulos* during the dry season can be explained by the fact that under water deficit, the chloroplasts contain greater amounts of ascorbate and display a higher enzymatic activity involved in its metabolism (Potters et al., 2002; Mittler, 2002). In addition to reducing hydrogen peroxide, ascorbate also serves in the de-epoxidation of the xanthophyll cycle and contributes to the dissipation of thermal energy (Peñuelas & Munné-Bosch, 2005; Jung & Niyogi, 2008).

On the other hand, although ecophysiological information about *B. karatas* is scarce, data from other species having a similar ecology, structure and physiology (e.g. *B. humilis*, Medina et al., 1986; *Ananas* species, Borland & Griffiths, 1989; and others terrestrial bromeliads, Medina et al., 1993; *B. karatas*, Reyes-García & Griffiths, 2009), are in agreement with our results. The similar values in antioxidant activity of exposed and shaded plants of *B. karatas*, during both dry and rainy seasons, can be explained by the fact that this terrestrial bromeliad commonly occurs in more exposed locations (Figure 3.1) and has the ability to store water between seasons (Reyes-García & Griffiths, 2009). An effective photoprotection requires a regulated interaction between the use of absorbed light and its dissipation, particularly in CAM plants where the provision of CO₂ and Rubisco activity varies considerably through a diurnal course (Borland et al., 2000). Thus, for *B. karatas*, CAM and water availability confer enough antioxidant protection and this can explain the lower antioxidant activity values shown by the extracts of *B. karatas*, when compared to those of *T. brachycaulos*.

The production of different types of flavonoids has been reported in a number of species of Bromeliaceae (Saito & Harborne, 1983) as a response to high PPF and other stressful conditions (Benzing, 2000). In most cases this response involves the accumulation of anthocyanins (Chalker-Scott, 1999; Gould et al., 2002; 2004). For *T. brachycaulos*, anthocyanins were located in a single layer under the epidermis on both sides of the leaves (Figure 3A); additionally, there were higher anthocyanin concentrations in exposed plants during the dry season, confirming their sunscreen role (Figure 4A). These results suggest that anthocyanins, either on their own or combined with other pigments (e.g. photosynthetic pigments), prevent an excessive light-chlorophyll interaction and play a crucial role in the prevention of oxidative damage. The high correlation between incident daily PPF and total anthocyanin content (Figure 5A) suggests that these molecules are involved in photoprotection as a part of a short-term defense to diminish light-derived reactions and prevent the over-energization and over-reduction in the photosynthetic electron transport, protecting the

photosynthetic apparatus from the effects of photooxidative stress (Gould et al., 2000; Steyn et al., 2002).

Although the red-pigmentation in the adaxial surface of exposed leaves of *B. karatas* also suggested a high anthocyanin content, our results showed a low concentration of these pigments (Figure 3B), in a finding that coincides with reports for other CAM species (Vogh et al., 1999; Close & Beadle, 2003; Merzlyak et al., 2005). For some plant species seemingly devoid of anthocyanins, it has been documented that strong sunlight or a combination of high PPF and water deficit induces a red-pigmentation of the leaves; this pigmentation has been attributed to an accumulation of carotenoids and other flavonoids in the epidermal cells of the plants, to provide protection against radiation in the UV and the shortwave part of the visible spectrum (e.g. in *Aloe arborescens* is a keto-carotenoid: rhodoxantin; Merzlyak et al., 2005). The low level of anthocyanins visualized under the epidermis of exposed plants of *B. karatas* during the dry season (Figure 3B), suggest that these pigments have a limited photoprotection role when this species is subjected to prolonged high PPF. However, although anthocyanin content in exposed plants of *B. karatas* during the dry season was significantly different from that in the rainy season, the linear regression showed that the red coloration was not related to high PPF (Figure 4B), suggesting that the increase in anthocyanin content might be related to water availability (Figure 5B; Steyn et al., 2002). The accumulation of red pigments as a response to a combination of high PPF and water deficit conditions appears to contribute to the tolerance of both bromeliads to prolonged dry periods, since the pigments can absorb a significant portion of light energy (Hatier & Gould, 2007).

The data presented here confirms *B. karatas* as a CAM plant that showed a significantly lower concentration of radiation-protecting anthocyanins compared to *T. brachycaulos*, which produce these pigments for enhanced photoprotection during the dry season. These results indicated that *T. brachycaulos*, because of its epiphytic condition, requires of the activation of additional mechanisms of photoprotection than those needed by terrestrial bromeliads. Still, both CAM species, under high PPF and water deficit conditions, limit oxidative damage by increasing their antioxidant content, as part of a defense mechanism to survive and grow in this tropical dry deciduous forest.

Acknowledgments We are grateful to Gabriel Dzib for field assistance, to Reyes-García, C. and De la Barrera, E. for comments on the manuscript; to Mirna Valdez for statistical assistance and Roger Orellana for your advice. We thank the archeological reserve Dzibilchaltún for support and facilities. This research was partially supported by the grant Fondo

Sectorial SEP-CONACYT 48344/24588 (to JLA) and by FOMIX-Yucatán No. 66262 (to LMPR). C. González-Salvatierra was recipient of a PhD fellowship by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACYT-172810).

REFERENCES

- Andrade, J.L., J.C. Cervera and E.A. Graham** (2009). "Microenvironments, water relations, and productivity of CAM plants", in *Perspectives in biophysical plant ecophysiology. A tribute to Park S. Nobel*, De la Barrera, E. and W.K. Smith (eds). Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico. pp. 95-120.
- Benzing, D.H.** (2000). *Bromeliaceae - Profile of an adaptative radiation*. Cambridge; Gran U.K.
- Borland, A.M.** and H. Griffiths (1989). *The regulation of citric acid accumulation and carbon recycling during CAM in Ananas comosus*. Journal of Experimental Botany, 40, 53-60.
- Borland, A.M., K. Maxwel and H. Griffiths** (2000)." Photosynthesis: Physiology and Metabolism", in *Ecophysiology of plants with crassulacean acid metabolism*. Leegod, R.C., T.D. Sharkey and S. von Caemmerer (eds). Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp. 583-605.
- Brand-Williams, W., M.E. Cuveler and C. Berset** (1995). *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. Food Science and Technology (LWT), 28, 25-30.
- Cervantes, S.E., E.A. Graham and J.L. Andrade** (2005). *Light microhabitats, growth and photosynthesis of an epiphytic bromeliad in a tropical dry forest*. Plant Ecology, 179, 107-118.
- Chalker-Scott, L.** (1999). Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. Photochemistry and Photobiology, 70, 1-9.
- Close, D.C. and C.L. Beadle** (2003). The ecophysiology of foliar anthocyanins. Botanical Review, 69, 149-161.
- Demmig-Adams, B. and W.W. III Adams** (1996). *The role of xanthophylls cycle carotenoids in the protection of photosynthesis*. Trends in Plant Science, 1, 21-26.
- Espín, J.C., C. Soler-Rivas and H.J. Wichers.** (2000). *Characterizations of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical*. Journal of Agriculture Food Chemistry, 48, 648-656.
- Frankel, S. and M. Berenbaum** (1999). *Effects of light regime on antioxidant content foliage in a tropical forest community*. Biotropica, 31, 422-429.
- Gould, K.S., K.R. Markham, R.H. Smith and J.J. Gori.** (2005). *Functional role of anthocyanins in the leaves of Quintina serrata A. Cunn.* Journal of Experimental Botany, 51, 1107-1115.
- Gould, K.S., J. McKelvie and K.R. Markham** (2002). *Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury*. Plant Cell and Environment, 25, 1261-1269.

- Gould, K. (2004). *Nature's swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 5, 314-320.
- Graham, E.A. and J.L. Andrade (2004). *Drought tolerance associated with vertical stratification of two co-occurring epiphytic bromeliads in a tropical dry forest*. American Journal of Botany, 91, 699-706.
- Hatier, J.H.B. and K.S. Gould (2007). *Black coloration in leaves of Ophiopogon planiscapus "Nigrescens". Leaf optics, chromaticity and internal light gradients*. Functional Plant Biology, 34, 130-138.
- Hernández, I., L. Alegre, F.V. Breusegem and S. Munné-Bosch (2009). *How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?* Trends in Plant Science, 14, 125-132.
- Hernández, J.A., C. Escobar, G. Creissen and P.M. Mullineaux (2006). *Antioxidant enzyme induction in pea plants under high irradiance*. Biologia Plantarum, 51, 297-302.
- Jung, H.S. and K.H. Niyogi (2008). "Molecular analysis of photoprotection of photosynthesis", in *Photoprotection, photoinhibition, gene regulation and environment*, Demmig-Adams, B., W.W. III Adams and A.K. Matto (eds). Business Media BV: Springer Science. pp. 127-143.
- Karpinski, S., H. Reynolds, B. Karpinska, G. Wingsle, G. Creissen and P. Mullineaux (1999). *Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in Arabidopsis*. Science, 284, 654-657.
- Krieger-Liszkay, A. and A. Trebst (2006). *Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre*. Journal of Experimental Botany, 57, 1677-1684.
- Krieger-Liszkay, A., C. Fufezan and A. Trebst (2008). *Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism*. Photosynthesis Research, 98, 551-564.
- Lambrev, M., K. Christov and T. Tsonev (2006). *Short-term effect of elevated CO₂ concentration and high irradiance on the antioxidant enzymes in bean plants*. Biologia Plantarum, 50, 617-623.
- Lüttge, U. (2004). *Ecophysiology of crassulacean acid metabolism*. Annals of Botany, 93, 629-652.
- Lüttge, U. (2008). *Physiological ecology of tropical plants*. California: Springer-Verlag, Berlin.
- Martin, E.G. (1994). *Physiological ecology of the Bromeliaceae*. Botanical Review, 60, 1-82.
- Maxwell, K., H. Griffiths, A.M. Borland, M.S.J. Broadmeadow and C.R. McDavid (1992). *Photoinhibitory responses of the epiphytic bromeliad Guzmania monostachia during the dry season in Trinidad maintain photochemical integrity under adverse conditions*. Plant Cell Environ 1992;15:37-47.
- Maxwell, K., H. Griffiths, A. Borland, A. Young, M. Broadmeadow and C. Fordham (1995). *Short-term photosynthetic responses of the C₃*

- CAM epiphyte Guzmania monostachya var. monostachya to tropical seasonal transitions under field conditions*. Australian Journal of Plant Physiology, 22, 771-781.
- Medina, E.,** E. Olivares and M. Díaz (1986). *Water stress and light intensity effects on growth and nocturnal acid accumulation in a terrestrial CAM bromeliad (Bromelia humilis Jacq.) under natural conditions*. Oecologia, 70, 441-446.
- Medina, E.,** M. Popp, E. Olivares, H.P. Janett and U. Lüttge (1993). *Daily fluctuations of titratable acidity content of organic acids (malate and citrate) and soluble sugars of varieties and wild relatives Ananas comosus L. growing under natural tropical conditions*. Plant Cell and Environment, 15, 55-63.
- Merzlyak, M.,** A. Solovchenko and S. Pogosyan (2005). *Optical properties of rhodoxanthin accumulated in Aloe arborescens Mill. leaves under high-light stress with special reference to its photoprotective function*. Photochemistry and Photobiology Science, 4, 333-340.
- Mittler, R.** (2002). *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*. Trends in Plant Science, 7, 405-410.
- Miszalski, Z.,** E. Niewiadomska, I. Ślesak, U. Lüttge, M. Kluge and R. Ratajczak (2001). *The effect of irradiance on carboxylating/decarboxylating enzymes and fumarase activities in Mesembryanthemum crystallinum L. leaves exposed to salinity stress*. Plant Biology, 3, 17-23.
- Molyneux, P.** (2003). *The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*. Songklanakarin Journal Science Technology, 26, 211-219.
- Mondragón, D.,** R. Durán, I. Ramírez and T. Valverde (2004). *Temporal variation in the demography of the clonal epiphyte Tillandsia brachycaulos (Bromeliaceae) in the Yucatán Peninsula, México*. Journal of Tropical Ecology, 20, 189-200.
- Nanjo, F.,** K. Goto, R. Seto, M. Suzuki and Y. Hara (1996). *Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical*. Free Rad Biol Med, 21, 895-902.
- Neff, M.** and J. Chory (1998). *Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B, and cryptochrome 1 during Arabidopsis development*. Plant Physiology, 118, 27-35.
- Niewiadomska, E.,** B. Karpinska, E. Romanowska, I. Ślesak and S. Karpinski (2004). *A salinity –induced C₃-CAM transition increases energy conservation in the halophyte Mesembryanthemum crystallinum L. leaves*. Plant Cell Physiol 2004;45:789-794.
- Niewiadomska, E.** and A.M. Borland (2008). *"Crassulacean acid metabolism: a cause or consequence of oxidative stress in planta?"*, in *Progress in Botany* 69, Lüttge, U., W. Beyschlag and J. Murata (eds). Berlin: Springer-Verlag. pp. 247-266.

- Nobel, P.** (2005). *Physicochemical and environmental plant physiology*. San Diego: Academic Press.
- Orellana, R.** (1999). "Evaluación climática", in *Atlas de Procesos territoriales de Yucatán*, García, A. and J. Córdova (eds). Facultad de Arquitectura. Yucatán, Universidad Autónoma de Yucatán.
- Osmond, B.** and B. Förster (2008). "Photoinhibition: then and now", in *Photoprotection, photoinhibition, gene regulation and environment*, Demming-Adams, B., W.W. III, Adams and A.K. Matto (eds). Springer Science. pp. 11-22.
- Peñuelas, J.,** and S. Munné-Bosch (2005). *Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection*. Trends in Plant Science, 10,166-169.
- Potters, G.,** L. De Gara, H. Asard and N. Horemans (2004). *Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime?* Plant Physiology and Biochemistry, 40, 537-548.
- Ramírez, I.M.,** G. Carnevali and F. Chi (2005). *Gula Ilustrada de las Bromeliaceae de la porción mexicana de la península de Yucatán*. México, Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Reyes-García, C.,** and H. Griffiths (2009). "Ecophysiological studies of perennials of the bromeliaceae family in a dry forest: strategies for survival", in *Perspectives in biophysical plant ecophysiology. A tribute to Park S. Nobel*. De la Barrera, E. and W.K. Smith (eds). México: Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 121-151.
- Saito, N.** and J.B. Harborne (1983). *A cyaniding glycoside giving scarlet coloration in plants of the Bromeliaceae*. Phytochemistry, 22, 1735-1740.
- Sánchez-Moreno, C.,** J.A. Larrauri and F. Saura-Calixto (1999). *Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents*. Food Research International, 32, 407-412.
- Shao, H.B.,** L.Y. Chu, Z.H. Lu and C.M. Kang (2008). *Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells*. International Journal of Biological Sciences, 4, 8-14.
- Ślesak, I.,** Z. Miszalski, B. Karpinska, E. Niewiadomska, R. Ratajczak, and S. Karpinski (2002). *Redox control of oxidative stress responses in the C₃-CAM intermediate plant Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Physiology and Biochemistry, 40, 669-677.
- Steyn, W.J.,** S.J.E. Wand, D.M. Holcroft and G. Jacobs (2002). *Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection*. New Phytologist, 155, 349-361.
- Tanaka, Y.,** N. Sasak and A. Ohmiya (2008). *Biosynthesis of plants pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids*. The Plant Journal, 54, 733-749.

