



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**CARACTERIZACIÓN DE LAS RESPUESTAS DEL METABOLISMO
FOTOSINTÉTICO CAM (METABOLISMO ÁCIDO DE LAS CRASULÁCEAS) A
LA TEMPERATURA, RADIACIÓN SOLAR Y ESTRES HÍDRICO EN *Agave
cupreata* (Trel. & Berger)**

TESIS

QUE PRESENTA

HERMELINDA SALINAS ESTRADA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR: DR. PHILIPPE CHRISTIAN MARC LOBIT

MORELIA, MICHOACÁN, AGOSTO 2017.

DEDICATORIA

A dios.

Dedico esta obra a dios, por haberme acompañado en todo momento en mi formación profesional. Gracias dios por las personas que pusiste en mi camino, para mi formación, gracias por haberme dado los medios necesarios para lograrlo. Mi trabajo y mi obra lo dedico a ti, bendice mi vida señor para que yo pueda compartir los conocimientos adquiridos.

A mis padres.

Dedico este trabajo a mis padres especialmente a mi padre que está en el cielo. Gracias a mis padres por su amor y apoyo, por creer en mí, agradezco el esfuerzo realizado, ya que sin su ayuda esto no hubiera sido posible. Gracias madre por el gran esfuerzo que hiciste para apoyarme con mis estudios, por lo que tuviste que trabajar, te quiero mucho mami dios te bendiga.

AGRADECIMIENTOS

Al "Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas" de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al "Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología" por el apoyo económico otorgado. Registro de becario N.º 572920.

Al Dr. Philippe Lobit: por haberme brindado la oportunidad de continuar su equipo de trabajo en el Cuerpo académico "Ecofisiología Vegetal" del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la UMSNH. Gracias por siempre estar al pendiente del desarrollo del proyecto, por los conocimientos transmitidos, sus valiosas observaciones a cada momento, por no dejarme sola durante la escritura de mi documento y siempre aportar útiles comentarios.

Muchas gracias a mi comité de tesis:

Dra. Martha E. Pedraza Santos de la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" de la UMSNH.

Dr. Erick De la Barrera Montpellier del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad de la UNAM campus Morelia.

Dr. Luis López Pérez del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la UMSNH.

Dr. Alejandro Martínez Palacios del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la UMSNH.

Gracias a todos mis maestros de la Universidad Michoacán de San Nicolás de Hidalgo, por conocimientos brindados durante mi formación.

Gracias a mis compañeras y amigos de la universidad por su amistad y buenos momentos.

CONTENIDO

RESUMEN.....	0
I.INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
II. JUSTIFICACIÓN.....	4
III. ANTECEDENTES GENERALES.....	5
3.1 Los agaves.....	5
3.1.1 La familia Agavaceae y la subfamilia Agavideae.....	6
3.1.2 Importancia del genero Agave.....	6
3.1.3 Usos de los Agaves o magueyes.....	7
3.2 <i>Agave cupreata</i>	7
3.2.1 Clasificación Taxonómica de <i>Agave cupreata</i>	9
3.2.2 Distribución de <i>Agave cupreata</i>	9
3.2.3 El clima.....	10
3.3 Nivel de nutrientes en agaves.....	10
3.4 La fotosíntesis.....	10
3.4.1 Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (CAM).....	11
3.4.2 Plasticidad fisiológica en plantas CAM.....	15
3.5 Efecto de la temperatura, la radiación solar y el estado hídrico sobre las plantas CAM.....	16
3.6 Métodos de estudio de la fotosíntesis en plantas CAM.....	20
3.6.1 Acumulación de acidez titulable.....	20
3.6.2 Intercambios de gases: tasa de transpiración y asimilación de CO ₂	20
3.6.3 Fluorescencia de las clorofilas.....	23
IV. HIPÓTESIS.....	25
4.1 Hipótesis general.....	26
4.2 Hipótesis particulares.....	26

V. OBJETIVOS.....	27
5.1 Objetivo general.....	27
5.2 Objetivos particulares.....	27
Capítulo 1. Aspecto general del ciclo de intercambio de gases en <i>Agave cupreata</i>	28
1.1 Introducción.....	28
1.2 Material y métodos.....	28
1.3 Resultados.....	33
1.4 Discusión y conclusiones.....	38
Capítulo 2. Análisis detallado de la dinámica de intercambio de gases en <i>Agave cupreata</i> bajo fluctuaciones naturales de radiación solar y temperatura.....	39
2.1 Introducción.....	39
2.2 Material y métodos.....	40
2.3 Resultados.....	40
2.4 Discusión y conclusiones.....	47
Capítulo 3. Respuestas del metabolismo fotosintético de <i>Agave cupreata</i> a la aclimatación y al cambio de iluminación.....	49
3.1 Introducción.....	49
3.2 Material y métodos.....	49
3.3 Resultados.....	52
3.4 Discusión	61
3.5 Conclusiones.....	62
Capítulo 4. Respuestas al estrés hídrico y a la rehidratación en <i>Agave cupreata</i>	62
4.1 Introducción.....	63
4.2 Material y métodos.....	66
4.3 Resultados.....	67
4.4 Discusión.....	74
4.5 Conclusiones.....	76
VI.DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	77
VII.LITERATURA CITADA.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Agave cupreata</i>	8
Figura 2. Distribución de <i>Agave cupreata</i> en México.....	9
Figura 3. Metabolismo Ácido de las crasuláceas (CAM).....	13
Figura 4. Protocolo de medición de fluorescencia.....	25
Figura 5. Medición de intercambio de gases con el primer prototipo del MACsuino.....	30
Figura 6. Periodo de aclimatación y periodo de mediciones de intercambio de gases	31
Figura 7. Dinámica de intercambio de gases del primer experimento.....	33
Figura 8. Dinámica de intercambio de gases del segundo experimento.....	34
Figura 9. Dinámica de intercambio de gases del tercer experimento.....	35
Figura 10. Dinámica de intercambio de gases del cuarto experimento	36
Figura 11. Dinámica de intercambio de gases durante dos días soleados	41
Figura 12. Dinámica de intercambio de gases durante dos días nublados.....	43
Figura 13. Dinámica de intercambio de gases durante dos días soleados en la mañana y nublados en la tarde.....	45
Figura 14. Dinámica de intercambio de gases durante un día nublado en la mañana y soleado en la tarde	46
Figura 15. Medición de intercambio de gases en hojas de <i>A. cupreata</i> aclimatadas a la sombra y al sol.....	51
Figura 16. Dinámica del ciclo de intercambio de gases durante los primeros nueve días.....	54
Figura 17. Dinámica de intercambio de gases en hojas de <i>A. cupreata</i> aclimatadas al sol y a la sombra durante un mes.....	56

Figura 18. Índices de fluorescencia medidos durante el día en hojas de <i>A. cupreata</i> aclimatadas al sol y a la sombra con un PAR de 800.....	57
Figura 19. Dinámica diurna de acidez titulable en hojas de <i>A. cupreata</i> aclimatadas al sol y a la sombra.....	58
Figura 20. Dinámica de intercambio de gases y condiciones climatológicas.....	59
Figura 21. Intercambio de gases con doble sombreado durante tres noches y dos días en plantas aclimatadas al sol y a la sombra	60
Figura 22. Dinámica de intercambio de gases antes y después del riego.....	69
Figura 23. Dinámica de intercambio de gases diurna antes y después del riego con LI-COR	73
Figura 24. Dinámica de acidez titulable antes y después del riego.....	74
Figura 25. Índices de fluorescencia de la clorofila antes del riego.....	75

ANEXO

Figura 26. Primer prototipo del MACsuino que se provó.....	86
Figura 27. Segundo prototipo del MACsuino que se provó.....	86
Figura 28. Tercer prototipo de MACsuino que se provó.....	86
Artículo: Sistema de fotosíntesis automatizado de bajo costo para el estudio de la fotosíntesis en plantas de metabolismo ácido de las crassulaceas, MACsuino (Medición de Asimilación y Conductancia estomática con arduino.....	87

RESUMEN

A. cupreata es una planta endémica de Michoacán y Guerrero. En el presente trabajo se estudiaron las respuestas de fotosíntesis a la radiación, la temperatura y el estado hídrico de la planta.

Se realizaron 4 experimentos, que se enfocaron principalmente en caracterizar las respuestas del ciclo de intercambio de gases (transpiración y absorción de CO₂) a diferentes condiciones. Para ello, se utilizó un nuevo sistema de medición, que se diseñó en el laboratorio de nutrición vegetal del IIAF. En el primer experimento se utilizaron dos plantas (una aclimatada a la sombra y otra al sol), y solo se obtuvieron datos de absorción de CO₂. En el segundo, se utilizaron cuatro hojas de una planta más grande (10 años de edad), y se obtuvieron mediciones completas de intercambio de gases durante 9 días. En el tercer experimento, se compararon plantas aclimatadas al sol y a la sombra y sus respuestas a cambios de iluminación. Se siguió el intercambio de gases y se midió la fluorescencia y los cambios de acidez titulable en las hojas. En el cuarto experimento las mismas plantas del tercer experimento se dejaron sin regar durante tres meses y se utilizaron para monitorear el intercambio de gases en condiciones de estrés hídrico y durante su rehidratación, después del riego. Antes y después del riego se midieron además la acidez titulable y la fluorescencia. Se encontró que *A. cupreata* parece tener una regulación imperfecta de los diferentes procesos del ciclo CAM, que en diferentes condiciones lleva durante el día a un desajuste en el metabolismo del CO₂ y en algunas condiciones a una pérdida del CO₂ fijado durante la noche anterior. Estas condiciones son, al parecer, temperaturas muy altas durante el día, y/o niveles insuficientes de radiación solar durante la mañana. Al opuesto, las condiciones óptimas corresponden a temperaturas moderadas de las hojas (de 25 a 35 °C) y días soleados en la mañana pero nublados en la tarde.

Palabras clave: Metabolismo CAM, intercambio de gases, MACsuino, condiciones ambientales y estrés hídrico.

ABSTRACT

A. cupreata is an endemic plant of Michoacán and Guerrero. In the present work the photosynthesis responses to the radiation, the temperature and the water status of the plant were studied.

Four experiments were carried out, which focused mainly on characterizing the responses of the gas exchange cycle (transpiration and CO₂ absorption) to different conditions. For this, a new measurement system was used, which was designed in the plant nutrition laboratory of the IIAF. In the first experiment two plants were used (one acclimatized in the shade and the other in the sun), and only CO₂ absorption data were obtained. In the second, four leaves of a larger plant (10 years old) were used, and complete gas exchange measurements were obtained for 9 days. In the third experiment, acclimated plants were compared to the sun and shade and their responses to light changes. Gas exchange was monitored and fluorescence and titratable acidity (TA) changes were measured on the leaves. In the fourth experiment, the same plants of the third experiment were left unpermitted for three months and were used to monitor the exchange of gases under conditions of water stress and during their rehydration after irrigation. Before and after irrigation, titratable acidity and fluorescence were also measured. It was found that *A. cupreata* seems to have an imperfect regulation of the different processes of the CAM cycle, which under different conditions leads during the day to a mismatch in CO₂ metabolism and in some conditions to a loss of CO₂ set during the previous night. These conditions appear to be very high temperatures during the day, and / or insufficient levels of solar radiation during the morning. Opposite, the optimal conditions correspond to moderate leaf temperatures (from 25 to 35 °C) and sunny days in the morning but cloudy in the afternoon.

Key words: CAM metabolism, gas exchange, MACsuino, environmental conditions and water stress.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

México es considerado centro de origen y biodiversidad del género *Agave*, por albergar un gran número de estas especies. Los agaves o magueyes son plantas suculentas de gran importancia social, cultural y económica, por la cantidad de recursos que proporcionan, siendo uno de los principales la obtención de bebidas alcohólicas. Sus recursos se han aprovechado durante siglos por las poblaciones indígenas de nuestro país (Colunga-García *et al.*, 2007).

En Michoacán se han registrado ocho especies del género *Agave*; *A. angustiarum*, *A. angustifolia*, *A. attenuata*, *A. hookeri*, *A. inaequidens*, *A. pedunculifera*, *A. Schidigera* y *A. cupreata* (Gentry, 1982). El *Agave cupreata* Trel. & Berger, comúnmente es conocido como "maguey chino" en Michoacán y "maguey papalote" en Guerrero, es una planta endémica de la depresión del río Balsas. Se distribuye en estos dos Estados, entre los 1200 y 1850 msnm, en el bosque tropical seco, bosque de pino y bosque de pino-encino (Gentry, 1982). El *A. cupreata* se utiliza en la elaboración de mezcal de manera artesanal. Esta actividad, tradicional en Michoacán, tiene una gran importancia como fuente de ingresos en algunas de las zonas más marginadas del Estado. El mezcal Michoacano se produce esencialmente a partir de dos especies de agaves: *A. cupreata* y *A. inaequidens*.

Con la aprobación de la denominación de origen para el mezcal Michoacano, obtenida en 2012, se abren nuevas posibilidades de comercialización, y se prevé que la demanda se incremente en los próximos años. Debido a esto, se espera un incremento en la superficie cultivada de *A. cupreata*, incluso en los últimos 12 años, los productores han empezado el cultivo de *A. cupreata* (Philippe Lobit, 2015 com. pers). Sin embargo, muchas de estas plantaciones presentan poco crecimiento y/o un contenido de azúcar bajo en comparación con las mejores plantaciones silvestres (Philippe Lobit, 2015 com. Pers).

De manera general, el desarrollo y crecimiento de los agaves puede estar afectado por varios factores entre los que destacan: 1) el ambiente micro-climático, que depende de variables como la altitud, la pendiente, la radiación, la orientación, la humedad, la temperatura y la exposición al sol, 2) las condiciones edáficas, en particular las características físicas y químicas del suelo y 3) factores biológicos como la interacción con otras plantas y animales

(Nobel 1985, Martínez-Palacios A *et al.*, 2015).

En particular se sabe que en los agaves la radiación solar, la temperatura nocturna y el déficit hídrico influyen en la fijación de CO₂ y acumulación de carbono y por lo tanto en la productividad (Nobel, 1988). Los ambientes en que crece *A. cupreata* se caracterizan a menudo por variaciones de radiación y temperatura a corto plazo (sombra por árboles, sombras por relieve, nubes y orientación). Estas fluctuaciones pueden afectar la fotosíntesis y su regulación (tasa de descarboxilación, asimilación y regulación estomática), pero estos efectos no han sido investigados en este agave.

En este trabajo, nos enfocamos en caracterizar el metabolismo fotosintético de *A. cupreata* más específicamente en describir el aspecto general de la dinámica de intercambio de gases bajo diferentes condiciones ambientales de radiación solar, temperatura y el estado hídrico. Con los objetivos de caracterizar las respuestas: 1) a las fluctuaciones de condiciones ambientales (radiación solar y temperatura) a corto plazo (minutos y horas), 2) al sombreado (tanto de aclimatación a largo plazo y durante cambios de iluminación de unos días), 3) al déficit hídrico y a la rehidratación de la planta.

En dos estudios previos que se realizaron en nuestro cuerpo de trabajo se encontró que *A. cupreata* no cierra completamente sus estomas durante el día, como es característico de una planta CAM, llevando a una pérdida de CO₂ hacia la atmósfera. Lo que podría sugerir que exista algún problema de regulación en su metabolismo, ya que esta pérdida de CO₂ podría ser ineficiente tomando en cuenta el costo energético que representa para la planta la fijación de CO₂. Sin embargo, estas observaciones se hicieron en plantas bien regadas, y sólo en dos ocasiones. No hay información si este comportamiento se mantendrá bajo diferentes condiciones de temperatura, radiación o estrés hídrico. Que son condiciones donde crece el *A. cupreata*.

Además el *A. cupreata* por crecer en un hábitat de bosque y en un clima caracterizado por una temporada de lluvias larga, podría tener un comportamiento fisiológico diferente de otras especies ya estudiadas.

Por lo anterior, el presente estudio tiene como objetivo, caracterizar la dinámica de intercambio de intercambio de gases durante el ciclo día-noche en *A. cupreata* bajo diferentes condiciones ambientales de temperatura, radiación solar y estado hídrico. Para este propósito, se midió la acumulación nocturna de la acidez titulable y su evolución durante el día, el intercambio de gases y la fluorescencia de la clorofila en hojas mantenidas a diferentes niveles radiación solar y estado hídrico, sin aclimatación y con aclimatación a dos condiciones de radiación solar (expuestas totalmente al sol y expuestas al sombreado de una malla sombra. Se caracterizó el efecto de las fluctuaciones naturales a corto plazo de radiación y temperatura durante el día en hojas de *A. cupreata* mediante mediciones de intercambio de gases.

II. JUSTIFICACIÓN

La presente investigación permitirá aportar conocimientos sobre la fisiología de *A. cupreata*. Más específicamente, se abordan las respuestas en su dinámica día-noche de intercambio de gases bajo diferentes condiciones de temperatura, radiación solar y estrés hídrico sobre la conductancia estomática, fijación nocturna de CO₂ y su asimilación durante el día siguiente. Con la finalidad de conocer la regulación de las diferentes fases de su ciclo de intercambio de gases y el efecto de las condiciones ambientales (la radiación, temperatura y el estado hídrico) sobre dicha regulación, lo cual pudiera afectar su productividad. Aunque se espera que *A. cupreata* por vivir de forma natural bajo el dosel de los árboles, con fluctuaciones de radiación y temperatura por el paso de nubes, y una temporada de lluvias y una de secas se encuentre adaptado a estas condiciones y que la pérdida de CO₂ sea equilibrada entre las diferentes hojas que conforman la planta. Sin que se vea afectada su tasa fotosintética.

III. ANTECEDENTES GENERALES

3.1 Los agaves

Los agaves son un grupo de plantas de gran importancia cultural, económica, ecológica y social. Estas plantas fueron nombradas *tocamba* (purépecha) y *metl* o *mexcametl* (náhuatl) que significa maguey. Los españoles las llamarían maguey, palabra adoptada de su paso por las Antillas durante la conquista. Los agaves viven entre cinco y sesenta años, según la especie, y pueden producir cientos de flores que ofrecen néctar a insectos, aves y murciélagos a cambio de polen de otros individuos de su especie (<http://biodiversidad.gob.mx>). Los agaves mantienen relaciones biológicas y ecológicas complejas entre ellos y con otras especies de plantas y animales, por lo que proveen múltiples servicios ambientales, como el mantenimiento del suelo y de las poblaciones de polinizadores como los murciélagos (Colunga-García *et al.*, 2007). La mayoría de los magueyes desarrollan sus flores en ramas; otros en inflorescencia formada por un eje principal alargado llamado espiga, escape o quiole. Las flores producen las semillas, las cuales son dispersadas por la lluvia y el viento. Las semillas heredan y mezclan los genes de la planta madre y de la que proviene el polen. La mayoría de los agaves tienen una forma alternativa de reproducirse, que es por medio de bulbillos e hijuelos. Los bulbillos se desarrollan a partir de una yema y los hijuelos son los retoños más vigorosos, que nacen en el cuello de la planta. Ambos son clones de la planta que los produjo (Colunga-García *et al.*, 2007). *A. cupreata*, se reproduce de manera natural por medio de semillas.

En México los agaves fueron la fuente principal de carbohidratos para la población antes del maíz (Smith, 1886). Se ha documentado un mínimo de 74 especies y 28 taxa infraespecíficos con uso como alimento humano, bebidas fermentadas, bebidas destiladas, fibra y forraje (Colunga-García *et al.*, 2007). Los agaves son un recurso fitogenético estratégico para el país, ya que representan una alternativa para el desarrollo sostenible desde el punto de vista ecológico y social, es de particular importancia su capacidad bioproductiva en ambientes extremos de temperatura y disponibilidad de agua (Colunga-García *et al.*, 2007).

3.1.1 La familia Asparagaceae y la subfamilia Agavoideae

La familia Asparagaceae fue descrita por Antoine-Laurent de Jussieu en su trabajo y publicado en *Genera Plantarum* 40- (1789). En la actualidad la familia Asparagaceae cuenta con siete subfamilias; Agavoideae, Aphyllanthoidae, Asparagoideae, Brodiaicoideae, Lomandroideae, Nolinoideae y Scilloideae (Chase *et al.*, 2009). Las plantas que conforman esta familia son monocotiledoneas; hierbas o subarbustos perennifolios. La subfamilia Agavoideae antes llamada familia Agavaceae es ampliamente distribuida en varias regiones del Continente Americano, y un gran número de ellas se encuentran en México y habitan en lugares generalmente áridos y semiáridos.

La subfamilia Agavoideae presenta una distribución amplia en diversas partes del mundo y de México. Las agavoideas son plantas monocotiledoneas, muchas de ellas son arborescentes, las hojas suelen ser grandes, xeromórficas, fibrosas en general suculentas, duras y persistentes, en rosetas en la base o al final de las ramas. Con inflorescencias que pueden ser grandes y compuestas de muchas flores. Las flores por lo común son bisexuales con seis tépalos y seis estambres, el ovario es súpero o ínfero (www.thecompositaehut.com). La subfamilia consta de 25 géneros y 637 especies (Judd *et al.*, 2007). Los géneros con el mayor número de especies son; *Agave* con 300 especies, seguido de *Chlorophytum* con 150 especies, *Anthericum* 65 especies, *Yucca* 40 especies y *Hosta* con 40 especies (Chase *et al.*, 2009).

3.1.2 Importancia del genero Agave

En 1753 Carlos Linneo describió al género *Agave*, cuyo nombre viene del griego Agaué y significa “admirable o noble”, (Gómez Pompa, 1963). El género *Agave* ha formado parte de los asentamientos humanos en México, sobre todo en aquellas regiones de sequía extrema, donde existen evidencias de hace más de 5 mil años, que han servido de alimento, medicina y vestido (Gentry, 1982). La extracción de bebidas alcohólicas, ha permitido el desarrollo de la industria con la producción de tequila en Jalisco, el Bacanora en Sonora, el mezcal en Oaxaca y en otros estados de la República Mexicana (Gentry, 1982; García-Mendoza, 1992).

3.1.3 Usos de los agaves o magueyes

El agave se ha utilizado desde tiempos prehistóricos por los indígenas de México y Norte América principalmente (Nobel, 1988). Las especies de agave han tenido usos, entre los que destacan;

Alimenticios: agua miel (savia del tallo), pulque (agua miel fermentada), jugo dulce, miel (en la industria alimenticia se comercializa por sus propiedades nutricionales y nutraceuticas), vinagre, aguardiente, mezcal (agave cocido y destilado de manera artesanal) guisos (tallos florales y flores), postre, azúcar, levadura, condimento para la barbacoa y fructosa (Gentry, 1982; Nobel, 1988).

Hoy en día se le han dado varios usos al mezcal obtenido de los agaves, entre los que se encuentra la elaboración de cremas y licores frutales.

Doméstico: Cepillos para lavar, escobas, canastas, recipientes, las hojas secas se utilizan como combustible doméstico (García-Herrera *et al.*, 2010).

Comercial: Las fibras obtenidas de las hojas de algunas especies de agave (*A. fourcroydes*, *A. lechuguilla*, *A. sisalana*), son utilizadas para producir cuerdas, sacos, artesanías, tapetes, tejer objetos, para producir papel y más recientemente en la construcción de materiales, elaboración de escobetas para limpiar los metales (Gentry, 1982; Nobel, 1998; Colunga-García *et al.*, 2007). Entre las bebidas que se elaboran a partir del jugo de los agaves se encuentra el mezcal, tequila, bacanora, y el pulque mismas que son comercializadas (Nobel, 1988).

En la producción de fármacos: Como el etanol, celulosa, sapogeninas utilizadas como agente de limpieza y en shampoos (Gentry, 1982; Nobel, 1988).

Ornamentales: En jardines públicos y privados (García-Herrera *et al.*, 2010).

3.2 *Agave cupreata*

El *A. cupreata* Trel & Berger, se utiliza en la elaboración de mezcal de forma artesanal y rustica. Para la elaboración del mezcal se cortan las piñas antes de la floración, el mezcal se obtiene del cocimiento del tallo (piña) del agave, la fermentación y la destilación. El nombre de *A. cupreata* responde al color cobre de sus espinas (Gentry, 1982). Se considera una planta,

semélpara, caulescente, solitaria y dispersa que crece en forma de roseta la cual puede medir 1 m de alto por 80 cm de ancho, sus medidas pueden variar de acuerdo al sitio donde crezca. Su tallo es grande y carnosos. Las hojas son anchas, ampliamente lanceoladas u ovadas con una longitud de 40 a 80 cm y un ancho de 18 a 20 cm y estrechas, planas o ligeramente cóncavas en la base, de color verde brillante, carnosas, el margen ampliamente crenado, mamilado, con poca fibra, las espinas son agudas, dimórficas, fuertemente aplanadas, de color cupráceo a gris, de 10 a 15 cm de largo y separada de 3 a 6 cm; panícula de 4 a 7 m de altura, ancha, sus flores son de color amarillo, protándricas, dicogámicas, con 380 óvulos en promedio, cada escapo presenta de 13 a 17 umbelas con 80 a 120 flores cada uno. Su reproducción es por semilla que son dispersadas por el viento y su época de floración es de enero a marzo, sus polinizadores son abejas, mariposas nocturnas, avispas, colibríes y murciélagos (Gentry, 1982). Tarda entre 7 a 15 años en llegar a la madurez sexual (Ilsley *et al.*, 2007).

La colecta exhaustiva de plantas silvestres de *A. cupreata* justo antes de la floración, interrumpe la reproducción sexual, la aportación de semillas y por lo tanto el establecimiento de nuevas plantas a las poblaciones silvestres (Gómez-Sierra, 2005).



Figura 1. *Agave cupreata*. Tomada por Philippe Lobit en Meza las Azucenas, Michoacán, México.

3.2.1 Clasificación Taxonómica de *Agave cupreata*

Posición taxonómica de *A. cupreata* Trel. & Berger (APG III, 2009).

Reino: Plantae

Clado: Angiospermas

Clado: Monocotiledóneas

Orden: Asparagales

Familia: Asparagaceae

Subfamilia: Agavoideae

Género: *Agave*

Especie: *Agave cupreata*

Nombre común: maguey chino en Michoacán y maguey papalote en Guerrero.

3.2.2 Distribución de *Agave cupreata*

El *A. cupreata* Trel & Berger, se ubicada entre los 1200 y 1850 msnm y se distribuye en forma discontinua en pendientes de montañas, bosques de pino-encino, pastizales, palmares o selvas bajas de la cuenca del río Balsas donde forma poblaciones aisladas, en los estados de Michoacán y Guerrero, México (Gentry, 1982).



Figura 2. Distribución de *Agave cupreata* en la República Mexicana.

3.2.3 El clima

El clima en las localidades donde actualmente crece *A. cupreata*, fue estimado para el clima contemporáneo (1961-1990) por Sáenz-Romero y colaboradores en 2011. Las estimaciones se hicieron utilizando un modelo climático “spline”, basado en resultados del modelo de circulación global canadiense, escenario de emisiones intermedio A1B. La estimación de la temperatura promedio de ocho localidades del estado de Michoacán y cuatro del estado de Guerrero donde actualmente crece de forma natural en promedio para el clima contemporáneo la temperatura fue de 19.1 °C y la estimación de la precipitación fue de 961 mm.

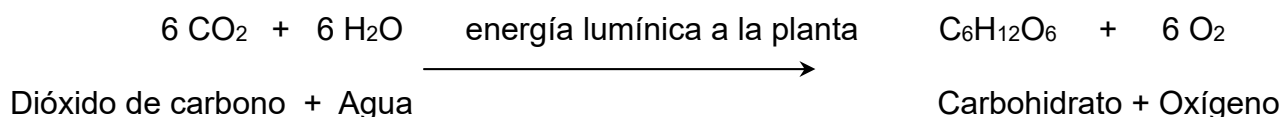
3.3 Nivel de nutrientes en agaves

Las raíces de los agaves tienden a ser superficiales, por lo que los nutrientes minerales se obtienen de la parte superior del suelo (Nobel, 1988).

El crecimiento de las plantas CAM puede estar incrementado por la fertilización de nitrógeno (Nose *et al.*, 1985). El nitrógeno es requerido por proteínas y ácidos nucleicos, y otras moléculas vitales en el funcionamiento de las plantas. En *A. sisalana* los niveles de algunos elementos pueden cambiar con la edad del tejido (Lock, 1962). El nivel de nitrógeno promedio en toda la hoja es del 1.0% del peso seco de la hoja desplegada recientemente, y disminuyen hasta 0.7% en las hojas de mayor edad. El fósforo disminuye de 1,300 ppm en hojas desplegadas recientemente a 700 ppm para las hojas más viejas, el potasio disminuye de 2.2% a 0.7%. Los niveles de calcio aumentan conforme aumenta la edad de las hojas, para las hojas que todavía están plegadas a la espiga central es de 0.7%, para las desplegadas recientemente 1.3% y en las hojas de mayor edad 2.0% (los niveles de estos elementos son el promedio de toda la hoja) (Lock, 1962). El nivel de calcio en agaves puede representar el 6% del peso seco del colénquima, estos niveles pueden deberse a la acumulación de oxalato de calcio en estas plantas (Ginson y Nobel 1986). El potasio es requerido para la regulación de la presión osmótica y la apertura de los estomas en las plantas CAM (Jewer *et al.*, 1981).