- ter Steege H.** 1996. *WinPhot 5: a programme to analyze vegetation indices, light and light quality from hemispherical photographs*. Trepénbos Guyana Programme: Georgetown Guyana.
- Thien, L.B.,** A.S. Bradburn and A.L. Welden (1982). *The woody vegetation of Dzibilchaltún, a maya archaeological site in Northwest Yucatan, Mexico*. New Orleans: Middle American Research Institute. Tulane University.
- Vogt, T.,** M. Ibdah, J. Schmidt, V. Wray, M. Nimtz and D. Strack (1999). *Light-induced betacyanin and flavonol accumulation in bladder cells of Mesembryanthemum crystallinum*. *Phytochemistry*, 52, 583-592.
- Williams, C.A.** (1978). The systematic implications of the complexity of leaf flavonoids in the Bromeliaceae. *Phytochemistry*, 17, 729-734.
- Yang, Z.,** G. Fan, Z. Gu, Y. Han and Z. Chen. (2008). *Optimization extraction of anthocyanins from purple corn (Zea mays L.) cob using tristimulus colorimetry*. *Eur Food Res Technol*, 227, 409-415.

Capítulo IV

Caracteres morfoanatómicos y antocianinas foliares en dos especies de bromeliáceas de la selva baja caducifolia

INTRODUCCIÓN

Las adaptaciones que capacitan a una planta para sobrevivir a un determinado ambiente son el resultado de continuas presiones selectivas de las condiciones ambientales, las cuales se miden en sus caracteres morfoanatómicos, fisiológicos y bioquímicos (Dickison, 2000). Asimismo, la temperatura, la radiación y la disponibilidad de agua están relacionadas con las características anatómicas de las hojas, las cuales coinciden con tipologías de plantas xeromórficas o mesomórficas (Lindorf, 1994; Lambers et al., 2008). Por otro lado, al tomar los tres sistemas de tejidos foliares: epidermis, mesófilo y tejidos vasculares (Cutler et al., 2007), las características estructurales pueden aportar evidencias adaptativas a condiciones ambientales particulares. Por ejemplo, los factores abióticos inducen alteraciones en algunas estructuras morfológicas de las hojas como el área foliar, la densidad y la apertura estomática, la distribución de los estomas entre las superficies abaxial y adaxial, la densidad de tricomas, así como la síntesis de productos químicos de defensa y otras características anatómicas (Gutschick, 1999).

La aclimatación de las plantas a diferentes niveles de intensidad lumínica, requiere de modificaciones en la estructura de las hojas y muchas especies, además, tienen la capacidad de modular la cosecha de luz y la asimilación de carbono junto con las variaciones en radiación (Anderson, 1986; Anderson et al., 1997; Osborne et al., 1994), independientemente de si son plantas con características de ambiente de sol (alta radiación) o de sombra (baja radiación; Givnish, 1988; Niyogi, 2000; Larcher, 2003). Las plantas que se encuentran bajo condiciones de alta radiación, presentan diferentes tipos de defensa, uno de los cuales incluye la acumulación de metabolitos secundarios de tipo fenólico que actúan como filtros solares. Estos metabolitos, comúnmente flavonoides y particularmente antocianinas, absorben la radiación solar y ultravioleta y poseen características químicas que les permite capturar o desactivar especies reactivas de oxígeno, por lo que a menudo se les considera como eficientes antioxidantes (Blokina et al., 2003; Peñuelas & Munné-Bosch, 2005; Tanaka et al., 2008). Las antocianinas generalmente se observan como pigmentos rojos acumulados en la superficie adaxial de las hojas, específicamente en la epidermis de hojas expuestas, actuando como un filtro oscuro y proporcionando sombra para el mesófilo, protegiendo los cloroplastos de fotoinhibición (Benzing &

Friedman, 1981; Close and Beadle, 2003; Gould et al., 2002; 2004). Aunque las hojas rojas comúnmente se producen en el curso normal de la ontogenia de las plantas, esta pigmentación puede ser también inducida como respuesta al estrés ambiental (Gould et al., 2000; 2002; Lee & Collins, 2001; Merzlyack et al., 2005); se ha demostrado que factores como la alta radiación, las temperaturas extremas, el desbalance mineral, el estrés hídrico, el daño mecánico y el ataque por patógenos aumentan la síntesis de antocianinas en hojas (Chalker-Scott, 1999; Tanaka et al., 2008). Dentro de los flavonoides, las antocianinas son los más abundantes y generalizadas, además son derivadas de la fenilalanina, sintetizadas en el citosol y almacenadas en las vacuolas. Absorben la luz en la longitud de onda larga, y son la base de casi todos los colores en las flores, desde el anaranjado, rosa, rojo, magenta, púrpura y azul. La clave que proporciona la diversidad de color es el grado de oxigenación de las antocianidinas (el cromóforo central de las antocianinas), la naturaleza y el número de sustituyentes (e.g. la porción de azúcares) adheridos a los cromóforos (Fig 4.1; Cooper-Driver, 2001; Davies, 2004).

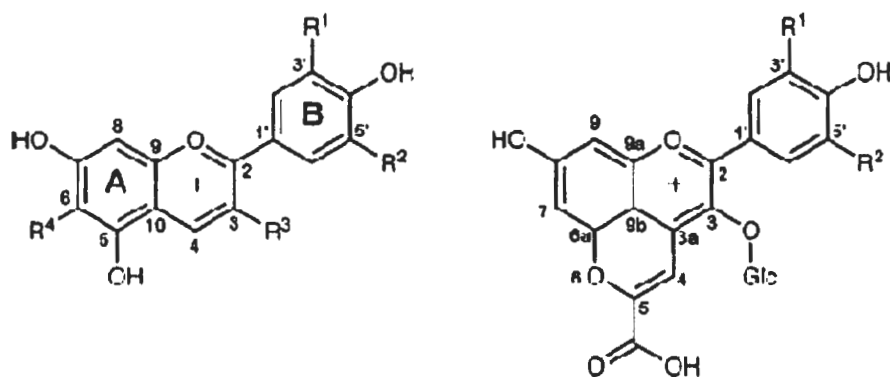


Figura 4.1. Estructura general representativa de la mayoría de las antocianinas encontradas en la naturaleza (izquierda). R^1 y $R^2=OH$; $R^4=H$. Una de las seis antocianinas más comunes: pyranoantocianina (derecha). Tomado de Davies (2004).

El significado funcional de las antocianinas en las hojas de diferentes especies ha sido parte de mucha especulación. La producción de antocianinas es bien conocida en la familia Bromeliaceae (Saito & Harboorne, 1983). Benzing & Friedman (1981), describieron la coloración en las hojas de la familia Bromeliaceae y asignaron su funcionalidad en cinco categorías, de las cuales dos son de nuestro interés: 1) la producción de pigmentación relacionada con la antesis, en donde las antocianinas se producen en las brácteas florales y en hojas que se acercan a la antesis, las

antocianinas se acumulan en las células de ambas superficies de las hojas y su apariencia está acompañada por una considerable disminución en la concentración de clorofilas, destacando el color de las antocianinas; y 2) la producción de antocianinas asociada a la exposición, en donde las hojas presentan una pigmentación homogénea o en parches, principalmente en la superficie adaxial. A diferencia de la primera categoría, la pigmentación por exposición es un carácter constante de las hojas, que a pesar de la edad o de la estación, permanecerá la coloración. Este tipo de pigmentación, en otros grupos de plantas es considerada de protección y teóricamente su función es proteger el mesófilo de intensa radiación y de radiación ultravioleta (Steyn et al., 2002; Close & Beadle, 2003; Peñuelas & Munné-Bosch, 2005; Tattini et al., 2005; Tanaka et al., 2008). La ausencia de antocianinas en las plantas de sombra y su reaparición o intensificación bajo condiciones expuestas apoyan esta controversia. Este tipo de pigmentación ha sido observada en muchas tilandsias atmosféricas y diferentes especies epifitas (e.g. *Aechmea* y *Vriesia*). Por lo tanto, se ha propuesto que algunas especies adaptadas a sitios de sombra utilizan las propiedades reflectivas de las antocianinas para aumentar la fotoasimilación (Lee et al., 1979); en algunos casos, las bromeliáceas han desarrollado eficientes mecanismos fisiológicos y anatómicos para aumentar su fotoprotección (Maxwell et al., 1992; 1995), incluyendo la acumulación de antocianinas en la epidermis de las hojas (Benzing, 2000; Steyn et al., 2002).

La familia Bromeliaceae posee una amplia distribución en un extenso rango de condiciones ambientales (Martin, 1994) y presenta una gran variación morfoanatómica, por lo que los miembros de esta familia representan un buen modelo de estudio de aclimatación ecológica y plasticidad fisiológica a distintos hábitats. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar los parámetros morfoanatómicos relacionados con la tolerancia a radiación de las hojas de dos bromeliáceas CAM, *T. brachycaulos* y *B. karatas*, en condiciones expuestas y de sombra, durante la temporada de sequía, en una selva baja caducifolia. Asimismo, se determinó la distribución anatómica de las antocianinas en hojas de plantas de las dos especies en ambos microambientes, durante las temporadas de lluvia y de sequía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para determinar los caracteres morfoanatómicos de *T. brachycaulos* y *B. karatas* se colectaron 20 hojas maduras de plantas expuestas y bajo sombra, durante la temporada de sequía, en el parque arqueológico Dzibilchaltún. Las hojas fueron conservadas en alcohol glicerinado (alcohol:agua:glicerina, 70:29:1), para su posterior análisis.

Para determinar si la distribución anatómica y la producción de antocianinas en *T. brachycaulos* y *B. karatas* estaban relacionadas con la radiación y la estacionalidad, se colectaron hojas de cinco plantas expuestas y cinco bajo sombra durante las temporadas de lluvia y de sequía. Las hojas fueron colectadas y trasladadas en frío al laboratorio de Química Orgánica del CICY.

Caracteres morfoanatómicos: microscopio óptico

a) Técnica para observar las células de mesófilo (Gaviño et al., 1979). Las hojas colectadas en alcohol glicerinado fueron lavadas y deshidratadas utilizando soluciones con concentraciones progresivas de alcohol etílico (e.g. alcohol al 50%, al 70%, al 90% y alcohol absoluto). Debido a la succulencia de las hojas, éstas se dejaron 24 h en alcohol al 90% y 45 min en las soluciones restantes de alcohol; en alcohol absoluto se realizaron dos inmersiones. Para la aclaración del material vegetal las hojas se colocaron en una mezcla de alcohol etílico absoluto-xilol (1:1) y xilol absoluto, durante una hora para cada uno. Posteriormente, para la infiltración e inclusión en parafina, las muestras en xilol fueron colocadas en parafina-xilol (100 g de parafina, disuelta en 30 mL de xilol) y se colocaron en una estufa a 60 °C durante 24 h. Después de esto, las muestras se colocaron en parafina pura por 24 h y posteriormente fueron fijadas en moldes para tinción de raíces. Finalmente, se realizaron cortes finos con ayuda de un microtomo de rotación (Leica RM2245). Los cortes se hicieron con un grosor de 10 µm y fueron colocados en un portaobjetos en un baño de flotación (60 °C) con 100 mL de agua destilada y 1 g de grenetina, con el fin de extender y fijar las muestras en el portaobjetos. Los portaobjetos se colocaron en una estufa durante diez minutos para derretir y eliminar el exceso de parafina. Las muestras se lavaron dos veces con xilol puro, durante cinco segundos, y, al final, se colocaron en una mezcla de alcohol/xilol (1:1).

Las muestras fueron re-hidratadas, pasando los portaobjetos por soluciones con concentraciones descendentes de alcohol etílico (e.g. 100%,

dos veces, y 70%, una vez). Posteriormente las muestras se tiñeron con safranina al 50% durante dos h; el exceso de colorante se eliminó mediante un lavado con alcohol al 70% y posteriormente se realizó una tinción con el colorante verde rápido al 50%, durante cinco minutos, para contrastar. El exceso de colorante se eliminó lavando los portaobjetos con alcohol al 70%. Las muestras fueron montadas de manera semipermanente con alcohol polivinílico y selladas con esmalte de uñas. Las observaciones al microscopio óptico (Leica EDM) se realizaron utilizando los aumentos 10X y 40X y se tomaron fotografías para cuantificar el número, grosor y diámetro de las capas de células del mesófilo (diferenciando entre parénquima en empalizada e parénquima hídrico), así como para describir la epidermis, el grosor y el número de estratos, y visualizar el tamaño y forma de los canales de aire, además de la distribución y tipo del haz vascular. Las mediciones se hicieron con el programa Acelera Scope. El conteo se realizó por especie y condición de radiación (expuestas/sombra) y se midieron 45 células por tejido (15 células por imagen x 3 imágenes).

b) Técnica de observación de estomas (Ruzin, 1999). Las hojas conservadas en alcohol glicerinado fueron colocadas en cartuchos de tinción de raíces y sumergidas en hipoclorito comercial durante un lapso de cuatro días; después se remojaron en alcohol al 70% por un lapso de 24 h para separar la superficie abaxial de la adaxial y se colocaron sobre un portaobjetos para observar los estomas. Se realizó una tinción con safranina al 50% durante una hora y el exceso de colorante se eliminó con alcohol al 70%; para contrastar se realizó una tinción con verde rápido al 50% durante cinco minutos y el exceso de colorante se eliminó con alcohol al 70%. Estas muestras fueron montadas de manera semipermanente con alcohol polivinílico. Las observaciones se hicieron en el microscopio óptico (Leica EDM). La densidad estomática se evaluó mediante la cuantificación de estomas encontrados en el campo de 10X (área conocida), en tanto que el diámetro de los estomas se calculó mediante observaciones hechas con el aumento de 40X y el área de los estomas se determinó midiendo su largo y ancho. A 40X se estableció también la forma de las células de la epidermis. Todas las descripciones y cuantificaciones se hicieron con la ayuda de fotografía digital y del programa Celera Scope. El conteo se realizó con cinco hojas, en 30 campos, por especie y condición de radiación (expuestas/sombra).