3.4 La fotosíntesis

Las plantas son organismos autótrofos fotosintéticos, capaces de absorber y utilizar la energía luminosa para la síntesis de carbohidratos a partir del dióxido de carbono y el agua con la generación de oxígeno. A este proceso se le conoce como fotosíntesis que en sentido literario quiere decir "síntesis usando la luz". El balance de todas las reacciones que ocurren en la fotosíntesis podrían ser descritas de la manera siguiente:



En las plantas pueden distinguirse tres modelos fotosintéticos (C_3 , C_4 y CAM) de acuerdo con las características fisiológicas, morfológicas y bioquímicas específicas de cada grupo (Taiz y Zeiger, 2002). Las plantas con fotosíntesis C_3 , fijan el dióxido de carbono con la enzima ribulosa difosfato, en los cloroplastos para formar dos moléculas de tres carbonos (ácido 3-fosfoglicérico) mediante el ciclo de Calvin-Benson. En la fotosíntesis C_4 , el CO_2 es ligado al aceptor fosfoenol piruvato (PEP) con el uso de la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC), para producir compuestos de cuatro carbonos, los cuales son transportados a los cloroplastos de las células que envuelven el haz vascular, donde se realiza el ciclo C_3 . La fotosíntesis CAM se caracteriza por fijar el CO_2 , principalmente por la noche con el uso de la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPCasa), y el producto de la reacción, el oxalo-acetato, es reducido a ácido málico y almacenado en la vacuola. Durante el día el ácido málico previamente almacenado se libera en el citosol, libera CO_2 por descarboxilación y el CO_2 así obtenido es asimilado a través del ciclo de Calvin-Benson (Taiz y Zeiger, 2002). Los agaves presentan este metabolismo.

3.4.1 Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (CAM)

El proceso fotosintético CAM (siglas del nombre en inglés Crassulacean Acid Metabolism), es característico de las plantas suculentas del desierto, plantas acuáticas y epifitas (Drennan y Nobel, 2000). En el mecanismo CAM, hay dos vías para obtención del CO_2 : la actividad carboxilasa de tres carbonos (Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa, o Rubisco) y el de

cuatro carbonos (fosfoenol piruvato carboxilasa, o PEP-Casa) ocurren en una misma célula, con actividad enzimática separada temporalmente (Dodd *et al.*, 2002). En estas plantas, el mecanismo estomático está estrechamente vinculado al metabolismo fotosintético: los estomas están abiertos en la noche mientras ocurre la fijación del CO₂ por la PEP-Casa y (en general) cerrados durante el día mientras ocurre la asimilación por la Rubisco. También hay una integración estrecha entre metabolismo y funcionamiento vacuolar: los ácidos orgánicos producidos por la fijación el CO₂ son acumulados en la vacuola durante la noche y liberados durante el día (Geydan *et al.*, 2005).

El ciclo día/noche en el metabolismo CAM: el ciclo día/noche característico de la fotosíntesis CAM consiste en los siguientes pasos (Winter y Smith, 1996):

- La fase I ocurre durante la noche: se abren los estomas y la enzima fosfoenol-piruvato carboxilasa (PEPC) fija el CO₂. El ácido oaxalo-acético formado por esta reacción es reducido a ácido málico, el cual se almacena en la vacuola de las células fotosintéticas.

- La fase II ocurre al inicio del día: los estomas permanecen abiertos para la toma de CO₂ por lapsos cortos durante el amanecer.

- La fase III ocurre durante el día: el ácido málico almacenado en la vacuola se libera en el citosol, libera CO₂ por descarboxilación y el CO₂ así obtenido es asimilado a través del ciclo de Calvin-Benson.

- La fase IV ocurre al final del día: los estomas se abren nuevamente y el CO₂, simultáneamente fijado por la PEPC y asimilado por la Rubisco, proviene en parte de la descarboxilación del malato y en parte de la difusión por los estomas (Osmond, 1978).

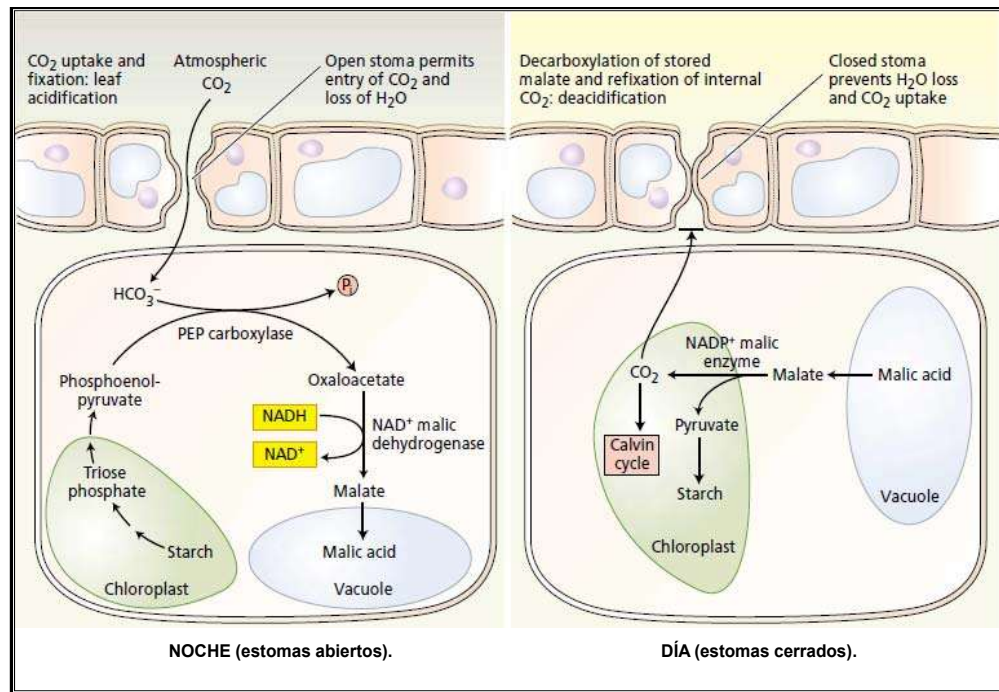


Figura 3. Metabolismo Ácido de las Crasuláceas (CAM) con la separación temporal de la fijación y asimilación del CO₂ de Taiz y Zeiger, 2002.

La regulación del metabolismo CAM implica una compleja regulación entre los procesos involucrados: apertura y cierre estomático, metabolismo y funcionamiento vacuolar. Esta regulación implica no sólo una sincronización entre los diferentes procesos durante los cambios entre las fases nocturna y diurna del metabolismo, sino un ajuste de sus velocidades durante cada fase.

En cuanto a la regulación estomática se espera: 1) al inicio de la fase diurna, una sincronización estrecha entre cierre estomático, inicio de la descarboxilación del ácido málico e inicio de la asimilación del CO₂ por el ciclo de Calvin, 2) al inicio de la fase nocturna, una sincronización entre apertura estomática e inicio de la fijación del CO₂ atmosférico por la PEP-casa. Además, durante la fase nocturna: 1) la apertura estomática debe permitir una tasa de difusión del CO₂ suficiente para sostener la carboxilación del PEP, 2) la tasa de transporte del ácido málico a la vacuola debe ser igual a la de carboxilación del PEP. Durante la fase diurna: 1) deben corresponder las velocidades de liberación del ácido málico de la vacuola, de descarboxilación y de asimilación del CO₂ por el ciclo de Calvin, 2) debe haber inactivación de la PEPcasa, para evitar que ésta compita con la RuBisCo y vuelva a fijar el CO₂ liberado en la hoja. Finalmente, puede ocurrir una fase de apertura estomática al final de la tarde,

caracterizada por una absorción de CO_2 por la hoja. Se acepta en general que durante esta fase, la descarboxilación del ácido málico almacenado en la vacuola ha terminado y que el CO_2 está asimilado a través de la RuBisCo, en un metabolismo de tipo C_3 . Sin embargo, también podría estar activa la PEP carboxilasa sin perjudicar la eficiencia de absorción del CO_2 . De manera similar, al inicio de la mañana, antes que inicie la descarboxilación es posible que coexista una actividad PEPcase y RuBisCo, también sin afectar la eficiencia fotosintética.

Las consecuencias de que no todas estas regulaciones se cumplan son las siguientes. La fijación nocturna de CO_2 es limitada por el proceso más lento entre la difusión estomática, la producción de PEP, la carboxilación del PEP, y el transporte del ácido málico a la vacuola. Además de su regulación intrínseca a la planta, cada uno de estos procesos puede ser controlado por una variedad de condiciones ambientales. Todos pueden ser sensibles a la temperatura, la producción de PEP puede además ser limitada por la actividad PEPcase o por la disponibilidad de carbohidratos (la cual depende de la asimilación realizada durante el día anterior) y el transporte vacuolar puede ser también limitado por el pH y por la concentración de malato en la vacuola. La asimilación diurna, a cambio, puede ser limitada tanto por la oferta como por la demanda de CO_2 . Del lado de la oferta, ésta depende de la tasa de liberación del ácido málico por la vacuola y su tasa de descarboxilación. No se conocen a detalle los mecanismos, pero la liberación de ácido málico depende probablemente de la concentración vacuolar del mismo, de la temperatura y de la intensidad de irradiación solar. De igual manera, la tasa de descarboxilación depende de la actividad de la enzima málica, de la temperatura, y de la concentración de malato en el citosol. Del lado de la demanda, el ciclo de Calvin funciona probablemente de manera similar al descrito por Farquhar (1980) en plantas C_3 , con dependencia al ATP y NADPH producido por los fotosistemas, a la cantidad de RuBisCo existente, a la temperatura, y a la concentración de CO_2 en la hoja. En caso de que la demanda supere la oferta, la asimilación será simplemente limitada por la concentración de CO_2 en la hoja, que disminuirá. Al contrario, si la oferta supera la demanda, se producirá una acumulación de CO_2 en la hoja hasta concentraciones potencialmente muy altas, permitiendo eventualmente una difusión del CO_2 hacia el exterior de la hoja si los estomas no están completamente cerrados.

La regulación del metabolismo CAM implica una compleja regulación entre los procesos

involucrados: apertura y cierre estomático, metabolismo y funcionamiento vacuolar. Esta regulación implica no sólo una sincronización entre los diferentes procesos durante los cambios entre las fases nocturna y diurna del metabolismo, sino un ajuste de sus velocidades durante cada fase.

La vacuola en el metabolismo CAM: la fijación nocturna de CO₂ resulta en la formación de cantidades considerables de malato que son almacenados en la vacuola para prevenir la acidificación del citoplasma (Geydan y Melgarejo, 2005). Para acomodar las cantidades crecientes de malato y su almacenamiento a nivel vacuolar, la capacidad de transporte de dicho metabolito debe incrementarse. Este transporte es energizado por una V0V1-H⁺-ATPasa del tonoplasto. El malato es transportado a través del tonoplasto en forma de anión divalente vía canales iónicos, y se protona una vez en la vacuola. El transporte del malato debe ser fuertemente regulado durante el ciclo diario (Geydan y Melgarejo, 2005). Así, canales iónicos selectivos de malato que rectifican la entrada nocturna del malato se activan de noche para permitir el flujo hacia la vacuola, mientras que durante el día este flujo se inactiva y la salida hacia el citoplasma se hace por medio de un segundo canal o por difusión pasiva a través de la membrana del tonoplasto (Lüttge *et al.*, 2004).

3.4.2 Plasticidad fisiológica en plantas CAM

Existen variaciones al metabolismo CAM, como diferentes descarboxilasas durante el día, la acumulación del ácido cítrico además de málico, o diferentes precursores de PEP (Winter y Smith, 1996). Sin embargo, en respuesta al ambiente es donde se presenta mayor variabilidad: las diferentes fases del ciclo CAM pueden variar en amplitud y en duración, lo que hace difícil elaborar una definición estricta de la fotosíntesis CAM (Lüttge, 2004). Muchas plantas CAM han sido caracterizadas como facultativas o intermedias C₃-CAM, pues tienen la habilidad de expresar fotosíntesis C₃ en respuesta a la disponibilidad de agua, estatus nutricional, humedad relativa, la temperatura del aire, intensidad lumínica y calidad de la luz así como en el fotoperiodo (Borland y Griffiths, 1992). Estas plantas se caracterizan por fijar CO₂ tanto durante el día (mediante Rubisco), como durante la noche (mediante PEPC) con modificaciones en las fases II y III del modelo CAM. La transición de C₃ a CAM es benéfica para las plantas cuando

se encuentran bajo estrés hídrico y altas temperaturas, porque el cierre diurno de los estomas evita la pérdida de agua y protege la integridad del aparato fotosintético (Winter y Smith, 1996). En el caso contrario, cuando existe disponibilidad de agua, las plantas que pasan de fotosíntesis CAM a fotosíntesis C_3 pueden abrir los estomas durante el día, para una mayor fijación de CO_2 (Andrade *et al.*, 2007). Entre la fase II y IV existen transiciones en las que los estomas permanecen abiertos para la toma de CO_2 por lapsos cortos durante el amanecer (fase II) y el atardecer, produciendo como consecuencia la fijación directa de CO_2 a carbohidratos cuando el acervo de ácido vacuolar se encuentra agotado (fase IV) (Lüttge, 2004).

3.5 Efecto de la temperatura, la radiación solar y el estado hídrico sobre las plantas CAM

En cualquier planta, la productividad resulta de la integración e interacción de los efectos de la lluvia, la temperatura, la radiación y los nutrientes. Nobel consideró que cada factor ambiental puede individualmente limitar la fijación de CO_2 . En las plantas CAM, estas respuestas son el resultado de varios procesos que intervienen en este metabolismo.

El esquema general del metabolismo CAM sufre variaciones según las especies (Osmond, 1978), y para una especie dada, según las condiciones ambientales (aunque este último aspecto ha sido menos estudiado). En particular, es frecuente que en la tarde los estomas se vuelvan a abrir, permitiendo la entrada de CO_2 atmosférico en la hoja: en este caso, el CO_2 de origen tanto endógeno como exógeno puede ser metabolizado simultáneamente por la Rubisco y por PEPC. También pueden existir periodos de apertura estomática temprano en la mañana, en que también Rubisco y PEPCa pueden estar activas al mismo tiempo en la captura del CO_2 (Andrade *et al.*, 2007).

Otro aspecto importante en el metabolismo CAM es la sincronización necesaria entre la dinámica estomática y las actividades enzimáticas (carboxilación de PEP y descarboxilación del ácido málico). Por ejemplo, en casos en que los estomas no se cierran completamente en la mañana, parte del CO_2 obtenido por descarboxilación puede ser perdido hacia la atmósfera (Nobel, 1988; Pimienta-Barrios, 2006).

Cada uno de los factores climáticos puede afectar la fotosíntesis de las plantas CAM de manera diferente:

Radicación solar. En el caso específico de la fotosíntesis CAM, la radiación fotosintéticamente activa (PAR) puede afectar varias de sus etapas: de manera directa, el ciclo de Calvin durante el día, o de manera indirecta la fijación y acumulación nocturna de CO₂. Una de las etapas más estudiada en agaves es la fijación y acumulación de CO₂ nocturna. Nobel (1985) observó en *A. fourcroydes* que la fijación y acumulación nocturna de CO₂ aumenta con el PAR recibido durante el día anterior, hasta llegar a estabilizarse con un PAR de 1000 a 1200 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$. Este proceso puede ser afectado, si la radiación recibida durante el día limita la producción de azúcares por el ciclo de Calvin, ya que la disponibilidad de azúcares, precursores de la glicólisis, limita la producción de PEP requerida para la fijación nocturna (Nobel, 1988). Otra explicación es que la radiación solar controle (además del ciclo de Calvin) la descarboxilación diurna del ácido málico. En este caso el contenido de ácido málico restante al final de un día con un PAR bajo sería mayor: suponiendo que la vacuola tiene una capacidad limitada de acumulación de ácido málico, la fijación nocturna sería limitada por la diferencia entre esta capacidad y el contenido de ácido málico restante al inicio de la noche. En un experimento de sombreado realizado en 2011 (no publicado), se observó que la acidez titulable de las hojas no disminuyó durante el día en plantas sombreadas, por lo que tampoco se pudo acumular acidez titulable en la noche siguiente.

Martínez-Palacios y colaboradores (2015) evaluaron en plantas cultivadas de *A. cupreata* las respuestas a la exposición al sol (cultivos con diferente orientación Este y Sur) y al sombreado (cultivo bajo el dosel de los arboles), y encontraron que las plantas expuestas al Este presentaron menor crecimiento que las plantas expuestas al Sur y bajo el dosel. Incluso las plantas expuestas al sur y bajo el dosel presentaron un crecimiento continuo. Los resultados se basan en mediciones del diámetro y la altura de las plantas.

Temperatura. Por las características del metabolismo CAM, varias etapas podrían ser sensibles a la temperatura y a otras condiciones climáticas como la radiación o humedad del aire (Nobel, 1988). En particular, se esperan efectos de la temperatura sobre la apertura estomática, actividades enzimáticas y capacidad de almacenamiento de ácidos de la vacuola.

Existen varios trabajos que estudian la influencia de la temperatura en agaves, algunos de los cuales se describen a continuación.

Nobel 1984a y 1985a realizó experimentos con *A. deserti* y *A. fourcroydes* y Nobel en colaboración con Quero 1986 realizaron experimentos con *A. lechuguilla*, comparando los efectos de las temperaturas (día/noche) sobre la absorción de CO₂, en un periodo de 24 horas. Mantuvieron estos agaves en condiciones controladas a diferentes temperaturas: la temperatura media anual del lugar de origen de estas especies, una temperatura más alta y una más baja. Para *A. deserti* la temperatura media anual fue de 25/15 °C (día/noche), la temperatura más baja fue de 18/8 °C y con la temperatura más alta fue de 40/30 °C. En *A. fourcroydes* el tratamiento con la temperatura media del lugar fue de 30/20°C, el tratamiento con la más baja fue de 15/5 °C, y con la más alta fue de 40/30 al igual que con *A. deserti*. Para *A. lechuguilla* el tratamiento con la temperatura media anual del lugar fue de 25/9 °C, el tratamiento con la más alta fue de 31/16°C y con la más baja fue de 19/4°C (día/noche). En cuanto a la absorción nocturna encontró que la tasa más alta de fijación de CO₂, se encontraba para la temperatura media, y disminuía cuando se alejaba de este óptimo. En cuanto a la absorción diurna, siempre fue mayor para las temperaturas más bajas y menor para las más altas (Nobel y Quero, 1986). Sin embargo, esta respuesta global puede esconder diferentes sensibilidades a las temperaturas diurnas y nocturnas. Todos los estudios coinciden en que las temperaturas altas durante la noche (30°C), limitan la fijación nocturna de CO₂, aunque con diferentes sensibilidades dependiendo de la especie (Neales 1973; Nobel 1988; Nobel y Quero 1986; Pimienta-Barrios *et al.*, 2006; Salinas Estrada *et al.*, 2014).

Estado hídrico. Los estudios realizados por Nobel en plantas de *A. fourcroydes* de un año y medio de edad, muestran que la fijación de CO₂ es afectada por el estado hídrico de la planta, al ser estresadas durante 30 días por falta de riego la fijación de CO₂ decreció 99% en un periodo de 24h, con una temperatura nocturna de 20 y 30 °C de día (Nobel, 1985).

Al contrario, un estudio en *A. deserti* se mostró que después de 10 semanas de riego (diario) en plantas maduras se observó un cambio de modo CAM a C3. Los estomas se mantuvieron abiertos con la captura de CO₂ esencialmente durante el día mientras que el incremento nocturno en la acidez titulable se redujo de 400 mmol m⁻² en el modo CAM a menos de 40 mmol m⁻² en el modo C3 (Hartsock y Nobel, 1976).

Griffiths y colaboradores en el 2002, en un estudio que realizaron con *Kalanchoë daigremontiana*, bajo condiciones de buena humedad relativa, disponibilidad de agua y luz constante, encontraron que *Kalanchoë daigremontiana* exhibió las cuatro fases clásicas de una planta CAM; sin embargo, luego de un período corto de sequía, el patrón de las fases fue ajustado de tal manera que la fase II se vió reducida a 1 hora y la fase IV no se presentó. Después de reestablecer el riego se reestablecieron las cuatro fases nuevamente.

Dodd *et al.*, 2002 menciona que bajo condiciones de estrés hídrico severo algunas especies pueden mostrar un “CAM inútil” en donde los estomas permanecen cerrados día y noche previniendo la toma de CO₂ y la pérdida de agua; aun así, las plantas continuarían mostrando pequeñas fluctuaciones de ácidos de cuatro carbonos debido a la fijación de CO₂ respiratorio.

El caso de *Agave cupreata*. Se realizaron dos experimentos, los cuales consistieron en la tesis de licenciatura "Efecto de la temperatura nocturna sobre la fotosíntesis de *A. cupreata*", (Salinas Estada *et al*, 2014), en el primer experimento se siguió la dinámica diurna de las fluctuaciones de acidez titulable en respuesta a la temperatura nocturna, el segundo al seguimiento de los intercambios de gases y mediciones de fluorescencia consecutivos a la exposición a diferentes temperaturas nocturnas (15, 19, 23, 27, 31 y 35 °C), en 15 plantas de 4 años de edad por tratamiento, cada tratamiento correspondió a una temperatura.

En estos dos estudios, se encontró que aunque esta planta presentó la dinámica esperada para una planta CAM en cuanto al ciclo día noche de fijación y liberación del CO₂ (con una acumulación nocturna y una degradación diurna de acidez titulable), **no fue el caso para el control estomático**: el cierre estomático sólo fue parcial durante el día, llevando a una pérdida del CO₂ hacia la atmósfera. En este caso los dos estudios realizados no mostraron datos suficientes para poder dar una explicación del por qué no cierra completamente sus estomas durante el día y pierde CO₂, debido a que fueron observaciones. Sin ser la pérdida de CO₂ el objetivo de las investigaciones que se realizaron. Y dado que la pérdida del CO₂ fijado en la noche representa un costo energético considerable para la planta, sin ningún beneficio aparente, esta observación nos lleva a preguntarnos si este comportamiento es característica de *A. cupreata* o si se manifiesta únicamente en ciertas condiciones ambientales,

y si fuera el caso, cuales.

3.6 Métodos de estudio de la fotosíntesis en plantas CAM

3.6.1 Acumulación de acidez titulable

Por cada molécula de CO_2 fijada por una planta CAM se produce una molécula de ácido málico y dos iones de hidrógeno (Nobel, 1988). En algunas plantas, el ácido málico así formado puede ser convertido a ácido cítrico a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, pero esta transformación no altera la cantidad de radicales carboxílicos. Por lo tanto, la fijación de CO_2 produce un incremento en la acidez tisular, el cual es proporcional a la acumulación de ácido málico (o cítrico) en las vacuolas de las células. Para determinar los cambios diarios de la acidez tisular sólo se requiere hacer dos titulaciones del tejido, una al anochecer y otra al amanecer (Osmond *et al.*, 1994). La titulación se hace agregando a una muestra de tejido, molido y diluido en agua destilada, cantidades crecientes de base (en general hidróxido de sodio) para incrementar el pH de la solución hasta un punto de referencia neutro o ligeramente alcalino (en general, $\text{pH}=7$ o $\text{pH}=8.2$). La elección del pH del punto final de la titulación depende del pK del ácido involucrado ($\text{pK} = -\log [K]$ donde $[K]$ denota la concentración de una base requerida para disociar 50% del ácido (Nobel, 1998). Como el ácido málico es un diácido, cuyos pK son: $\text{pK}_1 = 3.4$ y $\text{pK}_2 = 5.1$ a 25°C la titulación a $\text{pH} 6.5$ o 7 remueve el 99% del H^+ que puede disociarse (Nobel, 1998). En caso de presencia de ácido cítrico, el pK de la acidez más débil es $\text{pK}_3 = 6.4$, por lo que se necesitaría titular hasta $\text{pH} 8.4$ para remover el 99% de los iones H^+ que pueden disociarse (Franco *et al.*, 1990).

3.6.2 Intercambios de gases: tasa de transpiración y asimilación de CO_2

Los intercambios de gases entre la planta y la atmósfera son la transpiración (flujo de vapor de agua que sale de la hoja) y la absorción o pérdida de CO_2 por la hoja (en las plantas CAM, la pérdida de CO_2 puede ocurrir no sólo por respiración, sino también por descarboxilación del malato). Estos intercambios se dan a través de los estomas, que son estructuras en forma de poros que atraviesan la epidermis de la hoja (Nobel, 1988). Cada uno de estos poros es delimitado por dos células especializadas (llamadas células oclusivas). Según el estado de turgencia de las células anexas, los estomas pueden abrirse (cuando las células oclusivas están turgentes) o cerrarse (cuando están flácidas) (Azcón-Bieto, 2000). En las plantas CAM,

la apertura estomática sigue la dinámica descrita anteriormente (abiertos en la noche y cerrados en el día) (Geydan y Melgarejo, 2005).

Existen varios métodos para medir los intercambios de gases en hojas. Todos están basados en el mismo principio, que consisten en encerrar la planta o una hoja en una cámara y medir las variaciones de concentraciones de gases (CO₂ y vapor de agua) que resultan de su actividad.

El analizador de gases por absorción en infrarrojo (IRGA LI-COR LI-6400) que funciona según este principio, en circuito abierto (es decir, que mantiene un flujo lento pero constante de aire alrededor de la hoja). El análisis de los intercambios de gases permite estimar dos variables interesantes desde el punto de vista fisiológico: la conductancia estomática y la presión parcial de CO₂ en la hoja. La conductancia estomática se calcula, a partir de la ley de Fick, como el coeficiente de proporcionalidad entre la transpiración y el gradiente de presión de vapor entre la hoja y el aire: $T = C_s (C_i^{H_2O} - C_a^{H_2O})$, donde T es la tasa de transpiración, $C_i^{H_2O}$ es la fracción molar de vapor de agua a saturación (función de la temperatura de la hoja), y $C_a^{H_2O}$ es la fracción molar de vapor de agua en el aire (función de la temperatura y humedad relativa del aire). Por lo tanto, conociendo la temperatura de la hoja y del aire y la humedad del aire es posible calcular la conductancia estomática. El valor de conductancia estomática permite cuantificar en qué medida los estomas están cerrados o abiertos. La difusión del CO₂ obedece a la misma ley: $A = (C_s/1.6) (C_a^{CO_2} - C_i^{CO_2})$, donde A es la tasa de asimilación y $C_a^{CO_2}$ y $C_i^{CO_2}$ son la fracción molar de CO₂ en la atmósfera y en la hoja respectivamente. El factor 1.6 traduce el menor coeficiente de difusión de CO₂. Por lo tanto, conociendo la tasa de asimilación, la conductancia estomática y la concentración de CO₂ en el aire, es posible estimar la concentración de CO₂ en la hoja y (cuando los estomas no estén totalmente cerrados) la presión parcial de CO₂ en la hoja. La presión parcial de CO₂ proporciona información sobre el balance entre los flujos que ocurren en la hoja durante el ciclo CAM (absorción por los estomas, producción por descarboxilación de los ácidos orgánicos almacenados en la noche y asimilación por el ciclo de Calvin). En caso de que la tasa de descarboxilación supere la de asimilación, se observará una presión parcial de CO₂ mayor en la hoja que en la atmósfera. En caso de que la tasa de asimilación (en el día) o de fijación (en la noche), o la suma de las dos (en fases de transición temprano en la mañana o durante la tarde) supere la de

descarboxilación, se observará una presión parcial de CO_2 inferior a la de la atmósfera.

El LI COR LI 6400 se coloca sobre la hoja una cámara diseñada en forma de pinza, que prensa los dos lados de la hoja y permite la circulación de aire entre los dos lados. Un dispositivo externo proporciona a la cámara un flujo constante de aire de composición (humedad y presión parcial de CO_2) estable. La pinza está equipada un medidor de flujo que mide el flujo entrante y de dos sensores de presión concentración de vapor de agua y CO_2 : uno en la entrada de aire, otro en la cámara. Al partir de la diferencia de composición entre el aire entrante y el de la cámara y del flujo, se calcula la tasa de transpiración de asimilación como se mencionó anteriormente. La cámara está además equipada de sensores de temperatura que miden la temperatura de la cámara y de la hoja, lo que permite hacer correcciones por la dilatación del aire entrante y calcular la presión de vapor saturante (www.licor.com).

Este equipo presenta varias limitaciones: Por una parte, la cámara del LI-COR no está diseñada para hojas gruesas y poco flexibles, lo que obliga a usar empaques más gruesos que los originales y verificar cuidadosamente la ausencia de fuga entre la pinza y la hoja. Por otra parte, por el diseño de la pinza y su tamaño, es muy difícil de colocarla en una hoja sin tener que eliminar las hojas vecinas, lo que hace muy difícil realizar mediciones in situ en plantas pequeñas (en plantas grandes, a cambio, las hojas son demasiado gruesas para colocar la pinza). Finalmente, sólo se dispone de un equipo en el IIAF, lo que solo permite realizar una medición a la vez y por lo tanto, no se pueden comparar diferentes tratamientos al mismo tiempo.