Caracteres morfoanatómicos: microscopio electrónico de barrido (MEB)

Para la descripción de los tricomas y los estomas se realizaron cortes en cuadros de 5 cm² de las hojas y las observaciones se hicieron con ayuda del Microscopio Electrónico de Barrido (MEB). Las muestras fueron deshidratadas utilizando soluciones con diferentes concentraciones de etanol (desde 10% hasta 100%) durante 24 h. Las muestras deshidratadas se secaron a punto crítico con CO₂ (SAMDRI 795, semiautomática) para sustituir el etanol por CO₂ y evitar con esto la deformación de los tejidos. Posteriormente, se realizó el montaje de las muestras en portaobjetos metálicos de cobre para microscopio electrónico. Las muestras secas ya montadas, se cubrieron con una capa de oro-paladio utilizando una metalizadora (Denton Vacuum Desk II). Por último, las muestras se observaron al microscopio electrónico de barrido (MEB; Jeol, JSM-6360LV).

Localización de antocianinas en la lámina foliar

Las hojas recién colectadas de ambas especies fueron seccionadas en tres regiones, realizando cortes transversales a mano preferentemente en las áreas rojas. Las secciones fueron montadas en 10% de sacarosa e infiltradas con HCl 1M, examinando los posibles cambios de color. La localización histológica de la pigmentación roja se realizó mediante la observación de la muestra bajo el microscopio óptico (Leica EDM) y los resultados se documentaron mediante fotografías. Para el análisis, se asumió que la distribución de la coloración roja en la hoja estaba correlacionada con las antocianinas (Gould et al., 2002). El conteo se llevó a cabo con cinco hojas, en 30 campos, por especie y condición de radiación (expuestas/sombra).

RESULTADOS

Caracteres morfoanatómicos: microscopio óptico

En los cortes transversales de las hojas se pueden distinguir las superficies adaxial y abaxial de las hojas de plantas expuestas y de sombra para ambas especies. Tanto *B. karatas* (Figura 4.2) como *T. brachycaulos* (Figura 4.3) presentan epidermis adaxial cutinizada, varias capas de mesófilo compuesto por parénquima hídrico y clorofílico, estomas abaxiales, así como haces vasculares en la parte media del mesófilo que están total o parcialmente rodeados por fibras y canales de aire.

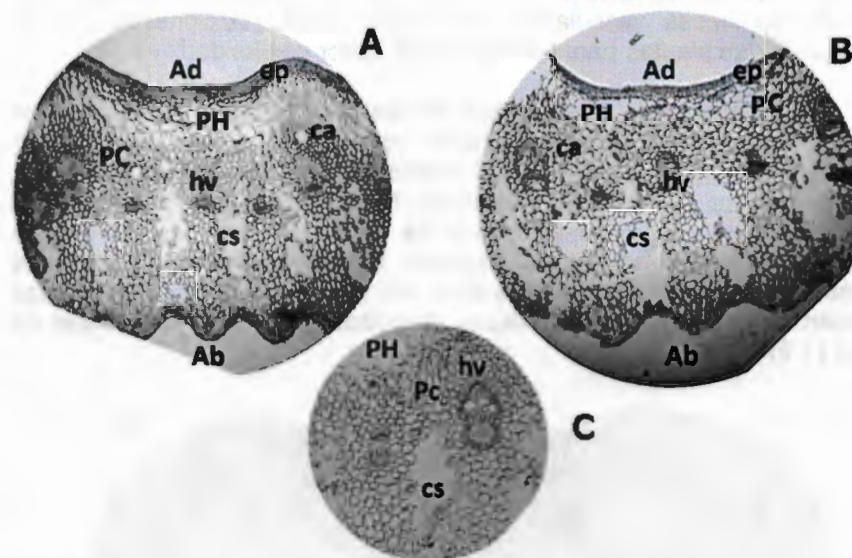


Figura 4.2. Microfotografías de las secciones transversales de hojas montadas en parafina de *B. karatas*. A, sección transversal de hoja expuesta (10x). B, sección transversal de hoja de sombra (10x). C, haz vascular (40x). PH: parénquima hídrico; PC: parénquima clorofílico; hv: haz vascular; ca: canales de aire; Ab: superficie abaxial; Ad: superficie adaxial; ep: epidermis; cs: cavidad subestomática.

Ambas especies presentan caracteres anatómicos propios de una planta CAM, con células del mesófilo grandes y fuertemente compactadas (Nelson et al., 2005). Asimismo, las hojas expuestas y bajo sombra de ambas especies presentan diferencias en cuanto al número de capas

celulares del mesófilo, relacionadas con el patrón distribución del parénquima hídrico y clorofílico (ver cortes frescos, Figuras 4.11-4.15). En *B. karatas* se observa una compactación del parénquima clorofílico hacia la superficie abaxial (Figura 4.2), siendo más compacto y con menor coloración verde en las hojas de plantas expuestas (e.g. cortes transversales frescos, Figura 4.11 A), que en las hojas de plantas de sombra (Figura 4.11 B). De la misma forma, el parénquima hídrico dispuesto bajo la superficie adaxial, es más grueso en las hojas de plantas expuestas que en las de sombra. Por otra parte, en las hojas de plantas expuestas y de sombra de *T. brachycaulos* (Figura 4.3), el parénquima clorofílico se encuentra distribuido en la parte central de la hoja rodeando los haces vasculares, mientras que el parénquima hídrico se observa en ambas superficies de las hojas. Ambas especies presentan canales de aire distribuidos en el parénquima clorofílico, cerca de los haces vasculares, los cuales están relacionados con la capacidad de las plantas para transportar agua por capilaridad.

La epidermis de la superficie abaxial de las hojas de *B. karatas* (Figura 4.4) presenta células epidérmicas redondas y muy pequeñas (Figura 4.4 B), con los estomas localizados dentro de las regiones intercostales, protegidos por los tricomas. En el caso de *T. brachycaulos* (Figura 4.5), sus hojas presentan células epidérmicas de forma rectangular en ambas superficies. Las hojas de ambas especies presentan una cutícula gruesa con una bien desarrollada capa de cera; sin embargo las hojas expuestas presentan un mayor número de capas de cutícula (3-4) que las plantas de sombra (1-2).

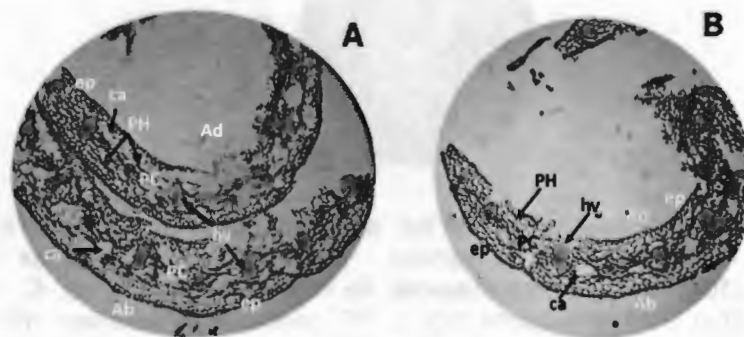


Figura 4.3. Microfotografías de las secciones transversales de hojas montadas en parafina de *T. brachycaulos*. A, sección transversal de hoja expuesta (10x). B, sección transversal de hoja de sombra (10x). PH: parénquima hídrico; PC: parénquima clorofílico; hv: haz vascular; ca: canales de aire; Ab: superficie abaxial; Ad: superficie adaxial; ep: epidermis; cs: cavidad subestomática.

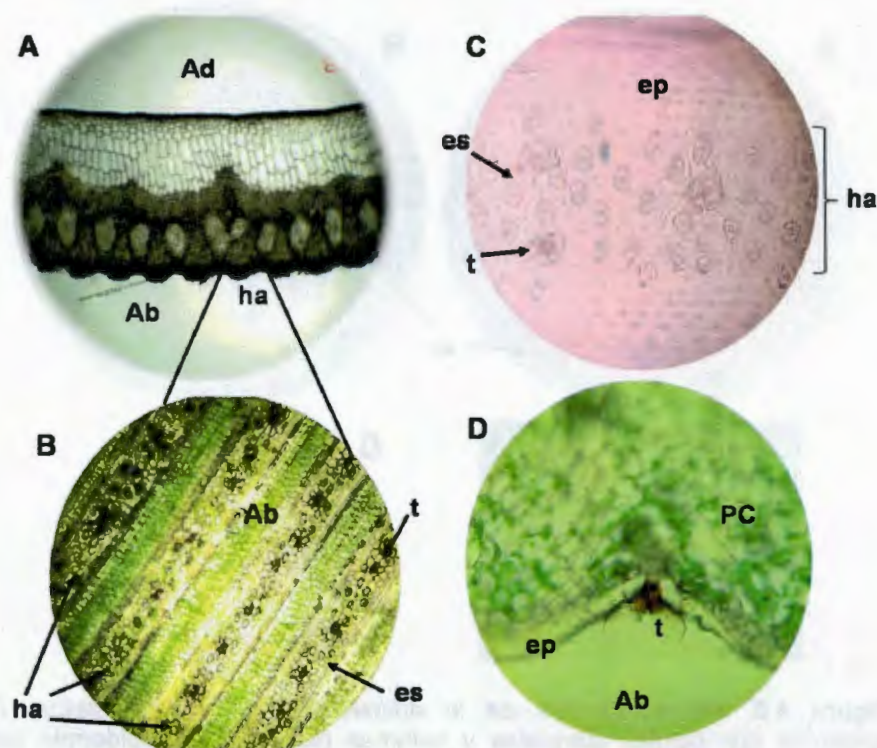


Figura 4.4. Microfotografías de *B. karatas*. **A**, corte transversal hecho a mano de una hoja; **B**, epidermis de una hoja en fresco, en donde se observan las regiones costales e intercostales (**ha**) donde se encuentran los tricomas (**t**, 5x) y los estomas hundidos (**es**); **C**, región intercostal con estomas y tricomas (40x). **D**, corte transversal de un tricoma (**t**, 40x). **ep**: epidermis; **PC**: parénquima clorofílico; **Ab**: superficie abaxial; **Ad**: superficie adaxial; **ep**: epidermis.

Aun cuando los estomas se observaron únicamente en la superficie abaxial de ambas especies; *B. karatas* presenta las características típicas de una planta adaptada a ambientes áridos, con alta densidad estomática y estomas hundidos y pequeños (Figura 4.4), en tanto que *T. brachycaulos* muestra una baja densidad estomática, estomas grandes, y un alto número de tricomas (Figura 4.5).

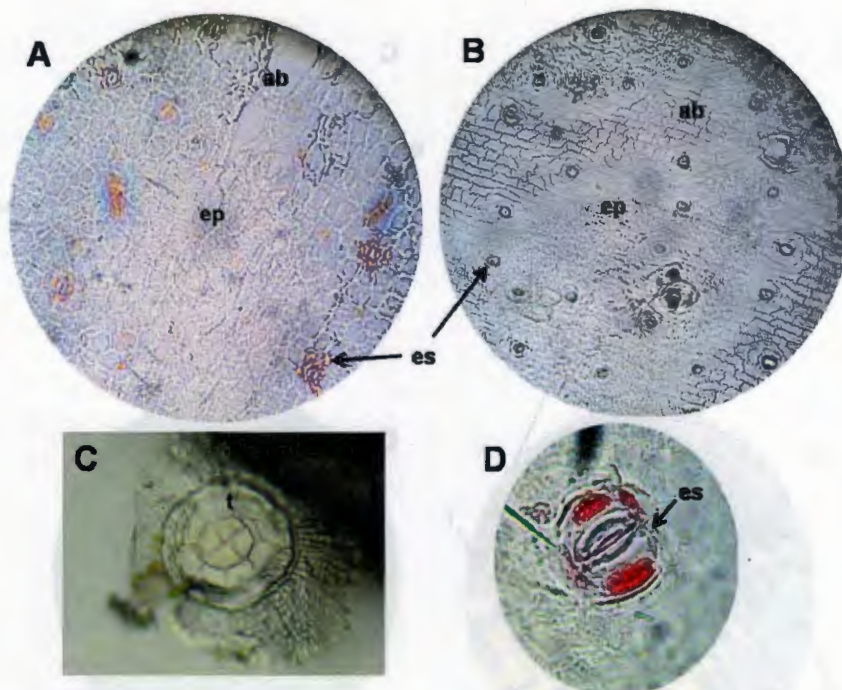


Figura 4.5. Microfotografías de la epidermis de *T. brachycaulos*. **A**, epidermis con células alargadas y estomas (**es**, 10x); **B**, epidermis con estomas y fracciones de tricomas (5x); **C**, tricoma peltado (**t**, 40x) **D**, estoma (**es**, 40x). **ep**: epidermis; **Ad**: superficie adaxial.

En ambas especies se observaron tricomas peltados sobre la epidermis de las hojas; mientras que en las hojas de *T. brachycaulos* se encontraron tricomas distribuidos sobre ambas superficies, en las hojas de *B. karatas* solo se encontraron en la superficie abaxial. Los tricomas de *B. karatas* se distinguieron por la presencia de una pigmentación anaranjada en las vacuolas de las células basales (Figura 4.4 D).

Caracteres morfoanatómicos: MEB

Las observaciones realizadas con el MEB permitieron distinguir con mayor detalle la morfología de los tricomas en ambas especies (Figuras 4.6 y 4.8) y los estomas en las hojas de *B. karatas* (Figura 4.7). Las hojas de *B. karatas*, se distinguen por contar con regiones costales e intercostales en la región abaxial (Figura 4.6), los tricomas se encuentran distribuidos en hileras longitudinales, sobre las regiones intercostales, y cuentan con células del ala y un disco central, el cual es poco sobresaliente.

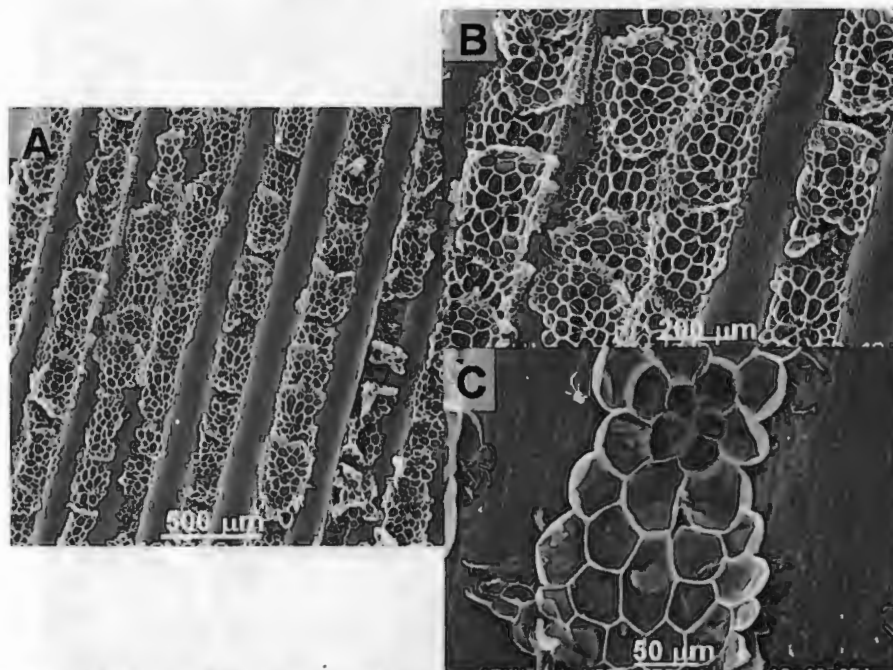


Figura 4.6. Superficie abaxial de hojas de *B. karatas*; microfotografías del microscopio electrónico de barrido (MEB). **A**, vista general de los tricomas agrupados en hileras longitudinales, sobre las regiones intercostales; **B**, tricomas distribuidos en la regiones intercostales; **C**, tricoma. La línea blanca al centro representa la escala.