Para evitar estas limitaciones se ha desarrollado previamente un nuevo sistema de medición de fotosíntesis, llamado MACsuino (Medición de Asimilación y Conductancia estomática en plantas de metabolismo ácido de las crasuláceas con arduino). Una descripción completa de este dispositivo y su validación se presenta en el anexo 1. Para una breve presentación, este dispositivo consiste en un sistema cerrado de análisis de gases. Una cápsula transparente, que se coloca en la hoja, está acoplada a una cámara equipada con sensores humedad y CO_2 . Este sistema está conectado a una fuente de aire desecado a través de dos electroválvulas. Un sistema electrónico controla su funcionamiento para ejecutar periódicamente un ciclo de medición, que consiste en lo siguiente: en una primera fase se abre el sistema para remplazar el aire de la cápsula por aire ambiente desecado, y en una segunda fase se cierra y se analiza el cambio de presión parcial de vapor de agua y CO_2 en el aire que

circula en el sistema. A partir de la tasa de acumulación de humedad y de la tasa de disminución del CO_2 en la cámara (o de aumento en caso de respiración), se calculan la transpiración y la asimilación de la hoja. Las principales ventajas de este dispositivo son su bajo costo (que permite equipar varias plantas para mediciones simultáneas) y el hecho que puede funcionar de manera continua durante largos periodos de tiempo (días o semanas).

3.6.3 La fluorescencia de las clorofilas

Las clorofilas son pigmentos que tienen la propiedad de excitarse (adquirir energía) al absorber fotones de ciertas longitudes de ondas (azul y rojo) (Azcón-Bieto, 2000). La clorofila excitada puede liberar esta energía de diferentes maneras: 1) la vía fotoquímica es la más importante y consiste en la liberación de un electrón que inicia la serie de reacciones de óxido-reducción que constituyen la fase luminosa de la fotosíntesis, llevando a la producción de ATP y NADPH (reducido). La energía producida por esta vía es utilizada por varias vías metabólicas, principalmente la asimilación de CO_2 , pero también la fotorespiración, la reducción de nitrato, la asimilación de amonio. 2) las vías no fotoquímicas incluyen la disipación térmica de la energía de excitación (en forma de calor). 3) y la disipación por fluorescencia donde la energía es re-emitida en forma de luz roja de mayor longitud de onda que la absorbida por las clorofilas (Maxwell y Johnson, 2000). La energía de los fotones absorbidos se distribuye entre estos tres procesos disipativos, que compiten entre ellos mismos, por lo que un aumento en la fotosíntesis o en la disipación térmica resulta en una disminución de la fluorescencia. La fluorescencia constituye una fracción pequeña (3-4%) pero variable de energía total disipada, su medición proporciona información sobre la eficiencia del proceso de la conversión de energía radiante (Maxwell y Johnson, 2000).

Al pasar una hoja de la oscuridad a la luz, la fluorescencia aumenta rápidamente (en un lapso de alrededor de 1s). Esto se debe a que los transportadores de electrones de la membrana del tilacoide (en particular el primero de ellos, la plastoquinona Q_A), al recibir los electrones liberados por la clorofila, pasan a un estado reducido (o "cerrado") y no pueden recibir más electrones hasta que hayan sido oxidados por reacciones con los transportadores siguientes. Posteriormente (en algunos minutos, típicamente 15 a 20 min), la fluorescencia disminuye. Esto se debe a dos fenómenos: 1) la activación inducida por la luz de diversas enzimas del metabolismo fotosintético, 2) un aumento de la disipación de la energía de la

clorofila en forma de calor. Esta extinción de la fluorescencia se describe con el término "quenching". El "quenching" fotoquímico (qP) corresponde al primer mecanismo (activación del metabolismo fotoquímico), mientras que el "quenching" no fotoquímico (NPQ) corresponde al segundo (disipación térmica)(Maxwell y Johnson, 2000).

Se debe medir la fluorescencia bajo diferentes condiciones de tal manera que se pueda estimar la contribución de estos tres procesos. Los principales índices de fluorescencia y su significado:

- Rendimiento cuántico del fotosistema II (Φ_{PSII}): fracción de la radiación fotosintética utilizada en la fotoquímica,
- Rendimiento cuántico máximo de fotosistema II (Φ_{PSII}^{Max}): valor máximo del rendimiento cuántico cuando los centros de reacción están abiertos,
- *Quenching* fotoquímico (qP): contribución del metabolismo fotoquímico a la extinción de la fluorescencia,
- *Quenching* no fotoquímico: (NPQ): contribución de la disipación térmica a la extinción de la fluorescencia, (Maxwell y Johnson, 2000).

En plantas CAM, es de esperar que la demanda de electrones por los procesos fotoquímicos varíen en función de la disponibilidad de CO₂, el cual regula el ciclo de Calvin-Benson. En función de la fase del ciclo en la que se encuentra la fotosíntesis, el CO₂ de la hoja puede ser proporcionado por la descarboxilación del ácido málico y a través de los estomas.

En la práctica, la medición de fluorescencia se realiza con un equipo que consiste en un dispositivo de iluminación de intensidad variable (leds de color rojo y azules, capaces de producir intensidad de radiación desde bajas hasta superiores a las de la radiación solar) y un sensor de radiación sensible a la longitud de onda re-emitida por la clorofila.

Para las mediciones de fluorescencia los equipos modernos utilizan el principio de "luz modulada" que permite medir la fluorescencia de la clorofila independientemente de la fluorescencia inducida por la radiación ambiente, o fotosintéticamente activa. Esta "luz modulada o luz de medición" (LM) consiste en una fuente de luz que emite pulsos de baja intensidad y de muy corta duración, entre 250 y 2000 veces por segundo. Estos pulsos inducen un aumento de la fluorescencia inmediatamente después de cada pulso. Dado que los pulsos de luz de medición son de baja intensidad y muy corta duración, no alteran el estado de las cadenas transportadoras de electrones ni las reacciones fotoquímicas de las enzimas (Maxwell

y Johnson, 2000).

El protocolo clásico de mediciones se realiza en una hoja previamente aclimatada a la oscuridad figura 4A, mientras que las mediciones de Salinas Estrada *et al*, 2014 empezaron con hojas aclimatadas a la luz ambiente figura 4B.

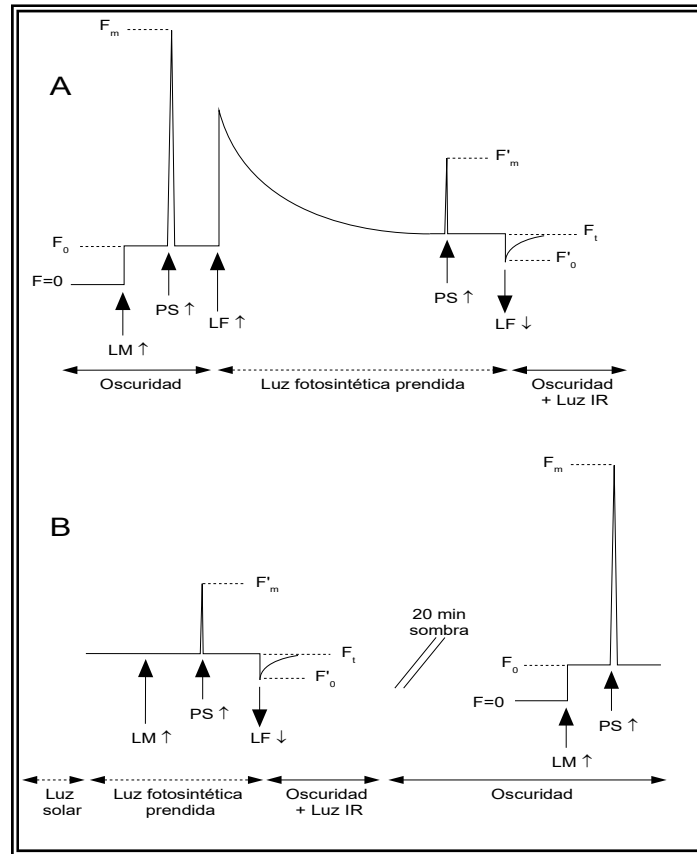


Figura 4. Protocolo de medición de la fluorescencia. La línea continua representa el valor de la fluorescencia medida en presencia de luz de medición. Las flechas indican los tiempos en que se prenden o apagan la fuente de luz de medición y los leds que emiten la radiación ambiente. Las abreviaciones son: LM $\uparrow$, luz de medición (intermitente, de baja intensidad y pulsada); PS $\uparrow$, pulso saturante (de unos ms y de alta intensidad); LF $\uparrow$, luz fotosintética (continúa y de intensidad ambiente); LF $\downarrow$, apagado de la luz fotosintética. Las mediciones de fluorescencia corresponden a las condiciones siguientes: F_0 , fluorescencia de la hoja aclimatada a la oscuridad, en ausencia de luz fotosintética; F_m , fluorescencia de la hoja aclimatada a la oscuridad, en presencia de un pulso de luz saturante; F'_m y F'_0 , mismas que las anteriores pero en una hoja aclimatada a la luz fotosintética; F_t , fluorescencia medida bajo luz fotosintética en una hoja aclimatada a la luz fotosintética.

IV HIPÓTESIS

4.1 Hipótesis general

Se espera que, *A. cupreata* presente un metabolismo fotosintético tipo CAM, pero que

fluctuaciones de temperatura y radiación solar pueden afectar la sincronización entre los procesos involucrados en este metabolismo, llevando a pérdidas de eficiencia en la fotosíntesis.

4.2 Hipótesis particulares

Las fluctuaciones a corto plazo de la radiación y temperatura durante el día afectan la sincronización entre la conductancia estomática y la absorción de CO₂, se esperan pérdidas de CO₂ hacia la atmósfera durante el día.

La fijación CO₂ y la conductancia estomática durante la noche son afectadas por la radiación recibida durante el día anterior

Las plantas aclimatadas al sol tendrán mejor desempeño en su metabolismo fotosintético (mayor tasa de fijación/d Descarboxilación de CO₂) que las aclimatadas a la sombra.

Se espera que la adaptación a un déficit hídrico se traduzca en una menor apertura estomática tanto diurna como nocturna. Como consecuencia, se espera una reducción de la fijación nocturna de CO₂, pero también de las pérdidas de CO₂ durante el día.

La rehidratación posterior a un periodo de déficit hídrico debería traducirse por una recuperación rápida de las actividades fotosintéticas, y que las plantas bajo sombra presenten una recuperación más rápida que expuestas al sol.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar la dinámica día-noche del metabolismo CAM en *A. cupreata* bajo condiciones ambientales naturales de temperatura, radiación solar y estado hídrico.

5.2 Objetivos particulares

Medir la acumulación nocturna de la acidez titulable y su evolución durante el día, el intercambio de gases y la fluorescencia de la clorofila en hojas de *A. cupreata* mantenidas a diferentes niveles de temperatura, radiación solar y estado hídrico, sometidas o no a un proceso de aclimatación a la exposición solar y al sombreado.

Caracterizar el efecto de las fluctuaciones a corto plazo de la radiación y la temperatura durante el día mediante mediciones de intercambio de gases en diferentes hojas de una misma planta en *A. cupreata*.

Capítulo 1: Aspecto general de los ciclos de intercambio de gases en *Agave cupreata*

1.1 Introducción

El principal objetivo de este capítulo consiste en describir el aspecto general de la dinámica de intercambio de gases en *A. cupreata* bajo diferentes condiciones ambientales. Se presentan los ciclos de intercambio de gases medidos de manera continua con los MACsuinos en los cuatro experimentos realizados. Esto nos permitirá obtener una vista general de su dinámica en plantas de *A. cupreata* de diferentes edades, aclimatadas a diferentes condiciones ambientales, y medidas en diferentes temporadas del año. Los capítulos siguientes presentarán un análisis detallado de las respuestas a la radiación solar y al estado hídrico observadas en estas plantas.

1.2 Material y métodos

Material vegetal: las plantas de *A. cupreata* que se utilizaron fueron donadas por el Ing. Guadalupe Pérez Toledo, de su vivero ubicado en el municipio de Tzitzio, Michoacán, en noviembre del 2010. Las plantas se mantuvieron al aire libre, en macetas de 2L con un sustrato de perlita-turna (60%-40% v/v), sin fertilizar y regadas por la lluvia. En el 2014 se utilizaron para dos experimentos donde se midió el intercambio de gases, fluorescencia de clorofila y acidez titulable bajo diferentes temperaturas nocturnas. Seis meses antes de estos experimentos, las plantas fueron regadas una vez por semana y fertilizadas con fertilizante “triple diecisiete” (NPK: 17-17-17), en dosis de 0.5 g/planta dos veces al mes. Posterior a estos estudios las plantas fueron mantenidas al aire libre por 10 meses, después se trasplantaron en macetas de 3L con 40 % materia orgánica (aserrín), 40 % tierra y 20 % perlita. Se colocaron en un invernadero cubierto de malla sombra de color blanco y recibieron riego asistido en temporada de sequía. Para el inicio de los experimentos las plantas contaban con un diámetro de 23 cm y en promedio cada planta tenía 14 hojas y una edad aproximada de 6 años.

Mediciones

Intercambio de gases: para realizar las mediciones de intercambio de gases con el MACsuino en las plantas, se colocó la cápsula de cada MACsuino entre la tercera y cuarta última hoja en desplegarse del cogollo, a la mitad de la hoja sobre el haz. Los ciclos de medición fueron de

entre 15 y 30 minutos según el experimento (la mitad del ciclo abierto y la mitad cerrado).

Medición de las condiciones meteorológicas: una estación meteorológica (Marca Davis, modelo Vantage Pro) se instaló a un metro de distancia de los experimentos. Se registró cada 10 minutos temperatura, humedad relativa, radiación solar y velocidad del viento.

Experimentos realizados

Primer experimento: se realizó para caracterizar la dinámica de intercambio de gases día-noche en *A. cupreata* y para probar el funcionamiento del primer prototipo de MACsuino. Se utilizaron dos plantas provenientes del invernadero del IIAF. Dos semanas antes del experimento, una planta se sacó del invernadero para aclimatarse al sol, mientras que la otra planta se pasó al sol únicamente el día del experimento. Al momento del experimento, las plantas tenían un diámetro de 30 cm y entre 12 y 15 hojas.

Las plantas se colocaron sobre una mesa al aire libre con sus respectivos MACsuinos. Entre la tercera y la quinta última hoja en desplegarse del cogollo se pegaron las cinco capsulas de los MACsuinos H1, H2, H3, H4 y H5) a la mitad de las hojas. Debido a su posición en la planta y su inclinación, las hojas presentaron diferente exposición al sol. En la planta aclimatada al sol, se colocaron las cápsulas de los MACsuinos H1 (expuesta hacia el noroeste), y H2 (al este). En la planta sin aclimatación, se colocaron las cápsulas H3 (expuesta hacia suroeste), H4 (al este). La cápsula del MACsuino H5 se colocó en el envés de una hoja expuesta al sur-este.