Las micrografías del MEB revelan que los estomas de *B. karatas* se encuentran dentro de las regiones intercostales, dispuestos en depresiones (debajo de las células epidérmicas), cubiertos por las alas de los tricomas, y presentan una distribución continua (Figura 4.7).

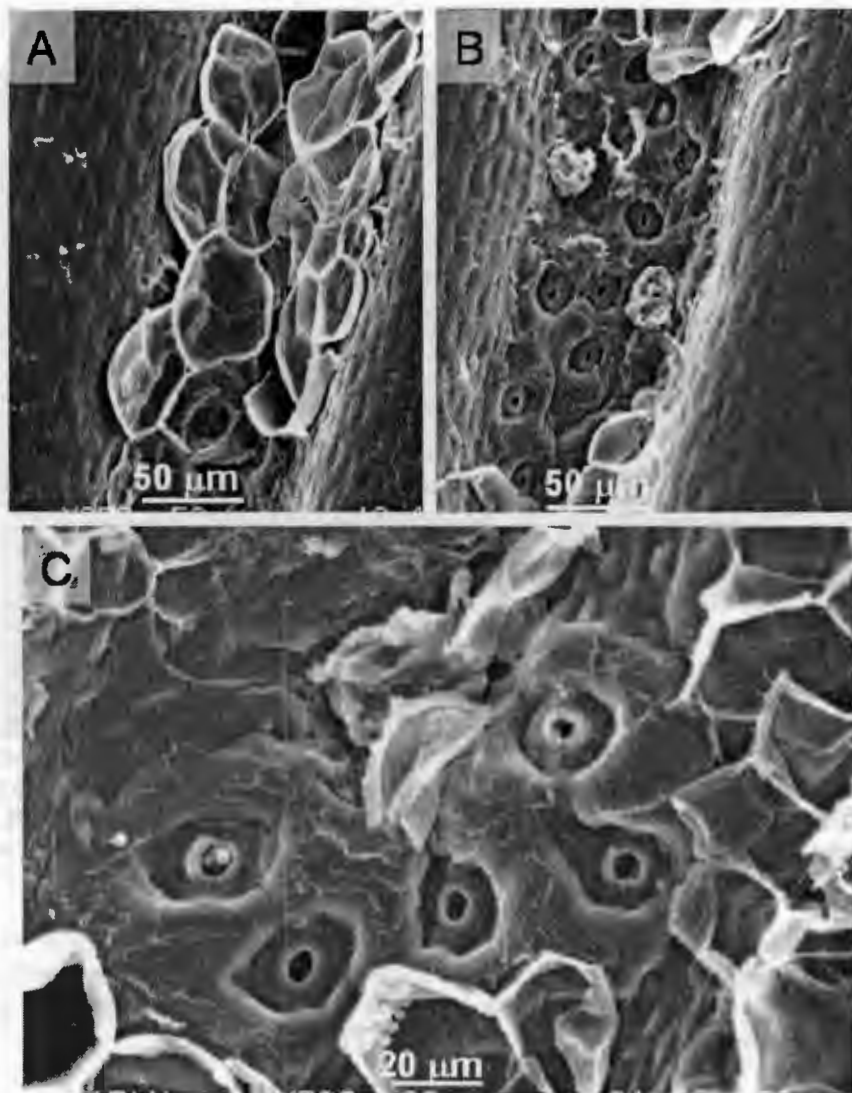


Figura 4.7. Superficie abaxial de hojas de *B. karatas*; microfotografías del microscopio electrónico de barrido (MEB). A, Tricomas protegiendo los estomas; B, detalle de los estomas hundidos dentro de las regiones intercostales; C, estomas en depresión, por debajo de la epidermis.

Poro otra parte, a simple vista, los tricomas de *T. brachycaulos* pueden distinguirse como una capa blanca cubriendo la epidermis de las hojas. Las observaciones en el MEB mostraron un arreglo acorazado de los

tricomas, en un complejo de estructuras multicelulares, donde cada tricoma consiste de un ala externa (Figura 4.8). Cabe mencionar que los estomas de *T. brachycaulos* no pudieron ser observados bajo el MEB.

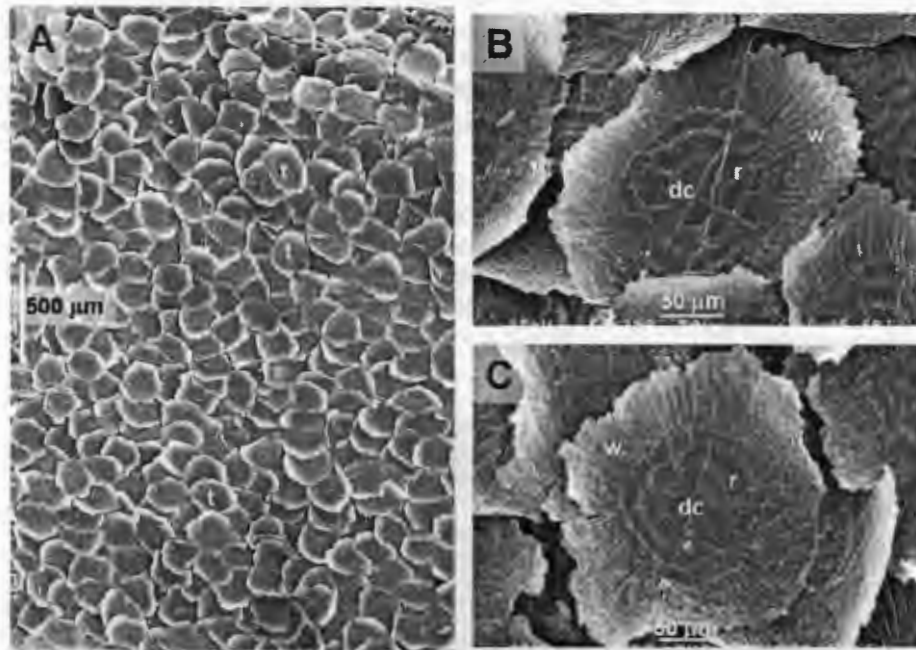


Figura 4.8. Superficie adaxial de hojas de *T. brachycaulos*; microfotografías del microscopio electrónico de barrido (MEB). **A**, vista general de los tricomas (t) cubriendo la hoja; **B** y **C**, detalle de los tricomas, donde puede distinguirse que el disco central (dc) se compone de cuatro células, dos filas de células fuera del anillo central (r), y su ala externa (w).

Localización de antocianinas en la lamina foliar

Bajo condiciones de campo, durante la temporada de sequía, las hojas expuestas de *T. brachycaulos* y *B. karatas* presentan una pigmentación roja, sugiriendo la acumulación de antocianinas como una respuesta de fotoprotección (Figuras 4.9 y 4.10). Se ha documentado que los flavonoides, como las antocianinas, también tienen la función de atraer polinizadores y por lo tanto se desarrollan cuando las plantas se encuentran en período reproductivo (Benzing and Friedman, 1981; Benzing, 2000). Para diferenciar la producción de antocianinas como una respuesta de fotoprotección o de desarrollo reproductivo, en el campo se observó que las plantas que no se encontraban en período reproductivo presentaron una pigmentación roja heterogénea y de baja intensidad (Figura 4.9 B y 4.10 A y B), en tanto que las plantas en período reproductivo presentaron, además de inflorescencia, una pigmentación roja homogénea e intensa (Figura 4.9A y 4.10C).



Figura 4.9. Pigmentación roja de las hojas de *T. brachycaulos* en condiciones de campo. **A**, individuo en temporada reproductiva; **B**, individuo expuesto sin floración.



Figura 4.10. Pigmentación de las hojas de *B. karatas* en condiciones de campo. **A**, individuo expuesto; **B**, superficie adaxial de las hojas de una planta expuesta; y **C**, individuo al inicio del período de floración.

Al realizar cortes transversales de las hojas de ambas especies que no se encontraban en estado reproductivo, e infiltrar los tejidos con HCl 1 M se observó un aumento en la intensidad y duración de la pigmentación roja (Figura 4.11), indicando la presencia de antocianinas (Davies, 2004); observándose una mayor proporción de pigmentación en las hojas de plantas expuestas durante la temporada de sequía. La ausencia de color, o la presencia de una coloración verde en los tejidos, que no intensifican la pigmentación al contacto con el ácido, indica, como en el caso de las plantas bajo sombra, insuficiencia de antocianinas (Gould et al., 2000).

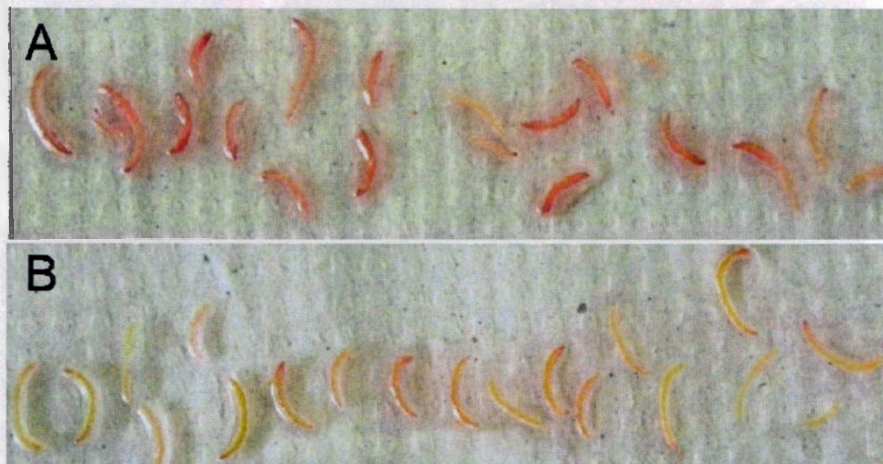


Figura 4.11. Cortes transversales de hojas de *T. brachycaulos* colectadas durante la temporada de sequía, en los que se puede distinguir la pigmentación roja que corresponde a la presencia de antocianinas. **A**, cortes de plantas expuestas; y **B**, cortes de plantas bajo sombra.

Para determinar la distribución de las antocianinas en los cortes transversales al microscopio, se encontró que los pigmentos se localizaron principalmente en los cortes de las hojas expuestas de ambas especies durante la temporada de sequía; las antocianinas se observaron como plastidios de color rojo dentro de las vacuolas celulares en la epidermis adaxial de *B. karatas* (Figura 4.12), y en la epidermis abaxial y adaxial de *T. brachycaulos* (Figura 4.13). Las hojas de las plantas bajo sombra de ambas especies, durante la temporada de sequía, también presentaron una pigmentación roja, aunque de menor intensidad que las plantas expuestas.

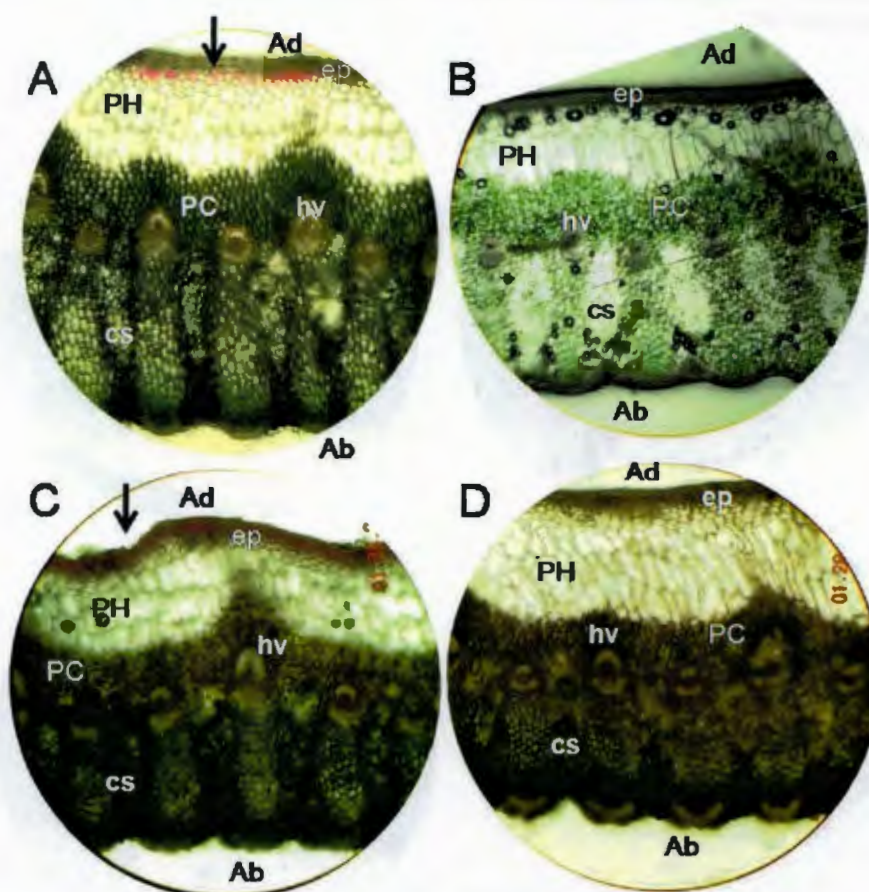


Figura 4.12. Microfotografías de las secciones transversales de hojas de plantas expuestas y de sombra de *B. karatas*. **A**, sección transversal de hoja expuesta (10x) y **B**, sección transversal de hoja de sombra (10x), durante la temporada de lluvia. **C**, sección transversal de hoja expuesta (10x) y **D**, sección transversal de hoja de sombra (10x), durante la temporada de sequía. **PH**: parénquima hídrico; **PC**: parénquima clorofílico; **hv**: haz vascular; **ca**: canales de aire; **Ab**: superficie abaxial; **Ad**: superficie adaxial; **ep**: epidermis; **cs**: cavidad subestomática. Las flechas indican la localización de las antocianinas.

Para el caso de las plantas expuestas de *B. karatas*, la infiltración del tejido con HCl 1M no resultó en un aumento en la pigmentación, indicando que la pigmentación observada no está relacionada con la

presencia de antocianinas, sino a la de otros pigmentos (e.g. flavonoides o carotenoides).

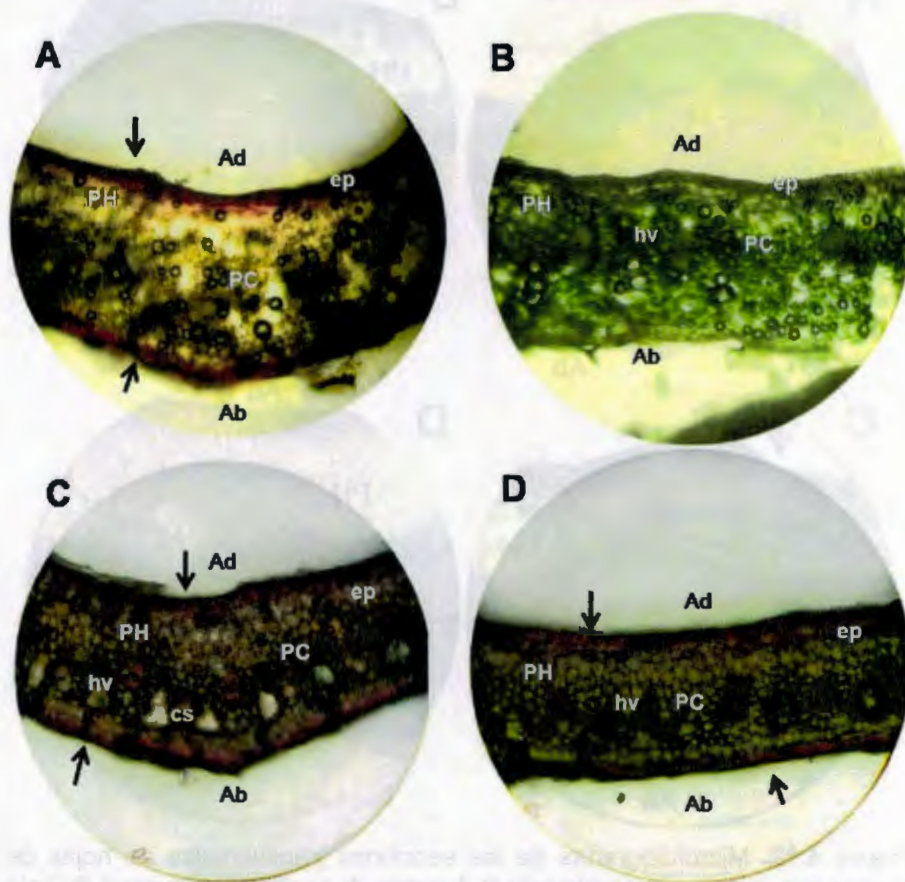


Figura 4.13. Microfotografías de las secciones transversales de hojas de plantas expuestas y de sombra de *T. brachycaulos* en condiciones de campo. **A**, sección transversal de hoja expuesta (10x) y **B**, sección transversal de hoja de sombra (10x), durante la temporada de lluvia. **C**, sección transversal de hoja expuesta (10x) y **D**, sección transversal de hoja de sombra (10x), durante la temporada de sequía. **PH**: parénquima hídrico; **PC**: parénquima clorofílico; **hv**: haz vascular; **ca**: canales de aire; **Ab**: superficie abaxial; **Ad**: superficie adaxial; **ep**: epidermis; **cs**: cavidad subestomática. Las flechas indican la localización de las antocianinas.

Adicionalmente, en los cortes transversales de plantas expuestas (Figura 4.13 C y 4.14 B) y de sombra (Figura 4.13 D y 4.14 A) de *T. brachycaulos*, se observó que el periciclo de los haces vasculares contenía una pigmentación roja, que podría estar relacionada con la producción de antocianinas.

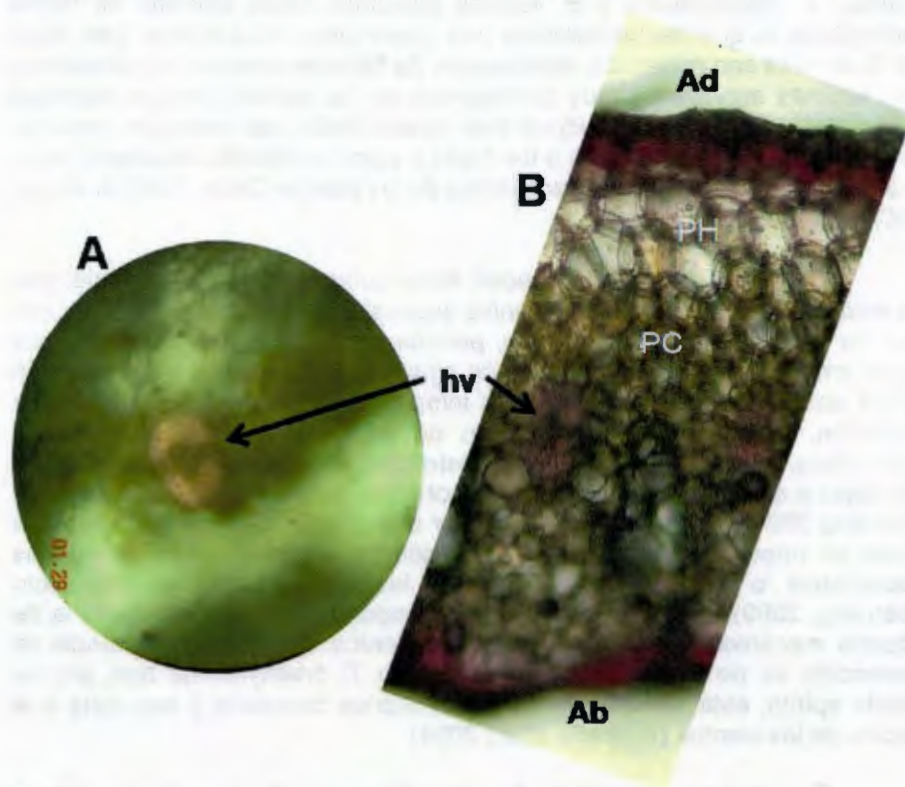


Figura 4.14. Microfotografías de las secciones transversales de hojas de *T. brachycaulos* en condiciones de campo, durante la temporada de sequía, en donde el periciclo de los haces vasculares contiene pigmentos rojos. **A**, Haz vascular (hv) de una planta bajo sombra (40x, aumentado con el lente de la cámara) y **B**, Haces vasculares de una planta expuesta (40x). **PH**: parénquima hídrico; **PC**: parénquima clorofílico; **Ab**: superficie abaxial; **Ad**: superficie adaxial; **ep**: epidermis.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Debido a que la morfogénesis de las hojas lleva un tiempo largo, los posibles cambios morfoanatómicos experimentados por ambas especies como consecuencia de las variaciones estacionales, no fueron tomados en cuenta. *T. brachycaulos* y *B. karatas* presentan hojas alternas de forma lanceolada, lo que les proporciona una menor área fotosintética. Las hojas de *B. karatas* son coriáceas, compuestas de fibras resistentes a la tracción y con espinas curvadas y muy puntiagudas en los bordes. Ambas especies presentan un parénquima hídrico bien desarrollado, con vacuolas grandes, lo que les confiere succulencia a las hojas y cuya función de almacenar agua y ácidos orgánicos es una característica de las plantas CAM (Smith & Wood, 1998; Nelson et al., 2005).

Las hojas de ambas especies están cubiertas con una cutícula, que es más gruesa en las hojas de plantas expuestas; una cutícula gruesa, junto con un amplio parénquima hídrico, permite un mejor aprovechamiento del agua, evitando la pérdida de vapor de agua por transpiración o funcionando como aislante, controlando las altas temperaturas ocasionadas por la alta radiación. La cutícula sirve también de protección contra la radiación ultravioleta, y contribuye a reducir la retención de agua en la superficie de las hojas y a minimizar el depósito de polvo, polen o partículas suspendidas (Benzing 2000; Pierce et al., 2001; Cutler et al., 2007). Asimismo, la cutícula juega un papel importante en la protección de la planta contra patógenos bacterianos o fúngicos y participa en las interacciones planta-insecto (Benzing, 2000). Finalmente, una función importante de la cutícula es la de soporte mecánico contra la acción de los vientos. Esta última estrategia de protección es de particular importancia para *T. brachycaulos* que, por su hábito epífito, está sometida a un estrés hídrico constante y expuesta a la acción de los vientos (Andrade et al., 2004).

En algunas especies de bromeliáceas, la importancia de la epidermis está dada por su participación en el intercambio de gases y, por consecuencia, en la tolerancia a la sequía; las plantas expuestas de *T. brachycaulos* y *B. karatas* presentan células epidérmicas arregladas en dos a tres capas, de forma aplanada y sinuosa. Las células epidérmicas sinuosas permiten el aumento de superficie de contacto entre las células, lo que confiere una mayor resistencia al tejido epidérmico durante las expansiones o contracciones foliares (e.g. variación en la turgencia; Proença & Sajo, 2007). Por otra parte, la forma de las células epidérmicas influye también sobre la pigmentación; por lo que las células aplanadas pueden intervenir en las propiedades ópticas de los pigmentos y, por lo tanto, en la percepción del color (Mol et al., 1998).

En ambas especies se observó que el mesófilo está diferenciado en parénquima hídrico y clorofílico; mientras que en las hojas de *T. brachycaulos* el parénquima hídrico se presenta poco diferenciado, en *B. karatas* está diferenciado y presenta una distribución adaxial sobre el parénquima clorofílico. El parénquima hídrico tiene la función de almacenar el agua que es absorbida por los tricomas, proporcionando sombra al parénquima clorofílico (Sajo et al., 1998; Proença & Sajo, 2007) y favorece la fotosíntesis al mantener hidratado el tejido fotosintético durante la temporada de sequía (Zotz & Hietz, 2001). En las hojas de *B. karatas* el parénquima clorofílico presenta células en empalizada bien diferenciadas, siendo más grueso y compacto en las plantas expuestas, y más disperso en las plantas de sombra, presentando una alta densidad de cloroplastos. Se ha reportado que una diferenciación y distribución del parénquima clorofílico similar a la observada en *B. karatas*, aunado a la presencia de carotenoides, puede modular de manera significativa la captura de luz (Tardy et al., 1998).

A lo largo del mesófilo, dentro del parénquima clorofílico de ambas especies, se observaron canales de aire; para el caso de bromeliáceas como *T. brachycaulos* y *B. karatas*, que crecen en un ambiente de constante estrés hídrico, los canales de aire, que tienen la función de transportar agua por capilaridad desde el parénquima hídrico hacia la raíz (Scatena & Segecin, 2005), representan una estrategia eficiente de transporte de agua (Smirnoff & Crawford, 1983; Segecin & Scatena, 2004). Los canales se encuentran conectados a las cámaras subestomáticas que, además de conferir una mayor flexibilidad, permiten una mayor circulación de gases en el interior de las hojas (Mauseth, 1988). Por otro lado, en el parénquima clorofílico de ambas especies los haces vasculares son colaterales y están dispuestos en una serie única, en donde los de mayor calibre se alternan con los de menor calibre; estos haces vasculares se encuentran rodeados por fibras y células parenquimáticas, formando casquetes, sugiriendo una endodermis o periciclo (Figura 4.14). Se ha propuesto que la endodermis o periciclo juega un papel importante en la distribución de agua y solutos hacia el mesófilo, además de servir de sostén y protección de los ejes vasculares (Sajo et al., 1998; Sousa et al., 2005).

En cuanto a los estomas, mientras *T. brachycaulos* presenta estomas grandes en ambas superficies de las hojas, *B. karatas* presenta una alta densidad estomática, con estomas hundidos y pequeños, únicamente en la superficie abaxial. La presencia de estomas en ambas superficies de las hojas, como en el caso de *T. brachycaulos*, permite aumentar la conductancia de CO₂ en el mesófilo; este tipo de estrategia es frecuente en bromeliáceas del género *Tillandsia* consideradas como atmosféricas extremas (Proença & Sajo, 2007). Los estomas de *T. brachycaulos* se encuentran protegidos por una gruesa capa de tricomas

epidérmicos, distribuidos al azar y sobrepuestos en ambas superficies de las hojas. Muchas especies de la subfamilia Tillandsioideae que no cuentan con raíces de absorción, utilizan los tricomas como el órgano principal de absorción de nutrimentos y agua a través de las hojas; los tricomas reducen también la pérdida de agua durante la temporada de sequía y son altamente eficientes para obtener agua de la neblina y del rocío (Andrade, 2003; Graham & Andrade, 2004; Cutler et al., 2007; Ohri et al., 2007; Lüttge, 2008; Reyes-García & Griffiths 2009). Una alta densidad de tricomas, combinada con la morfología y la posición de los tricomas sobre los estomas, además de prevenir la pérdida de agua, ayuda a dispersar la luz y a disminuir la temperatura de las hojas, además de mayor eficiencia fotosintética (Nagata et al., 1999; Benzing, 2000; Benz & Martin, 2006). Estas características les ha permitido a las bromeliáceas epifitas colonizar hábitats xéricos (Benzing, 2000). Por otra parte, en el caso de *B. karatas*, una bromeliácea de hábito terrestre con raíces capaces de obtener agua del suelo, presentan una baja densidad de tricomas, distribuidos en hileras longitudinales sobre las regiones intercostales de la superficie abaxial, en donde se encuentran alojados los estomas. La baja densidad de tricomas de *B. karatas*, como uno de los caracteres adaptativos a ambientes áridos de la mayoría de las especies de la subfamilia Bromeliodeae (Benzing, 2000), tienen como función principal disminuir la transpiración protegiendo a los estomas contra la desecación (Proença & Sajo, 2007).

Al evaluar la posible presencia de antocianinas en los cortes transversales de hojas expuestas y bajo sombra de *T. brachycaulos* y *B. karatas*, durante las temporadas de lluvia y sequía, se encontró que estos pigmentos ocurren únicamente en las hojas de *T. brachycaulos*, en tanto que los pigmentos detectados en las hojas de *B. karatas*, corresponden a otro tipo de metabolitos no fotosintéticos. Adicionalmente se encontró que en las hojas de plantas expuestas de *T. brachycaulos* durante la temporada de sequía, las antocianinas se localizan en la epidermis abaxial y adaxial, así como en los casquetes de las haces vasculares. Durante la temporada de lluvia también se encontraron antocianinas, aunque en menor proporción. Lo anterior confirma que el contenido de antocianinas está relacionado con un aumento en la exposición de las plantas a altos niveles de radiación y a la disminución de la disponibilidad de agua, indicando que la función de estos pigmentos es la protección de los cloroplastos durante períodos de alto flujo de fotones o estrés hídrico (Chalker-Scott, 1999; Peñuelas & Munné-Bosch, 2005; Tattini et al., 2005; Zhang et al., 2006; Gould et al., 1995; Cooper-Driver, 2001). En el caso de *B. karatas*, una planta adaptada a sitios abiertos y por lo tanto a condiciones de alta radiación, su bajo contenido de antocianinas y la intensa pigmentación roja sobre la epidermis adaxial de las hojas de plantas expuestas durante la temporada de sequía, sugiere que la pigmentación roja está relacionada con otros metabolitos

(e.g. flavonoides o rodoxantina; Capítulo III; Davies, 2004; Merzlyak et al., 2005) que tienen la misma función que las antocianinas (Rhodes & Nadolska-Orvzyk, 2001; Cutler et al., 2004; Tanaka et al., 2008).