En este experimento se utilizó, el primer prototipo de MACsuino equipado con un ventilador, colocado en una cámara aparte y dos válvulas colocadas en los tubos de conexión a la cápsula, figura 5). Se programaron dos ciclos con diferentes tiempos de apertura y cierre del sistema para evitar la condensación dentro del sistema: el ciclo uno duro 40 minutos cerrado (hace mediciones de aire y vapor de agua que se encuentra dentro del sistema) y 15 minutos abierto (no mide solo intercambia el aire analizado por aire nuevo). Al terminar el ciclo uno, comenzaba el ciclo dos con 20 minutos cerrado y 45 abierto. Al terminar el ciclo dos volvía a comenzar el ciclo uno.



Figura 5. Medición de intercambio de gases con el primer prototipo de MACsuino, en dos plantas de *A. cupreata* durante ocho días.

Segundo experimento: en este experimento, se siguió la dinámica de intercambio de gases día-noche durante ocho días, en una planta de mayor edad (de edad desconocida, pero alrededor de 10 años y con un diámetro de 40 cm), cultivada durante los últimos 6 meses al aire libre con un riego y fertilización adecuados. Las mediciones de intercambio de gases se realizaron con una versión mejorada del primer prototipo de MACsuino en la cual se cambiaron las fuentes de poder para eliminar la deriva del sensor de CO₂ y se agregó un sistema de secado de aire, y se diseñó un sistema para sujetar las cápsulas de medición.

La planta se colocó sobre una mesa al aire libre. Las cápsulas de los MACsuinos se pegaron a la mitad de las hojas, de la segunda a la quinta última hoja en desplegarse del cogollo. Se colocaron cuatro MACsuinos en cuatro hojas: la hoja en la que se pegó la capsula del MACsuino H1 tenía una posición casi horizontal, orientada al sureste y con una coloración ligeramente roja), el MACsuino H2 en una hoja orientada al sur, con una coloración entre verde y azul, el MACsuino H3 en una hoja orientada al norte, también con una coloración entre verde y azul y el MACsuino H4 en una hoja orientada al oeste con una verde oscuro. Se hace referencia a la orientación cardinal de las hojas debido a que, la radiación solar que reciben las hojas podría ser diferente en el transcurso del día, si tomamos en cuenta la inclinación y la

orientación de las hojas.

Los MACsuinos se programaron con ciclos de 30 minutos (10 minutos abierto y 20 minutos cerrado). Se lograron obtener mediciones de intercambio de gases durante 9 días seguidos, sin observar condensación, ni fugas, ni otros problemas del sistema.

Tercer experimento: se midió el intercambio de gases en plantas aclimatadas al sol y en plantas aclimatadas a la sombra para caracterizar las respuestas a cambios en el nivel de radiación. Para este experimento se utilizaron 24 plantas provenientes del invernadero. Estas plantas, en sus macetas, fueron transportadas a una azotea y sometidas a dos tratamientos de aclimatación a la radiación solar: un grupo de 12 plantas fueron mantenidas en el sol, y otro grupo de 12 plantas fueron instaladas bajo una malla sombra (transmitancia del 50% de la radiación solar), instalada sobre las plantas a 70 cm del suelo) durante los 30 días anteriores al experimento (figura 6a).



Figura 6. Periodo de aclimatación (a) y periodo de mediciones de intercambio de gases (b) con los MACsuinos en dos plantas aclimatadas a la sombra y en dos plantas aclimatadas al sol.

Después de los 30 días de la fase de aclimatación, se iniciaron las mediciones de intercambio de gases colocando cuatro MACsuinos en dos plantas de cada tratamiento (figura 6b).

Todos los MACsuinos se instalaron en hojas de características similares (tercera o cuarta hoja

desplegada, y orientada hacia el sur). Dos MACsuinos etiquetados como H3 y H5 fueron colocados en plantas bajo sombra, y dos otros etiquetados como H1 y H4 en plantas expuestas al sol. Las mediciones con los MACsuinos se realizaron con ciclos de 30 minutos (15 minutos abierto y 15 minutos cerrado).

Al décimo día de mediciones de intercambio de gases, se probó el efecto de un cambio de insolación en dos plantas equipadas con MACsuinos: la planta con el MACsuino H5 aclimatada a la sombra fue desplazada al sol, mientras que otra planta aclimatada al sol que tenía el MACsuino H4 fue desplazada a la sombra. Se mantuvieron estas condiciones durante 5 días, al término de estos cinco días la planta con el MACsuino H5 se regresó a la sombra y la planta con el MACsuino H4 se regresó al sol, El MACsuino H1 se descompuso al sexto día.

Cuarto experimento: respuestas al estrés hídrico y a la rehidratación

Para el cuarto experimento se utilizaron las mismas 24 plantas del tercer experimento, las cuales se mantuvieron en las mismas condiciones de exposición a la radiación que en el tercer experimento (12 plantas expuestas directamente al sol y 12 bajo malla sombra). Solo que sin recibir riego durante tres meses. Se midió el intercambio de gases durante 16 días en 5 plantas, tres aclimatadas al sol con los MACsuinos H1 (figura 7 A), H2 (figura 7 B) y H5 (figura 7C) y dos aclimatadas a la sombra con MACsuinos H3 y H4. El objetivo del experimento fué monitorear las respuestas fotosintéticas a la rehidratación, por lo que los tratamientos previstos consistían en regar la mitad de las plantas (6 plantas bajo sol y 6 bajo sombra) a los cinco y a los doce días después de iniciar las mediciones de intercambio de gases y dejar a las demás como control sin riego. Sin embargo, el paso de un ciclón causó lluvias durante el sexto y séptimo día de mediciones, por lo que todas las plantas acabaron perfectamente rehidratadas. La única diferencia fue la rapidez de la rehidratación, que empezó más temprano que el tratamiento de riego.

1.3 Resultados

Primer experimento

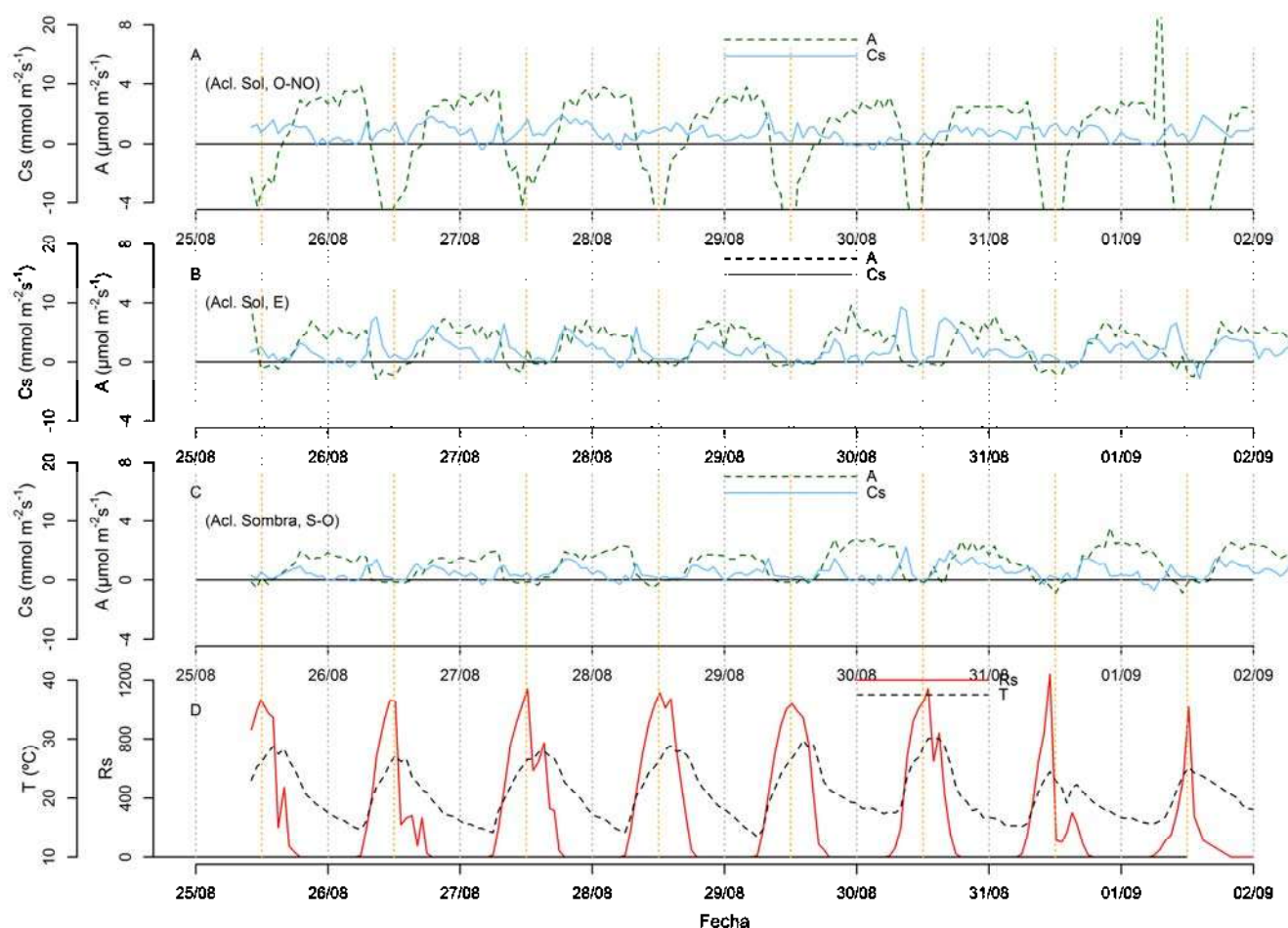


Figura 7. Dinámica de intercambio de gases. A, B y C. Tasa de asimilación y conductancia estomática observada en tres hojas durante el periodo incluido entre el 25 de agosto y 2 de septiembre del 2015. Las mediciones se realizaron con los MACsuinos. E. Temperatura y radiación solar ambiente medidos por la estación meteorológica.

Varias fallas impidieron obtener datos completos de intercambio de gases en el primer experimento. Por un lado, la fuente de poder resultó inadecuada, lo que llevó a una deriva del sensor de CO_2 después del quinto día en dos MACsuinos. Una segunda falla fue que se despegaron de la hoja dos cápsulas de los MACsuinos H4 y H5. Una tercera falla fue que, al proporcionar aire ambiente demasiado húmedo al sistema, se observó condensación en las cámaras de medición, lo que hizo imposible la adquisición de datos de transpiración. Al final del experimento, sólo se pudieron explotar los datos de asimilación de tres hojas medidas por los MACsuinos H1, H2 y H3.

Segundo experimento

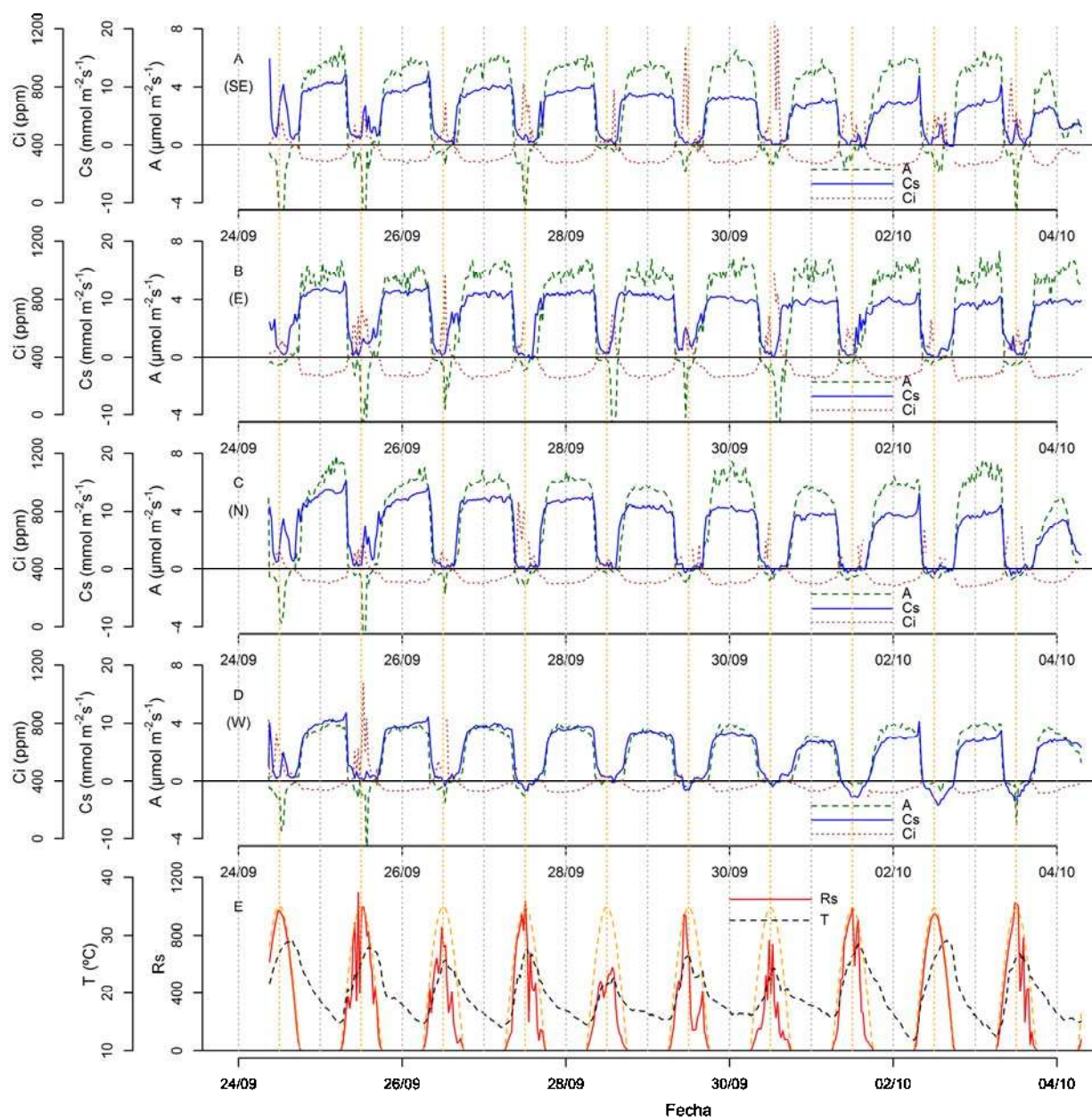


Figura 8. Dinámica de intercambio de gases. A, B, C y D Tasa de asimilación y conductancia estomática observada en cuatro hojas de la misma planta durante el periodo incluido entre el 24 de septiembre y el 3 de octubre del 2015. E. Temperatura y radiación solar ambiente medidos por la estación meteorológica.