El aumento en el contenido de antocianinas observado en las hojas expuestas de *T. brachycaulos* durante la temporada de sequía, combinado con la disminución en la concentración de clorofilas totales y el aumento en carotenoides, confirma que las antocianinas pueden actuar en combinación con otros pigmentos de fotoprotección, compensando las deficiencias de los pigmentos fotosintéticos durante el período de estrés (Davies, 2004; Peñuelas & Munné-Bosch, 2005; Tanaka et al., 2008). Por otra parte, y aunque la acumulación de antocianinas en las hojas de una planta en particular puede variar con la estación, el ambiente, y entre los individuos de una población o entre las hojas de una misma planta (Hoch et al., 2001, Tanaka et al 2008), los resultados obtenidos confirman que la producción de este tipo de metabolitos secundarios está relacionada con sustratos oligotróficos y con altos niveles de radiación (Cooper-Driver, 2001; Davies, 2004; Hernández et al., 2009).

Las hojas corresponden a los órganos de las plantas con mayor plasticidad, por lo tanto los factores físicos del ambiente se ven reflejados en sus características morfoanatómicas; atributos como la cutícula y epidermis engrosada, el parénquima hídrico y CAM, les permiten a *B. karatas* y *T. brachycaulos* conserva potenciales hídricos diurnos elevados, minimizando la pérdida de agua. Los caracteres xeromórficos encontrados en ambas especies, como en el caso de otras bromeliáceas, les han permitido habitar ambientes extremos y representan adaptaciones relacionadas a la economía del agua. Las estrategias anatómicas y fisiológicas especializadas de ambas bromeliáceas están relacionadas con su tolerancia a la radiación y su capacidad para enfrentar limitaciones hídricas y de nutrimentos durante la temporada de sequía en la selva baja caducifolia.

REFERENCIAS

- Anderson J.M.** (1986). *Photoregulation of the composition, function and structure of thylakoid membranes*. Annual Review of Plant Physiology, 37, 93-136.
- Anderson, J.M.,** G.D. Price, W.S. Chow, A.B. Hope and M.R. Badger (1997). *Reduced levels of cytochrome bf complex in transgenic tobacco leads to marked photochemical reduction of the plastoquinone pool, without significant change in acclimation to irradiance*. Photosynthesis Research, 53, 215-227.
- Andrade, J.L.** (2003). *Dew deposition on epiphytic bromeliad leaves: an important event in a Mexican tropical dry deciduous forest*. Journal of Tropical Ecology, 19, 479-488.
- Andrade, J.L.** E.A. Graham and G. Zotz (2004). "Determinantes morfofisiológicos y ambientales de la distribución de epifitas en el dosel de bosques tropicales", in *Fisiología ecológica en plantas. Mecanismos y respuestas a estrés hídrico en los ecosistemas*, Marino, H. (ed). Valparaíso, Chile. pp.139-156.
- Benz, B.W.** and C.E. Martin (2006). *Foliar trichomes, boundary layers, and gas exchange in 12 species of epiphytic Tillandsia (Bromeliaceae)*. Journal of Plant Physiology, 163, 648-656.
- Benzing, D.H.** and W.E. Friedman (1981). *Patterns of foliar pigmentation in Bromeliaceae and their adaptative significance*. Selbyana, 5, 224-240.
- Benzing, D.H.** (2000). *Bromeliaceae - Profile of an adaptative radiation*. Cambridge University Press, Cambridge, Gran Bretaña.
- Blokhina, O.,** E. Virolainen and K.V. Fagersted (2003). *Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review*. Annals of Botany, 91, 179-194.
- Chalker-Scott, L.** 1999. *Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses*. Photochemistry and Photobiology, 70, 1-9.
- Close, D. C.** and C.L. Beadle (2003). *The ecophysiology of foliar anthocyanins*. The Botanical Review, 69(2), 149-161.
- Cooper-Driver, G.A.** (2001). *Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins*. Phytochemistry, 56, 229-236.
- Cutler D.F,** C.E.J. Botha and D.W. Stevenson (2007). *Plant Anatomy: an applied approach*. Blackwell Publishing.
- Davies, K.M.** (2004). *Plants pigments and their manipulation*. Oxford: Blackwell Publishing. 352 pp.
- Demmig-Adams, B.** and W.W. Adams III (1996). *The role of xanthophylls cycle carotenoids in the protection of photosynthesis*. Trends in Plant Science, 1, 21-26.
- Dickison, W.C.** (2000). *Integrative Plant Anatomy*. USA, Academic Press. 533 pp.

- Gaviño, G., J.C. Juárez and H.H. Figueroa. 1979. *Técnicas biológicas selectas de laboratorio y de campo*. Editorial LIMUSA. México, D.F.
- Givnish, T.J. (1988). *Adaptation to sun and shade: a whole-plant perspective*. Australian Journal of Plant Physiology, 15, 63-92.
- Gould K.S., D.N. Kuhn, D.W. Lee and S.F. Oberbauer (1995). *Why leaves are sometimes red*. Nature, 378, 241-242.
- Gould, K.S., K.R. Markham, R.H. Smith and J.J. Goris (2000). *Functional role of anthocyanins in the leaves of Quintinia serrata A. Cunn.* Journal of Experimental Botany, 51, 1107-1115.
- Gould, K.S., J. McKelvie and K.R. Markham (2002). *Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury*. Plant Cell and Environment, 25, 1261-1269.
- Gould, K. (2004). *Nature's swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves*. J Biom Biotech, 5, 314-320.
- Graham, E.A. and J.L. Andrade (2004). *Drought tolerance associated with vertical stratification of two co-occurring epiphytic bromeliads in a tropical dry forest*. American Journal of Botany, 91, 699-706.
- Gutschick, V.P. (1999). *Biotic and abiotic consequences of differences in leaf structure*. New Phytologist, 143, 3-18.
- Givnish, T.J. (1988). *Adaptation to sun and shade: a whole-plant perspective*. Journal of Plant Physiology, 15, 63-92.
- Hernández, I., L. Alegre, F.V. Breusegem and S. Munné-Bosch (2009). *How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? Trends in Plant Science*, 14, 125-132.
- Hoch, W.A., E.L. Zeldin and B.H. McCown (2001). *Physiological significance of anthocyanins during autumnal leaf senescence*. Tree Physiology, 21, 1-8.
- Lambers, H.F., S. Chapin III and T.L. Pons (2008). *Plant Physiological Ecology*. New York, Springer-Verlag.
- Larcher, W. (2003). *Physiological Plant Ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups*. 4th Edition. Springer.
- Lee, D.W., J.B. Lowry and B.C. Stone (1979). *Abaxial anthocyanins layer in leaves of tropical rain forest plants: enhancer of light capture in deep shade*. Biotropica, 11, 70-77.
- Lee D.W. and T.M. Collins (2001). *Phylogenetic and ontogenetic influences on the distribution of anthocyanins and betacyanins in leaves of tropical plants*. International Journal of Plant Science, 162, 1141-1153.
- Lindorf, H. (1994). *Eco-anatomical wood features of species from a very dry tropical forest*. IAWA Journal, 15, 361-376.
- Long S.P., S. Humphries and P.G. Falkowski (1994). *Photoinhibition of photosynthesis in nature*. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 45, 633-662.

- Lüttge, U.** (2008). *Physiological ecology of tropical plants*. California: Springer-Verlag Berlin.
- Martin, E.G.** (1994). *Physiological ecology of the Bromeliaceae*. Botanical Review, 60, 1-82.
- Maxwell, C., H. Griffiths, A.M. Borland., M.S.J. Broadmeadow and C.R. McDavid** (1992). *Photoinhibitory responses of the epiphytic bromeliad Guzmania monostachia during the dry season in Trinidad maintain photochemical integrity under adverse conditions*. Plant, Cell and Environment, 15, 37-47.
- Maxwell, K., H. Griffiths, A. Borland, A. Young, M. Broadmeadow and C. Fordham** (1995). *Short-term photosynthetic responses of the C₃-CAM epiphyte Guzmania monostachya var. monostachya to tropical seasonal transitions under field conditions*. Australian Journal of Plant Physiology, 22, 771-781.
- Maxwell, K. and G. Johnson** (2000). *Chlorophyll fluorescence –a practical guide*. Journal of Experimental Botany, 51, 659-668.
- Mauseth, J.D.** (1988). *Plant Anatomy*. USA, The Benjamin/Cummings Publishing.
- Merzlyak, M., A. Solovchenko and S. Poghosyan** (2005). *Optical properties of rhodoxanthin accumulated in Aloe arborescens Mill. leaves under high-light stress with special reference to its photoprotective function*. Photochemistry and Photobiology, 4, 333-340.
- Mol, J., E. Grotewold and R. Koes** (1998). *How genes paint flowers and seeds*. Trends in Plant Sciences, 3, 212-217.
- Mollinedo, P.A.** (2006). *Antioxidant activity of Bolivian plant secondary metabolites*. [PHD Thesis]. Lund, Sweden: Lund University.
- Nagata, T., S. Todoriki, T. Hayashi, Y. Shibata, M. Mori, H. Kanegae and S. Kikuchi** 1999. *γ-Radiation induces leaf trichome formation in Arabidopsis*. Plant Physiology. 120: 113–119
- Nelson, E.A. T.L. Sage and R.F. Sage** (2005). *Functional leaf anatomy of plants with crassulacean acid metabolism*. Functional Plant Biology, 32, 409-419.
- Niyogi, K.** (2000). *Safety valves for photosynthesis*. Current Opinion in Plant Biology, 3, 455–460.
- Nobel, P. and E. De la Barrera** (2003). *CO₂ uptake by the cultivated hemiepiphytic cactus Hylocereus undatus*. Annals of Applied Biology, 144, 1-8.
- Ohrui, T., H. Nobira, Y. Sakata, T. Taji, C. Yamamoto, K. Nishida, T. Yamakawa, Y. Sasuga, Y. Yaguchi, H. Takenaga and S. Tanaka** (2007). *Foliar trichome- and aquaporin-aided in a drought-resistant epiphyte Tillandsia*. Planta, 22, 47-56.
- Osborne, B.A., G.T. Clabby, D. Horsley and P.F. Nolan** (1994). *Is acclimation required for success in high light environments? A case*

- study using *Mycelis muralis* (L) Dumont (Asteraceae). *New Phytologist*, 127, 363-375.
- Peñuelas, J.** and S. Munné-Bosch (2005). *Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection*. *Trends in Plant Science*, 10, 166-169.
- Pierce, S.,** K. Maxwell, H. Griffiths and K. Winter (2001). *Hydrophobic trichome layers and epicuticular wax powders in Bromeliaceae*. *American Journal of Botany*, 88, 1371-1389.
- Proença, S.L.** and M.G. Sajo (2007). *Anatomia foliar de bromélias ocorrentes em áreas de cerrado do Estado de São Paulo, Brasil*. *Acta Botânica Brasileira*, 21, 657-673.
- Reyes-García, C.** and H. Griffiths (2009) "Ecophysiological studies of perennials of the bromeliaceae family in a dry forest: strategies for survival", in *Perspectives in biophysical plant ecophysiology: A tribute to Park S. Nobel*, De la Barrera, E. and W.K. Smith (eds). Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico. pp. 121-151.
- Rhodes, D.** and A. Nadoslka-Orczyk (2001). *Plant stress physiology*. *Encyclopedia of life sciences*. Nature Publishing group] . pp. 1-7.
- Ruzin, S.E.** (1999). *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press. New York.
- Sajo, M.J.,** S.R. Machado and S.M. Carmello-Guerreiro (1998). "Aspectos estruturais de folhas de bromélias e suas implicações no agrupamento de espécies", in *Bromélias da Mata Atlântica: Canistropsis*, Pereira, M.V. (ed.). Rio de Janeiro, Salamandra Consultoria Editorial Ltda. pp. 102-111.
- Scatena, V.L.** and S. Segecin (2005). *Anatomia foliar de Tillandsia L. (Bromeliaceae) dos campos gerais, Paraná, Brasil*. *Revista Brasileira de Botânica*, 28, 635-649.
- Segecin, S.** and V.L. Scatena (2004). *Anatomia de escapos de Tillandsia L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais do Paraná, Brasil*. *Revista Brasileira de Botânica*, 27, 515-525.
- Smirnoff, N.** and R.M.M. Crawford (1983). *Variation in the structure and response to flooding root aerenchyma in some wetland plants*. *Annals of Botany*, 51, 237-249.
- Smith, C.** and E. Wood (1998). *BiosIntesis*. Editorial Addison-Wesley Iberoamericana. EUA.
- Sousa, G.M.,** M.A. Maranhão and M.G. Lapa (2005). *Anatomia foliar de espécies brasileiras de Aechmea subg. Chevaliera (Gaudich. Ex Beer) Baker, Bromelioideae-Bromeliaceae*. *Revista Brasileira de Botânica*, 28, 603-613.
- Steyn, W.J.,** S.J.E. Wand, D.M. Holcroft and G. Jacobs (2002). *Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection*. *New Phytologist*, 155, 349-361.

- Tanaka, Y., N. Sasaki and A. Ohmiya (2008).** *Biosynthesis of plants pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids.* The Plant Journal, 54, 733-749.
- Tardy, F., A. Créach and M. Havaux (1998).** *Photosynthetic pigment concentration and interconversions in a pale green Syrian landrace of barley (Hordeum vulgare L., Tadmor) adapted to harsh climatic conditions.* Plant, Cell and Environment, 21, 479-489.
- Tattini, M., L. Guidi, L. Morassi-Bonzi, P. Pinelli, D. Remorini, E. Degl'Innocenti, C. Giordano, R. Massai and G. Agati (2005).** *On the role of flavonoids in the integrated mechanisms of response of Ligustrum vulgare and Philliera latifolia to high solar radiation.* New Phytologist, 67, 457-470.
- Zhang, H., L. Wang, S. Deroles, R. Bennett and K. Davies (2006).** *New insight into the structures and formation of anthocyanic vacuolar inclusions in flower petals.* BMC Plant Biology, 6, 29.
- Zotz, G. and K. Winter (1994).** *Annual carbon balance and nitrogen use efficiency in tropical C₃ and CAM epiphytes.* New Phytologist, 126, 481-492.
- Zotz, G. and P. Hietz (2001).** *The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions.* Journal of Experimental Botany, 52, 2067-2078.

Discusión general

En el presente trabajo se evaluaron diversos aspectos relacionados con los mecanismos fisiológicos, morfoanatómicos y químicos de las bromeliáceas con metabolismo ácido (CAM) *T. brachycaulos* y *B. karatas*, en la selva baja caducifolia de Dzibilchaltún, las cuales crecían en dos microambientes. Tanto *T. brachycaulos* como *B. karatas* presentaron caracteres representativos de plantas CAM que les permiten sobrevivir en ambientes xéricos. Dentro de estas adaptaciones se incluyen: mesófilo diferenciado en parénquima clorofílico e hídrico que consistente de células con paredes delgadas, y grandes vacuolas especializadas en el almacenamiento de ácidos orgánicos y de agua, la cual es utilizada durante largos periodos de sequía, por lo que las plantas no presentaron estrés hídrico durante la temporada de sequía. Las áreas expuestas a la luz presentan cutículas gruesas, las cuales son reflectivas, reduciendo la cantidad de luz absorbida. También, *T. brachycaulos* presentó baja densidad estomática, con los estomas distribuidos sobre la epidermis abaxial y adaxial de las hojas, y cubiertos por una densa capa de tricomas peltados. Por otro lado, *B. karatas* presentó mayor densidad estomática, y los estomas fueron más pequeños y se encontraban hundidos dentro de canales intercostales de la superficie abaxial, protegidos por los tricomas. En ambos casos, estas adaptaciones permiten disminuir la pérdida de agua por transpiración, haciendo más eficiente la fotosíntesis.

Ambas especies pueden tolerar el daño causado por la luz, a través de una combinación de mecanismos de evitación y de protección. Se ha demostrado que en ciertas plantas CAM, cuando son expuestas a condiciones de estrés hídrico y/o osmótico en combinación con alta radiación, requieren de una eficiente protección contra la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés fotooxidativo (Niewiadowska & Borland, 2008). La bromeliácea terrestre, *B. karatas*, presentó una alta capacidad para sobrevivir en sitios expuestos; y en condiciones de alta intensidad de luz es fisiológicamente eficiente para evitar daño en los fotosistemas, debido a que tiene la capacidad de conservar la tasa de transporte de electrones (ETR) sin daño del aparato fotosintético ni fotoinhibición; por lo tanto es menos susceptible de daño oxidativo, lo que explica porque no se encontraron diferencias en la producción de metabolitos con antioxidante.

En la epífita *T. brachycaulos* los caracteres morfoanatómicos confirmaron su tolerancia a la sequía, ya que puede sobrevivir cerca de cuatro meses de sequía usando el agua acumulada en las hojas viejas, además de que captura agua del rocío y neblina en ciertos microhábitats durante la temporada de sequía (Andrade, 2003). En trabajos previos se ha

demostrado que pierde poca biomasa, pero es susceptible a la fotoinhibición (Graham & Andrade, 2004; Cervantes et al., 2005). Sin embargo, la disminución de F_v/F_m no produce daño a largo plazo (fotoinhibición) lo que sugiere inactivación del PSII que previene el transporte de electrones hacia el oxígeno, evitando daño oxidativo. La fotoinactivación puede actuar como un dispositivo de seguridad, protegiendo a todo el sistema de daño generalizado (e.g. *Guzmania monostachia*, Maxwell et al. 1992; *Clusia uvitana*, Zott & Winter 1994; Nielsen & Orcutt, 1996). Como se demostró, los eventos primarios de la actividad fotosintética son poco afectados por el estrés hídrico y alta radiación, *T. brachycaulos*, presentó mecanismos regulatorios que protegen a los componentes del PSII.

Las plantas expuestas de *T. brachycaulos*, a pesar de evitar el daño oxidativo, durante la temporada de sequía, presentaron un aumento en la producción de metabolitos con actividad antioxidante, lo que demuestra que las plantas bajo estrés lumínico e hídrico presentan, aunque de carácter moderado, daño oxidativo. El aumento de pigmentos fotosintéticos como los carotenoides está relacionado con el desmantelamiento del aparato fotosintético previniendo así, la interacción de los PSII con la luz, además de intervenir en el proceso de las defensas antioxidantes. En algunas especies la presencia de altas concentraciones de carotenoides, sugiere que los cloroplastos contienen grandes cantidades de ascorbato y varias enzimas involucradas en su metabolismo (Gillman & Dodge, 1987; Potters et al., 2002; Mittler, 2002), protegiendo así a las membranas tilacoidales del daño oxidativo promovido por estrés hídrico y alta radiación. Por lo tanto en *T. brachycaulos*, los sistemas antioxidantes son una respuesta adicional para proteger contra ROS, que son producidos cuando la disponibilidad de agua es limitante y los componentes del aparato fotosintético no se han recuperado lo suficiente como para permitir el flujo de electrones. Aunque no podemos dilucidar cuales componentes del sistema antioxidante estuvieron involucrados, puede afirmarse que el aumento moderado de metabolitos con actividad antioxidante permitió disminuir daño oxidativo promovido por el estrés hídrico y mejoró la capacidad del ETR, debido a la existencia de mecanismos fotoprotectores.

Durante la temporada de sequía, las plantas expuestas de ambas especies se caracterizaron por presentar una coloración roja, la cual se perdió gradualmente durante la temporada de lluvia, la que está relacionada con la producción de antocianinas como una respuesta de fotoprotección (Martin, 1994; Williams, 1978; Saito & Harborne, 1983; Benzing, 2000). En *T. brachycaulos* la acumulación de antocianinas estuvo relacionada con el aumento del flujo de fotones para la fotosíntesis y baja disponibilidad de agua. En *B. karatas* no se encontraron antocianinas; sin embargo, la pigmentación roja estuvo presente durante la temporada de sequía, por lo

que esta respuesta podría estar relacionada con la producción de otros flavonoides solos (e.g. chalconas, auronas, kaenferol) o combinados con carotenoides (e.g. rodoxantina; Díaz et al, 1990; Davies, 2004; Merzlyak et al., 2005; Tanaka *et al.*, 2008; Hernández et al., 2009).

En cuanto a las respuestas fisiológicas, las evidencias de laboratorio y de campo sugieren que las epifitas son más sensibles a los factores de estrés debido a que los ambientes donde se desarrollan son más inestables y cuentan con un sistema de raíces expuesto, comparado con las especies terrestres (Andrade et al., 2004; Motomura *et al.*, 2008). Ambas especies presentaron respuesta rápidas de fotoprotección. Nuestros resultados demuestran que *B. karatas* presenta importantes caracteres morfoanatómicos de adaptación a alta radiación, incluyendo un mecanismo altamente eficiente de disipación de la luz, así como una alta plasticidad fisiológica (e.g. una alta actividad CAM, el reciclamiento del carbono, como un mecanismo de mantenimiento bajo condiciones extremas). *T. brachycaulos*, al igual que otras bromeliáceas epifitas (Maxwell et al 1992; 1994), experimenta grandes cambios estacionales de su ambiente lumínico, y a pesar de demostrar un alto potencial para aclimatarse a microambientes expuestos, a través de la inactivación de la maquinaria fotosintética, y sus adaptaciones para el almacenamiento de agua; a largo plazo y bajo el contexto de cambio climático, son altamente sensibles a prolongadas condiciones de sequía, que involucran aumento en la temperatura, alta radiación y disminución en la disponibilidad de agua. De esta forma, una fotoprotección efectiva requiere de la interacción regulada entre el uso de la energía lumínica absorbida y su disipación, particularmente en plantas CAM, en donde el suministro de CO₂, la presión parcial de CO₂ y la actividad de Rubisco varían considerablemente a través de un curso diurno, impuesto por la vía fotosintética y en respuesta a las variables ambientales (Borland et al., 2000).

REFERENCIAS

- Andrade, J.L.** (2003). *Dew deposition on epiphytic bromeliad leaves: an important event in a Mexican tropical dry deciduous forest*. Journal of Tropical Ecology, 19, 479-488.
- Andrade, J.L., E.A. Graham and G. Zotz** (2004). "Determinantes morfofisiológicos y ambientales de la distribución de epifitas en el dosel de bosques tropicales", in *Fisiología ecológica en plantas. Mecanismos y respuestas a estrés hídrico en los ecosistemas*, Marino, H. (ed). Valparaíso, Chile. pp. 139-156.
- Benzing, D.H.** (2000). *Bromeliaceae - Profile of an adaptative radiation*. Cambridge University Press, Cambridge, Gran Bretaña.
- Borland, A.M., K. Maxwell and H. Griffiths** (2000). "Photosynthesis: Physiology and Metabolism", in *Ecophysiology of plants with crassulacean acid metabolism*, Leegod R.C., T.D. Sharkey and S. von Caemmerer. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 583-605.
- Cervantes, S.E., E.A. Graham and J.L. Andrade** (2005). *Light microhabitats, growth and photosynthesis of an epiphytic bromeliad in a tropical dry forest*. Plant Ecology, 179, 107-118.
- Davies, K.M.** (2004). *Plants pigments and their manipulation*. Oxford, Blackwell Publishing. 352 p.
- Díaz, M., E. Bal and U. Lüttge** (1990). *Stress-induced accumulation of xanthophylls rhodoxanthin in leaves of Aloe vera*. Plant Physiology and Biochemistry, 28, 679-682.
- ernández, I., L. Alegre, F.V. Breusegem and S. Munné-Bosch** (2009). *How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?* Trends in Plant Science, 14, 125-132.
- Gillham, D.J. and A.D. Dodge** (1987). *Chloroplast superoxide and hydrogen peroxide scavenging systems from pea leaves: seasonal variations*. Plant Science, 50, 105-109.
- Graham, E.A. and J.L. Andrade** (2004). *Drought tolerance associated with vertical stratification of two co-occurring epiphytic bromeliads in a tropical dry forest*. American Journal of Botany, 91, 699-706.
- Martin, E.G.** (1994). *Physiological ecology of the Bromeliaceae*. Botanical Review, 60, 1-82.
- Maxwell, C., H. Griffiths, A.M. Borland., M.S.J. Broadmeadow and C.R. McDavid** (1992). *Photoinhibitory responses of the epiphytic bromeliad Guzmania monostachia during the dry season in Trinidad maintain photochemical integrity under adverse conditions*. Plant, Cell and Environment, 15, 37-47.
- Maxwell, C., H. Griffiths and A.J. Young.** (1994.). *Photosynthetic acclimation to light regime and water stress by the C₃-CAM epiphyte Guzmania monostachia: gas-exchange characteristics,*

photochemical efficiency and the xanthophyll cycle. *Functional Ecology*, 8, 746-754.

- Merzlyak, M.**, A. Solovchenko and S. Pogosyan (2005). *Optical properties of rhodoxanthin accumulated in Aloe arborescens Mill. leaves under high-light stress with special reference to its photoprotective function.* *Photochemistry and Photobiology*, 4, 333-340.
- Mittler, R.** (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plants Science*, 7, 405-410.
- Motomura, H.**, T. Yukawa, O. Ueno and A. Kagawa (2008). *The occurrence of crassulacean acid metabolism in Cymbidium (Orchidaceae) and its ecological and evolutionary implications.* *Journal of Plant Research*, 121, 163-177.
- Niewiadomska, E.** and A.M. Borland (2008). "Crassulacean acid metabolism: a cause or consequence of oxidative stress in planta?", in *Progress in Botany* 69, Lüttge, U., W. Beyschlag and J. Murata (eds). Springer-Verlag. pp. 247-266.
- Nielsen, E.T.** and D.M. Orcutt (1996). *Physiology of plants under stress: abiotic factors.* John Wiley and Sons, New York. pp. 689.
- Potters, G.**, L. De Gara, H. Asard and N. Horemans (2002). *Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime?* *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 537-548.
- Saito, N.** and J.B. Harborne (1983). *A cyaniding glycoside giving scarlet coloration in plants of the Bromeliaceae.* *Phytochemistry*, 22, 1735-1740.
- Tanaka, Y.**, N. Sasaki and A. Ohmiya (2008). *Biosynthesis of plants pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids.* *The Plant Journal*, 54, 733-749.
- Williams, C.A.** (1978). *The systematic implications of the complexity of leaf flavonoids in the Bromeliaceae.* *Phytochemistry*, 17, 729-734.
- Zotz, G.** and K. Winter. (1994.). *Annual carbon balance and nitrogen use efficiency in tropical C₃ and CAM epiphytes.* *New Phytologist*, 126, 481-492.

PERSPECTIVAS

La disponibilidad de agua, la radiación y la temperatura varían enormemente en los diferentes estratos, y junto con la disponibilidad de CO₂, determinan la expresión y evolución de las plantas CAM; pero definitivamente la intensidad lumínica está aunada a otros factores ambientales como la disponibilidad del agua y la temperatura, por lo tanto es necesario el desarrollo de experimentos controlados, que permitan entender las adaptaciones ecofisiológicas de las bromeliáceas.

La alta radiación, la sequía y las consecuentes altas temperaturas limitan en forma severa la fotosíntesis, de esta forma la disminución en la capacidad fotosintética puede ocasionar daño oxidativo en los componentes del cloroplasto. Por lo que sería interesante determinar el grado de peroxidación lipídica y daño oxidativo a proteínas tilacoidales en hojas expuestas a estrés por alta radiación y sequía.

El trabajo presentado aquí no permite distinguir entre las tasas de daño a las proteínas versus la reparación; es decir, sólo se estimó en forma relativa el estado estacionario del PSII, por lo que se necesita investigar más en este campo.

Una de las respuestas que está pendiente por resolver, es en relación a los pigmentos no fotosintéticos (metabolitos) presentes en *B. karatas*. Es necesario conocer de qué naturaleza son y si son una respuesta de protección a la sequía y la alta radiación.

El papel de las ROS en la fotoinhibición o inactivación del PSII, ha sido largamente debatido, se ha argumentado que tienen un papel marginal en el proceso, ya que, por ejemplo, la fotoinhibición ocurre aún en condiciones de bajas temperaturas y obscuridad. En cambio, en el PSI la susceptibilidad al fotodaño parece depender de las ROS, aunque este proceso es menos conocido que la fotoinactivación del PSII. Las evidencias a favor del papel protector del sistema antioxidante en la tolerancia a alta radiación y sequía en plantas CAM son contradictorias. Mientras que en algunas especies la sobreexpresión de enzimas antioxidantes produce una mejora de la tolerancia, en otras especies se han encontrado resultados negativos. Por lo tanto, se requiere realizar trabajos que nos permitan entender en qué forma se pueden llevar a cabo los procesos de producción de ROS y la activación de antioxidantes en bromeliáceas; nuestros resultados sugieren que la actividad antioxidante tiene escasa importancia en el caso de *B. karatas*, y en su lugar otras respuestas podrían ser más relevantes.