Tercer experimento: respuestas al sombreado

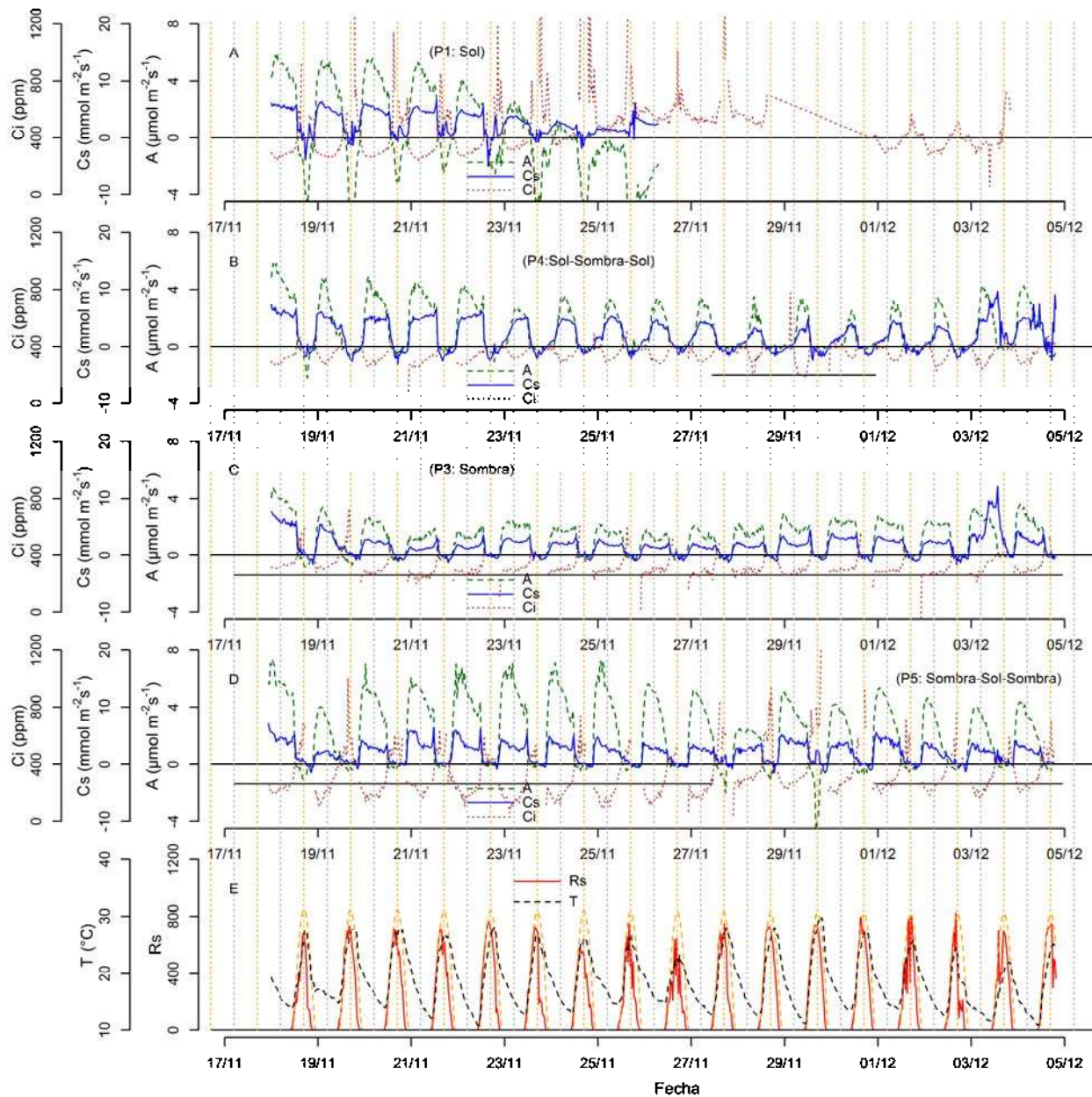


Figura 9. Dinámica de intercambio de gases. A, B, C y D. Tasa de asimilación y conductancia estomática observada en 4 hojas aclimatadas durante un mes con dos condiciones de radiación solar (sol y sombra). El periodo de mediciones fué del 19 de noviembre y al 5 de diciembre del 2015. E. Temperatura y radiación solar ambiente medidos por la estación meteorológica. La línea negra debajo de la línea cero de las gráficas representa el periodo de sombreado.

Cuarto experimento: estrés hídrico y rehidratación

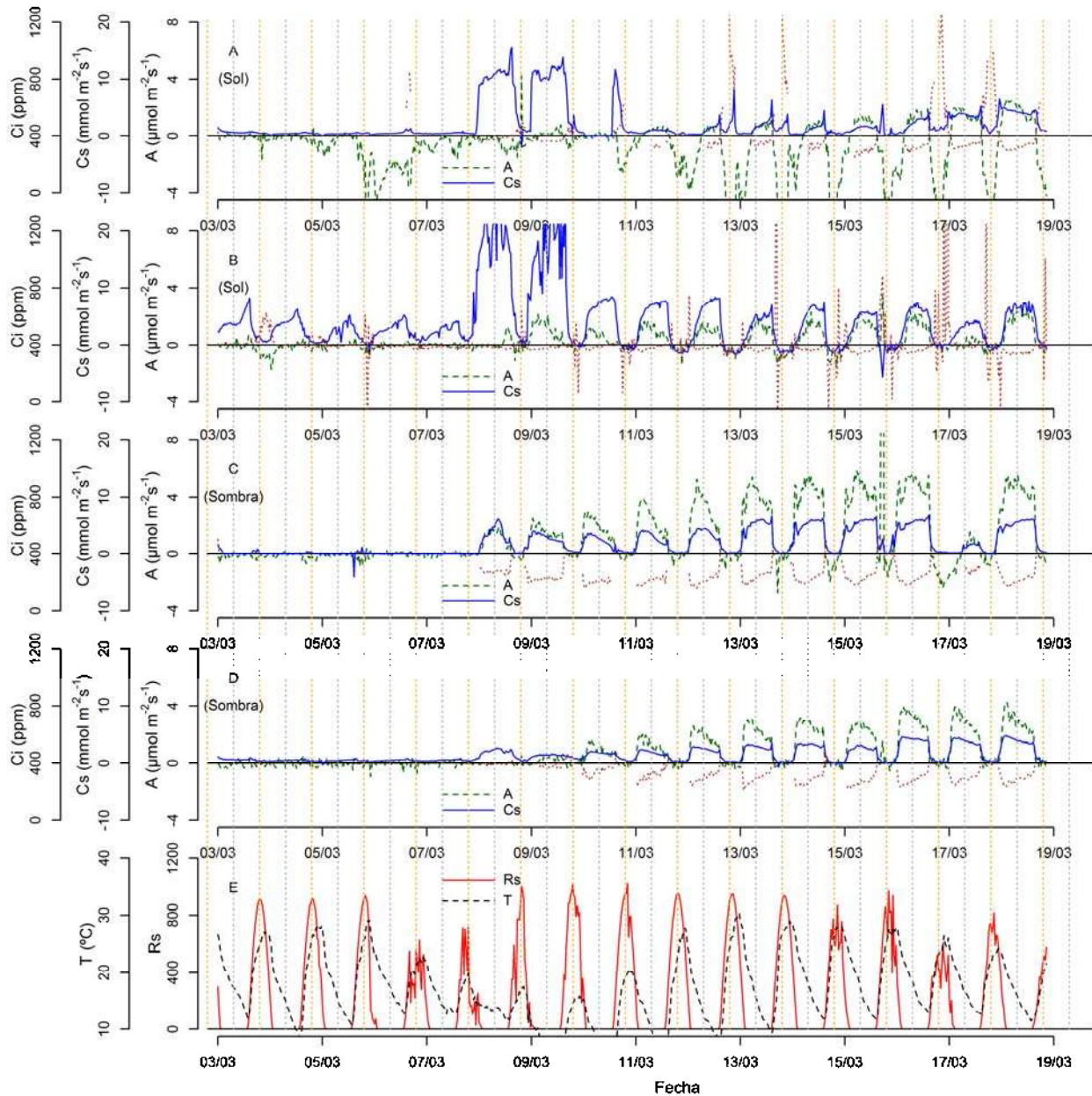


Figura 10. Dinámica de intercambio de gases. A, B, C y D Tasa de asimilación y conductancia estomática observada en 4 hojas; 2) aclimatadas al sol (A y B) y dos aclimatadas a la sombra (C y D) en estrés hídrico del 03 al 07 de marzo del 2016 y regadas los días, 8, 9 y 15 de marzo del 2016, durante el período incluido entre el 03 y el 19 de marzo del 2016. E Temperatura y radiación solar del ambiente fueron medidos por la estación meteorológica.

Características generales del ciclo de intercambio de gases observado

En todos los experimentos realizados, la dinámica de intercambio de gases durante el ciclo día-noche en estas plantas de *A. cupreata* presentó las cuatro fases descritas en el ciclo CAM por Winter y Smith, (1996):

- Fase I: Durante la noche *A. cupreata* presentó estomas abiertos y fijación de CO₂. Los valores de conductancia estomática y asimilación durante la noche variaron entre experimentos y entre hojas, pero en general la conductancia estomática y la tasa de fijación máxima fueron entre 5 y 10 mmol m⁻² s⁻¹ y entre 4 y 6 μmol m⁻² s⁻¹ respectivamente.

- Fase II: Al inicio del día los estomas permanecieron abiertos y se continuó fijando CO₂ y se cerraron en general una o dos horas después de la salida del sol. Al mismo tiempo que se cerraron los estomas la fijación de CO₂ terminó.

- Fase III: durante el día los estomas generalmente estuvieron cerrados, con una conductancia estomática y la fijación de CO₂ prácticamente nulos.

- Fase IV: En la tarde los estomas se abrieron nuevamente y la fijación de CO₂ inició. La hora de la apertura estomática y su rapidez variaron entre experimentos y entre hojas de una misma planta.

El ciclo de intercambio de gases de en estas plantas de *A. cupreata* presentó varias particularidades con respecto un ciclo CAM típico. Durante el día (fase III), se presentaron en algunos casos de periodos cortos de apertura estomática, los cuales a veces fueron acompañados de una pérdida de CO₂, a veces no. Este comportamiento se observó solo algunos días y en algunas hojas (por ejemplo los días 24 y 25 de septiembre figura 7, 28 y 30 de noviembre figura 9D). También se observaron dinámicas muy variables durante la tarde (fase IV): En ocasiones la apertura ocurrió al momento de la puesta del sol, en otras desde el mediodía (por ejemplo los días 25 y 26 de septiembre figura 8B). También se observó que en algunos casos donde la apertura estomática de la tarde no fue acompañada de una asimilación de CO₂, como se espera durante la fase IV, sino por una pérdida (por ejemplo el día 25 y 26 de septiembre figura 1.2 B y C). Durante la noche se observaron diferencias en las dinámicas de conductancia estomática y asimilación: En unos casos, la conductancia estomática y la tasa de asimilación se mantuvieron relativamente constantes durante la noche; en otros se observaron valores altos de conductancia y asimilación al inicio de la noche pero ambos (o en unos casos sólo la tasa de asimilación) disminuyeron durante el resto de la noche (por ejemplo

los días 26 y 27 de septiembre figura 8C, con valores constantes y los días 25 y 26 de noviembre figura 9B y D disminuyeron durante la noche).

1.4 Discusión y conclusiones

Las plantas responden a las condiciones ambientales, algunas de estas respuestas ocurren gracias a la plasticidad, que es la capacidad de las plantas de modificar momentáneamente algún proceso en su metabolismo. En el caso de *A. cupreata* se presentó un ciclo típico de una planta CAM en cuanto a la asimilación y conductancia estomática, con pequeñas variaciones (plasticidad) como la apertura diurna de los estomas, la pérdida de CO₂ durante el día, apertura estomática anticipada en la tarde y la variación en el tiempo de apertura estomática entre hojas. Estas variaciones no se observaron todos los días, ni en todas las hojas por lo que podrían deberse a las condiciones ambientales y fisiológicas de las hojas. Las condiciones ambientales en las que ocurren estas variaciones se analizan más a detalle en el segundo capítulo.

En muchos casos, se observó una pérdida de CO₂, sea alrededor del mediodía o en la tarde. Este hecho ya se había observado en un trabajo anterior (Salinas Estrada *et al.*, 2014). El hecho de que se volviera a observar, pero ahora en varios días y en diferentes hojas corrobora que no era un artefacto, y que se debió probablemente a la plasticidad del metabolismo fotosintético de *A. cupreata* en respuesta a ciertas condiciones ambientales.

Capítulo II. Análisis detallado de la dinámica de intercambio de gases en *A. cupreata* bajo fluctuaciones naturales de radiación solar y temperatura

2.1 Introducción

Los ambientes en que crece *A. cupreata* se caracterizan a menudo por fuertes variaciones de radiación y temperatura a corto plazo (sombra por árboles, sombras por relieve, nubes y orientación). Estas fluctuaciones pueden afectar la fotosíntesis y su regulación (tasa de descarboxilación, asimilación y regulación estomática), pero estos efectos no han sido investigados. El metabolismo puede presentar plasticidad ante variaciones ambientales como la temperatura y la radiación solar entre otros.

Con el objetivo de identificar patrones en estas variaciones, en este capítulo analizamos de manera detallada las fluctuaciones de conductancia estomática y absorción de CO₂ durante varios días que presentaron condiciones meteorológicas distintas. Se presentan los datos, siguiendo nuestra hipótesis, clasificando los días de mediciones de la manera siguiente: 1) días totalmente soleados, 2) días nublados durante todo el día, 3) días nublados sólo durante la tarde, 4) un único día que presentó nubes durante la mañana pero no durante la tarde.

Nuestras hipótesis de trabajo son: 1) que las plantas de *A. cupreata* presentan cierta plasticidad en el ciclo CAM, tanto en la dinámica de conductancia estomática como en la de absorción de CO₂, 2) que la conductancia estomática y la fijación y asimilación de CO₂ están reguladas de manera parcialmente independiente por fluctuaciones de condiciones meteorológicas (temperatura y radiación solar), 3) que existen periodos en que conductancia estomática y absorción de CO₂ no está perfectamente sincronizados, durante los cuales se pueden presentar pérdidas de CO₂ hacia la atmósfera, 4) si la apertura y cierre estomáticos están regulados por la temperatura y la radiación solar, los estomas deberán abrirse bajo condiciones de baja radiación solar y temperatura y deberían cerrarse con temperaturas altas y excesivas.

2.2 Material y métodos

Los diferentes días que se caracterizan en este capítulo 1) días totalmente soleados, 2) días nublados durante todo el día, 3) días nublados sólo durante la tarde, 4) un único día que presentó nubes durante la mañana pero no durante la tarde) fueron extraídos del segundo experimento mencionado en el capítulo I, en donde se midió el intercambio de gases en cuatro hojas de la planta grande (10 años de edad con 30 cm de diámetro aproximadamente) con los MACsuinos.