Por otro lado, en muchas especies CAM, e.g. especies del género *Clusia* y *Mesembryanthemum crystallinum*, se han encontrado diversas enzimas relacionadas con el proceso antioxidante bajo condiciones estresantes (e.g. sequía, alta radiación, salinidad); por lo tanto, también es necesario identificar los compuestos antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos, que intervienen en el proceso de oxidativo de las bromeliáceas; y a través de una interrelación causal entre el incremento de la actividad antioxidante, el ciclo de las xantofilas y el funcionamiento de CAM, nos podría aportar mayor información sobre los procesos que intervienen en la fotoprotección de las bromeliáceas.

Quedan grandes áreas sin resolver con respecto a las bromeliáceas CAM, por lo que en un futuro las investigaciones se deben dirigir hacia el desarrollo de investigaciones integrales en el área de bioquímica, fisiológica, morfoanatomía y genómica. Estas aproximaciones proveerán una visión más integrada de las dinámicas de regulación implicadas en las respuestas a factores ambientales cambiantes sobre la plasticidad observada en estas especies.

CONCLUSIONES



En epifitas tales como *T. brachycaulos* bajo condiciones de campo, factores combinados de sequía y alta radiación promovieron la disminución en la actividad fotosintética y bajo sequía severa ocurre fotoinactivación, lo que hasta cierto punto resulta en fotooxidación y reducción en la síntesis de clorofila. En cambio, *B. karatas* es una planta adaptada a sitios con alta radiación, y por lo tanto presenta mecanismos fisiológicamente eficientes para evitar fotoinhibición. Una aclimatación satisfactoria a los ambientes de luz, requieren de estrategias a largo plazo para disipar el exceso de energía de excitación y aclimatación a corto plazo a alta radiación.



Las plantas expuestas de *T. brachycaulos*, presentaron aumento de la disipación térmica, vinculada con un incremento en la concentración de carotenoides. Esta respuesta sugiere una relación con el aumento en la actividad de metabolitos antioxidantes, protegiendo, al menos parcialmente al aparato fotosintético de daño oxidativo.



En *B. karatas* no se observaron diferencias en la producción de metabolitos con actividad antioxidante entre temporadas y entre plantas expuestas y bajo sombra, lo que refleja su eficiencia fotosintética bajo condiciones de alta radiación.



La producción de antocianinas por si solas, en el caso de *T. brachycaulos*, o en combinación con pigmentos fotosintéticos, juegan un papel importante en la prevención de daño por alta radiación.



La pigmentación roja de *B. karatas*, no corresponde a antocianinas, más bien podría estar relacionada con la producción de otros flavonoides (chalconas o terpenoides) que funcionan como fotoprotectores.



La influencia de los factores físicos del ambiente se ven reflejados en las características morfoanatómicas de las hojas, permitiendo a *B. karatas* y *T. brachycaulos* conservar potenciales hídricos diurnos elevados, minimizando la pérdida de agua.



La localización de pigmentos en los tejidos nos permitió, de una forma expedita, determinar la respuesta de las plantas a nivel de individuos (plantas expuestas y bajo sombra).



Las estrategias anatómicas y fisiológicas especializadas de ambas bromeliáceas están relacionadas con su tolerancia a la radiación y su capacidad para enfrentar limitaciones hídricas y de nutrimentos durante la temporada de sequía en la selva baja caducifolia.

Anexo I

FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA

La evaluación de las fotosíntesis y los efectos inducidos por estrés son importantes en el análisis y desempeño de las plantas bajo condiciones naturales. El estrés lumínico no resulta de una intensa radiación por sí mismo, sino más bien de la absorción de luz en exceso en comparación con la utilizada en fotosíntesis. Si tanto los límites de tolerancia como la capacidad adaptativa son excedidos, el estrés puede ocasionar daños permanentes e incluso la muerte de la planta. La exposición de las plantas a altos niveles de luz, mayores a los del punto de saturación lumínica, produce varios efectos, incluyendo la adaptación del aparato fotosintético, conocidas como plantas resistentes al sol, las cuales muestran características adaptativas tales como, la depoxidación de violaxantina a zeaxantina, el incremento en la emisión de calor y la fotoinhibición del aparato fotosintético.

FLUORESCENCIA MODULADA DE LA CLOROFILA: MÉTODO DEL PULSO SATURANTE.

Cuando una molécula de clorofila es excitada por la luz, la energía absorbida puede ser disipada a través de tres procesos: a) fotoquímica (fotosíntesis), b) disipación térmica (procesos no fotoquímicos, calor) y c) fluorescencia. Los tres procesos mencionados compiten entre sí, de tal forma que el aumento en la eficiencia de cualquiera de ellos resulta en la disminución del rendimiento de los otros dos. Actualmente, la fluorescencia de la clorofila puede ser fácilmente estudiada mediante la fluorescencia modulada¹, siendo una técnica ampliamente utilizada, para evaluar el efecto de un tipo particular de estrés sobre la actividad fisiológica de la planta. La fluorescencia de la clorofila es la producción de luz que acompaña a la rápida disminución en la energía de los electrones que se encuentran en estado excitado de la clorofila. En una planta expuesta a una fuente de energía lumínica, los electrones de los pigmentos son excitados por la energía incidente. Esta energía puede ser utilizada para fotosíntesis o puede perderse por disipación calorífica o fluorescencia o las dos. Esta técnica evalúa la fluorescencia fotosintética usando pulsos de luz fuerte (pulsos de saturación) permitiendo el análisis de la eficiencia fotosintética *in situ*, y de

¹ **Fluorescencia modulada:** es aquella en la que la luz de excitación posee un destello de alta frecuencia, de modo que puede ser discriminada del resto de las emisiones de luz (por ejemplo, luz solar directa)

esta forma evaluar las alteraciones del aparato fotosintético en función del transporte de electrones (ETR) y se basa en el hecho de que cuando el ETR es bloqueado por algún factor de estrés, a nivel del sitio de oxidación del agua en el PSII, los niveles de fluorescencia disminuyen (Poorter, 2000).

La disipación fotoquímica y no-fotoquímica pueden ser discriminadas mediante la técnica del pulso de luz saturante:

- Cuando una hoja (previamente aclimatada a condiciones de oscuridad) es iluminada con luz de muy baja intensidad (lo suficientemente débil para que no se produzca energía fotoquímica), la hoja emite una señal baja de fluorescencia denominada F_0 . Esta señal procede principalmente de la antena del PSII.
- Si a continuación se aplica un pulso de luz saturante (normalmente, varios miles de $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), la fluorescencia alcanza un máximo (F_m ; saturando el PSII). Bajo estas condiciones, el aceptor primario de electrones (plastoquinona Q_A) se reduce completamente.
- Si posteriormente se ilumina la hoja con luz actínica (es decir, luz fotosintéticamente activa), la hoja emite una señal de fluorescencia basal llamada F_s . Luego es aplicado otro pulso saturante y una nueva señal de máxima fluorescencia es obtenida (F'_m). Esta señal F'_m es siempre menor que F_m debido a la existencia de procesos de disipación térmica (no fotoquímicos) inducidos por la luz actínica y que normalmente están relajados en la oscuridad. Si luego la luz actínica es removida y se ilumina con luz débil de tipo rojo lejano ($\lambda=730 \text{ nm}$), se obtiene una nueva señal basal llamada F'_0 , la cual suele ser menor a la F_0 (tomada en oscuridad).

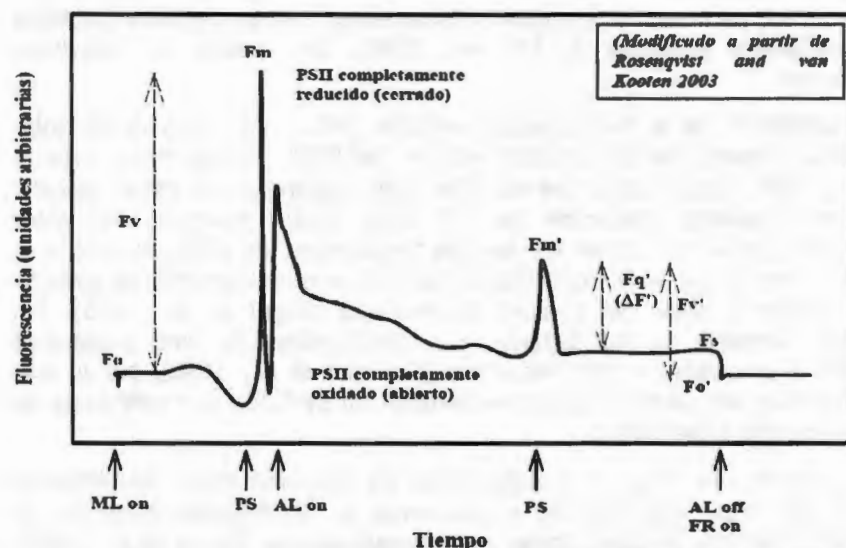


Figura 1. Curva de inducción de fluorescencia modulada de la clorofila en con el método del pulso saturante. AL: luz actínica; FR: luz rojo lejano; ML: luz de medida (no actínica); PS: pulso saturante de luz.

PARÁMETROS DE LA FLUORESCENCIA²:

F_0 : fluorescencia mínima en hojas aclimatadas a la oscuridad

F_m : Fluorescencia máxima en hojas adaptadas a la oscuridad

F_v : Fluorescencia variable en hojas adaptadas a la oscuridad ($F_v = F_m - F_0$)

F_s : Fluorescencia en estado estable a cualquier nivel de luz

F_m' : Máxima fluorescencia en hojas iluminadas

$F_q' (= \Delta F')$: Cambio de fluorescencia provocado por el cierre de PSII ($F_q' = F_m' - F_s$)

F_v' : Fluorescencia variable en hojas iluminadas ($F_v' = F_m' - F_0'$)

F_0' : Fluorescencia mínima en hojas iluminadas (rojo lejano)

² La nomenclatura de la fluorescencia de la clorofila ha sufrido cambios. En particular $\Delta F'$ es simbolizado como F_q' (Rosenqvist & van Kooten, 2003), aunque su uso aún no se ha generalizado en la bibliografía.

A partir de los parámetros descritos anteriormente, se han definido una serie de coeficientes (Maxwell & Johnson 2000), los cuales se describen brevemente:

F_v/F_m : donde F_v es la fluorescencia variable ($=F_m - F_0$). Este coeficiente, denominado "rendimiento cuántico máximo del PSII", puede tomar valores entre 0 y 0.85. Hojas sanas que no están bajo ningún tipo de estrés poseen típicamente valores alrededor de 0.8. Este índice muestra una clara correlación con el porcentaje de centros funcionales del PSII (Anderson et al., 1997), por lo que su disminución es considerada un indicador de pérdida de la función a nivel del aparato fotosintético (Bilger et al., 1995). Sin embargo, también se ha descrito una disminución de este parámetro asociado a procesos de fotoprotección (Osmond et al., 1999), por lo que debe tomarse con cautela asociar la disminución de F_v/F_m con existencia de daño al aparato fotosintético.

$\Delta F/F'_m$, donde $\Delta F = (F'_m - F_s)$. Este índice es conocido como "rendimiento efectivo del PSII" (Φ_{PSII}). Es proporcional al rendimiento cuántico de asimilación de CO_2 en condiciones no-fotorespiratorias (Genty et al., 1989). Su valor puede estar entre 0 y 0.8. A partir de este valor es posible estimar la tasa lineal de transporte de electrones (ETR), conociendo los valores de FFF, absorbancia foliar y asumiendo igual distribución de energía absorbida entre el fotosistema I y II.

NPQ: "non photochemical quenching" o "parámetro de Stern-Volmer". Calculado como $(F_m - F'_m)/F'_m$. Aunque su real naturaleza es discutida, se le considera un indicador de la tasa de disipación no-fotoquímica (calor). Puede tomar valores entre 0 e infinito, aunque son comunes valores entre 0 y 4.

Otro parámetro para estimar la disipación térmica es **$qN = 1 - (F'_m - F'_0)/(F_m - F_0)$** . Su valor puede estar entre 0 y 1.

F'_v/F'_m donde $F'_v = (F'_m - F'_0)$: Rendimiento intrínseco del PSII o eficiencia de los centros abiertos (oxidados) del PSII.

qP = calculado como $(F'_m - F_s)/(F'_m - F'_0)$: es conocido como 'quenching fotoquímico'. Se considera una medida del estado de oxidación de Q_A o sea, la proporción de centros de reacción del PSII que se encuentran en estado abierto. Su valor puede estar entre 0 y 1.

Aquí es importante señalar que el parámetro $\Delta F/F'_m$ es el producto de los dos últimos coeficientes:

$$\Delta F/F'_m (= \Phi_{PSII}) = F'_v/F'_m \times qP \quad (\text{Andrews et al., 1993})$$

En otras palabras, los cambios en el rendimiento cuántico efectivo a la luz, es decir Φ_{PSII} , pueden deberse a alguno de estos dos parámetros (o de

ambos); la proporción de centros del PSII en estado abierto (qP) o cambios en el rendimiento intrínseco de estos centros (F'_{v}/F'_m).

ETR (Índice de la tasa de transporte de electrones) = $\Phi_{PSII} * FFF * 0.5 * a$

Donde, FFF es la densidad de flujo de fotones fotosintéticos incidentes; a es la fracción de luz que es absorbida utilizada por el PSII (Rosenqvist & van Kooten, 2003).

REFERENCIAS

- Anderson, J.M., G.D. Price, W.S. Chow, A.B. Hope and M.R. Badger (1997). *Reduced levels of cytochrome b₆ complex in transgenic tobacco leads to marked photochemical reduction of the plastoquinone pool, without significant change in acclimation to irradiance*. Photosynthesis Research, 53, 215-227.
- Bilger, W., U. Schreiber and M. Bock (1995). *Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field*. Oecologia, 10, 425-432.
- Genty, B.E., J.M. Briantais and N.R. Baker (1989). Relative quantum efficiencies of the two photosystems of leaves in photorespiratory and non-photorespiratory conditions. Plant Physiology and Biochemistry, 28, 2-10.
- Maxwell, K. and G. Johnson (2000). *Chlorophyll fluorescence – a practical guide*. Journal of Experimental Botany, 51, 659-668.
- Osmond, C.B., J.M. Anderson, M.C. Ball and J.J.G Egerton (1999). "Compromising efficiency: the molecular ecology of light resource utilisation in terrestrial plants" in *Advances in physiological plant ecology*, Press, M.C., J.D. Scholes and M.G. Barker (eds). Oxford. Blackwell Science. pp. 1-24.
- Poorter, H.N. 2000. *The role of biomass allocation in the growth response of plants to different level of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review*. Australian Journal of Plant Physiology, 27, 597-607.
- Rosenqvist, E. and O. van Kooten (2003). "Chlorophyll fluorescence: a general description and nomenclature", in *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology*, DeEll, J. R. and P.M.A. Toivonen. Boston, Mass. Kluwer Academic.