2.3 Resultados

El análisis detallado del intercambio de gases durante la fase diurna (que se muestra a continuación) muestra diferencias visibles no sólo entre días diferentes sino también entre hojas de la misma planta.

Días soleados

En días soleados figura 11, el ciclo del CO₂ se caracterizó por tiempos muy marcados, e idénticos para todas las hojas, para el inicio de la fase diurna (fin de la fijación nocturna en la mañana) y de la fase nocturna (inicio de la fijación en la noche). La fijación nocturna se detuvo alrededor de dos horas después de la salida del sol, y reinició prácticamente a la hora de la puesta del sol. El cierre estomático, en cambio, fue muy diferente entre los dos días observados y, para determinado día, entre hojas. En la mañana, todas las hojas cerraron los estomas al mismo tiempo que iniciaba la fijación de CO₂, pero en la tarde presentaron dinámicas diferentes. En ambos casos, una hoja inició la apertura estomática de manera rápida al momento de la puesta del sol mientras que en otra hoja la apertura fue progresiva, empezando en ambos casos alrededor de las dos de la tarde y logrando su máximo a la puesta del sol. Otra hoja presentó un comportamiento intermedio: el día 2 de octubre los estomas se abrieron al mismo tiempo, mientras que el 24 de septiembre empezaron a abrirse durante la tarde (alrededor de las 17:00 horas). En ambos casos, las tres hojas mostraron dinámicas muy similares de concentración interna de CO₂: la concentración interna presentó un pico entre las 11:00 y 13:00. La mayor concentración fue alcanzada alrededor de las 12:00, pero en ningún caso alcanzó valores superiores a los 600 ppm. En la tarde, se observó una concentración de CO₂ prácticamente igual a la atmosférica (400 ppm) entre las 13:00 y 18:00 horas figura 11.

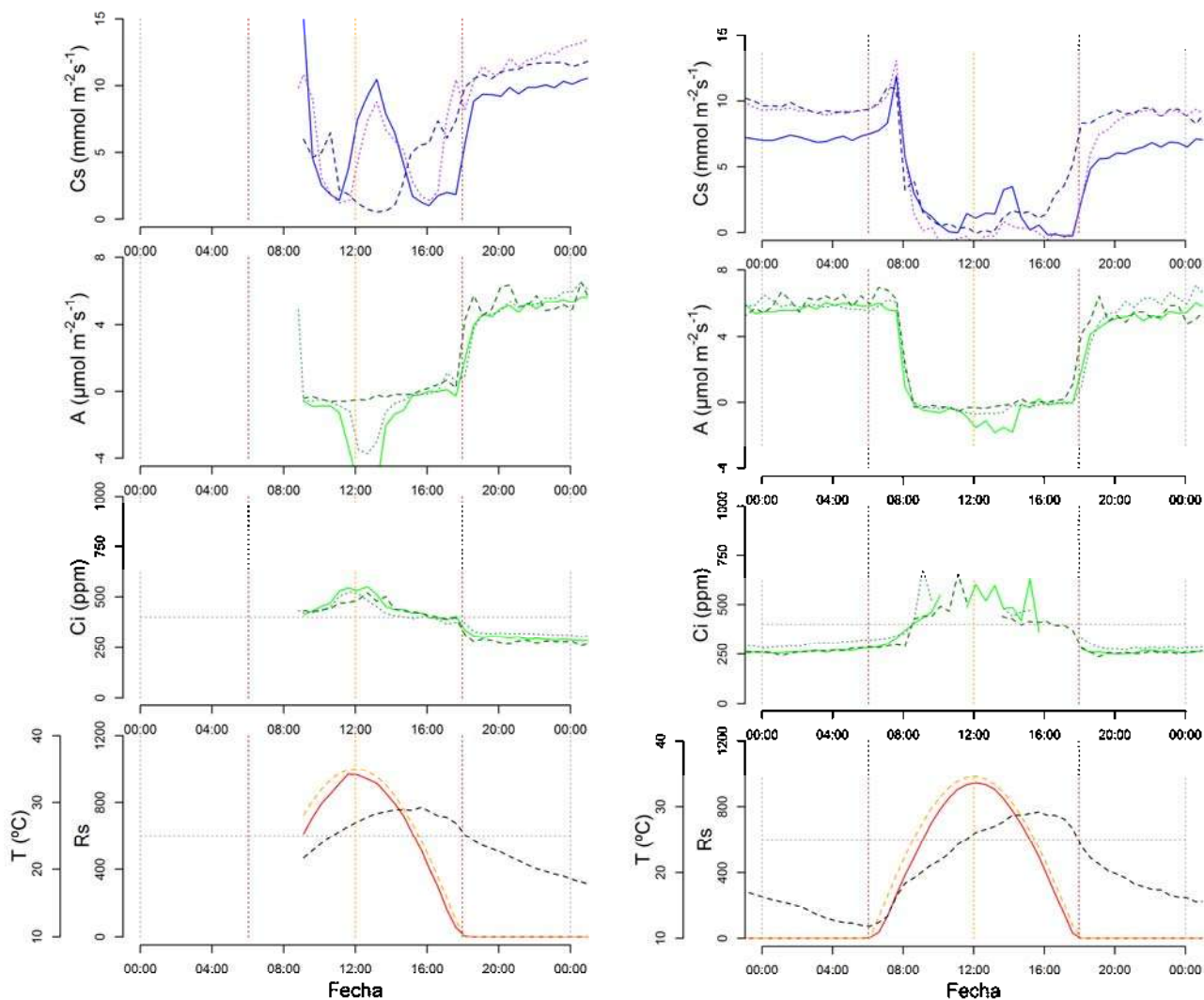


Figura 11. Dinámica de intercambio de gases durante dos días soleados. Conductancia estomática (Cs), asimilación (A) y concentración interna de CO_2 en la hoja (Ci), en tres hojas de una misma planta de 10 años de edad. La temperatura (T) y radiación solar (Rs). La línea punteada naranja indica la radiación solar esperada en ausencia de nubes. Las líneas verticales punteadas indican respectivamente la media noche, el medio día, y las horas de salida y puesta del sol.

Un comportamiento particular fue observado entre las 12:00 y 14:00 en dos hojas, con un periodo de apertura estomática y pérdida concomitante de CO_2 , centrado alrededor de las 13:00 horas figura 11 lado izquierdo. El 24 de septiembre este comportamiento fue muy marcado en ambas hojas (figura 11 lado izquierdo), mientras que el 2 de octubre sólo afectó a una hoja y la pérdida de CO_2 fue mínima (figura 11 lado derecho). Los datos meteorológicos proporcionan poca información sobre las diferencias: los dos días, en ausencia de nubes,

presentaron dinámicas muy similares de radiación solar y de temperatura, aunque la temperatura fue ligeramente más alta en la mañana del 24 de septiembre.

Días nublados

En días nublados figura 12, el ciclo del CO₂, como en días soleados, se caracterizó por tiempos bien marcados, e idénticos en las tres hojas, para el inicio de la fase diurna (fin de la fijación nocturna en la mañana) y de la fase nocturna (inicio de la fijación en la noche). La principal diferencia con los días soleados fue que la fijación nocturna inició alrededor de dos horas más temprano (a las 16:00 en vez de las 18:00 horas). El cierre estomático también estuvo sincronizado con el ciclo de asimilación, excepto en una hoja, donde los estomas empezaron a abrirse prácticamente al mediodía. Las tres hojas mostraron dinámicas similares de concentración interna de CO₂, pero estas dinámicas difirieron entre los dos días estudiados. El 28 de septiembre (figura 12 lado izquierdo), la concentración interna de CO₂ fue cercana a la atmosférica durante la mayor parte de la mañana, pero se incrementó hasta alcanzar alrededor de 700 ppm alrededor de las 13:30 horas. El 1 de octubre (figura 12 lado derecho), al contrario, la concentración de CO₂ en las hojas medidas alcanzó valores más altos, arriba de 900 ppm. En ambos casos, la mayor concentración fue alcanzada alrededor de las 13:30, más tarde que en los días soleados en que se alcanzaba alrededor de las 12:00 horas. En ambos días medidos, se observó en una hoja pérdida de CO₂ entre las 13:00 y 15:00, momentos en que la concentración interna era alta y los estomas estaban abiertos. En las otras hojas, sin embargo, no se observó pérdida de CO₂. Al igual que en los días soleados, los datos meteorológicos no presentaron diferencias muy importantes entre los dos días considerados: en ambos casos, la radiación solar fue baja, y las temperaturas también, alcanzando un poco menos de 25 °C poco después del mediodía.

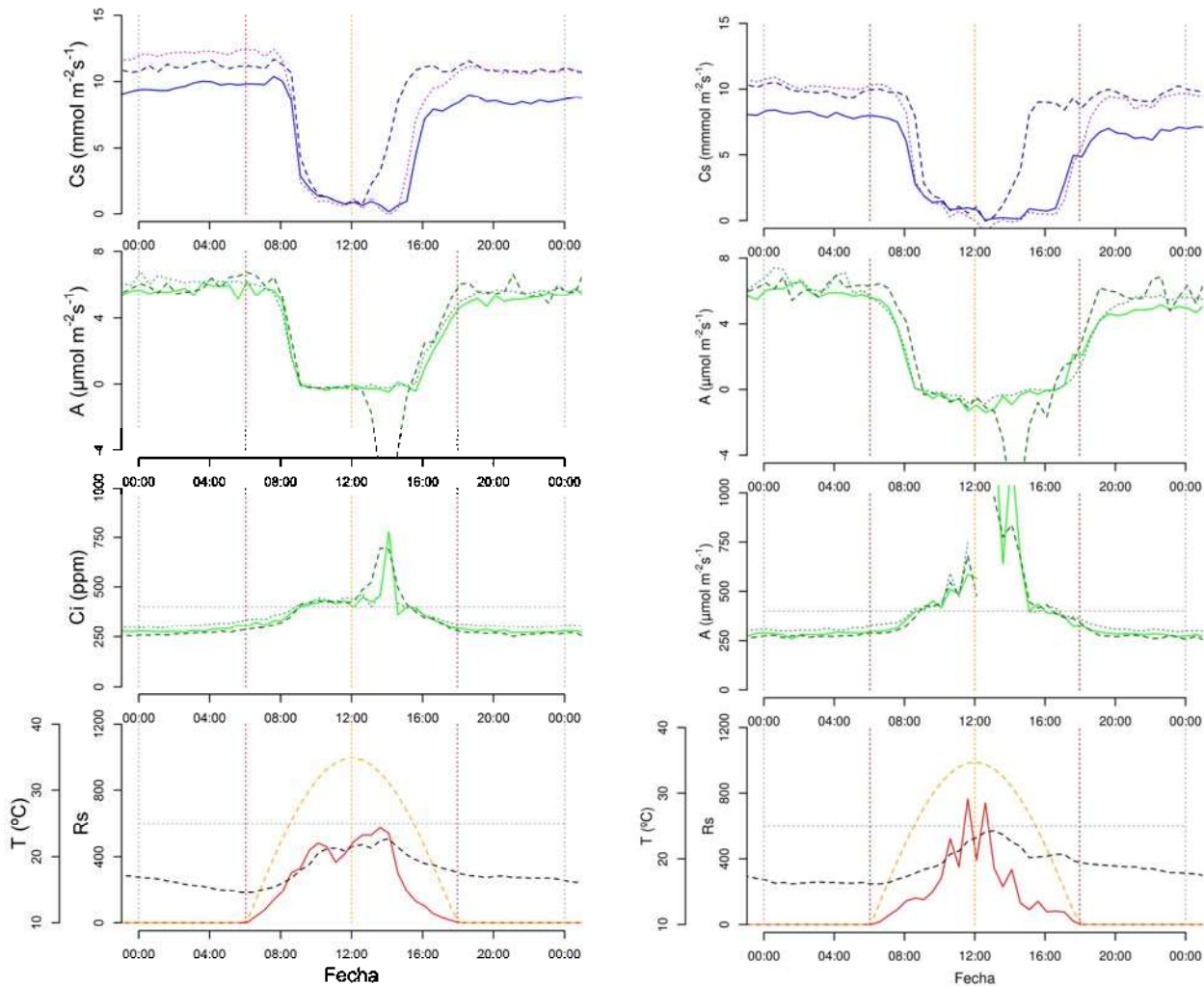


Figura 12. Dinámica de intercambio de gases durante dos días nublados. Conductancia estomática (Cs), asimilación (A) y concentración interna de CO_2 en la hoja (Ci), en tres hojas de una misma planta de 10 años de edad. La temperatura (T) y radiación solar (Rs). La línea punteada naranja indica la radiación solar esperada en ausencia de nubes. Las líneas verticales punteadas indican respectivamente la media noche, el medio día, y las horas de salida y puesta del sol.

Días soleados en la mañana y nublados en la tarde

Las condiciones meteorológicas caracterizadas por días que empiezan soleados, pero se empiezan a nublar en la tarde por la formación de nubes convectivas, representan la situación más frecuente durante la temporada de lluvia figura 13. Estas condiciones se encontraron en varios días del experimento, pero sólo se muestran dos casos: el 3 de octubre (figura 13 lado

izquierdo) y el 29 de septiembre (figura 13 lado derecho). En ambos casos, la dinámica de cierre estomático y absorción de CO₂ presentó diferencias importantes con los días soleados o uniformemente nublados. En ambos días, la apertura estomática y la absorción de CO₂ iniciaron temprano en la tarde (entre las 13:00 y 18:00 según las hojas), y a la diferencia de los días soleados o nublados, los dos procesos se incrementaron de manera paralela. En otras palabras, la apertura estomática no permitió la pérdida de CO₂ como en los casos anteriores sino la absorción concomitante de CO₂, lo que sería coherente con un periodo de funcionamiento en modo C3. El 3 de octubre (figura 13 lado derecho), las tres hojas de la misma planta empezaron a abrir sus estomas en diferentes tiempos (primero una hoja a las 14:00, seguida de otra hoja alrededor de las 15:00, y otra después de las 16:00), y en los mismos tiempos empezaron a absorber CO₂. El día 29, dos hojas se comportaron como en un día soleado, pero una hoja presentó una dinámica estomática sorprendente, empezando la apertura estomática a las 11:00 y manteniéndola durante el resto del día. Cabe resaltar que en este caso también la absorción de CO₂ inició de manera paralela a la conductancia estomática. La concentración interna de CO₂ siguió una evolución similar a los días soleados, con concentraciones mayores, entre 600 y 700 ppm alcanzadas poco antes de la 12:00 y mantenidos al inicio de la tarde y una disminución en el resto de la tarde. Alrededor del mediodía, se presentaron, breves periodos de pérdida de CO₂, asociados con periodos de apertura estomática (alrededor de las 12:00 en una hoja el 3 de octubre, y de las 11:30 en otra hoja el 29 de septiembre), pero esta situación sólo afectó a una hoja, y los periodos de pérdida de CO₂ fueron breves.

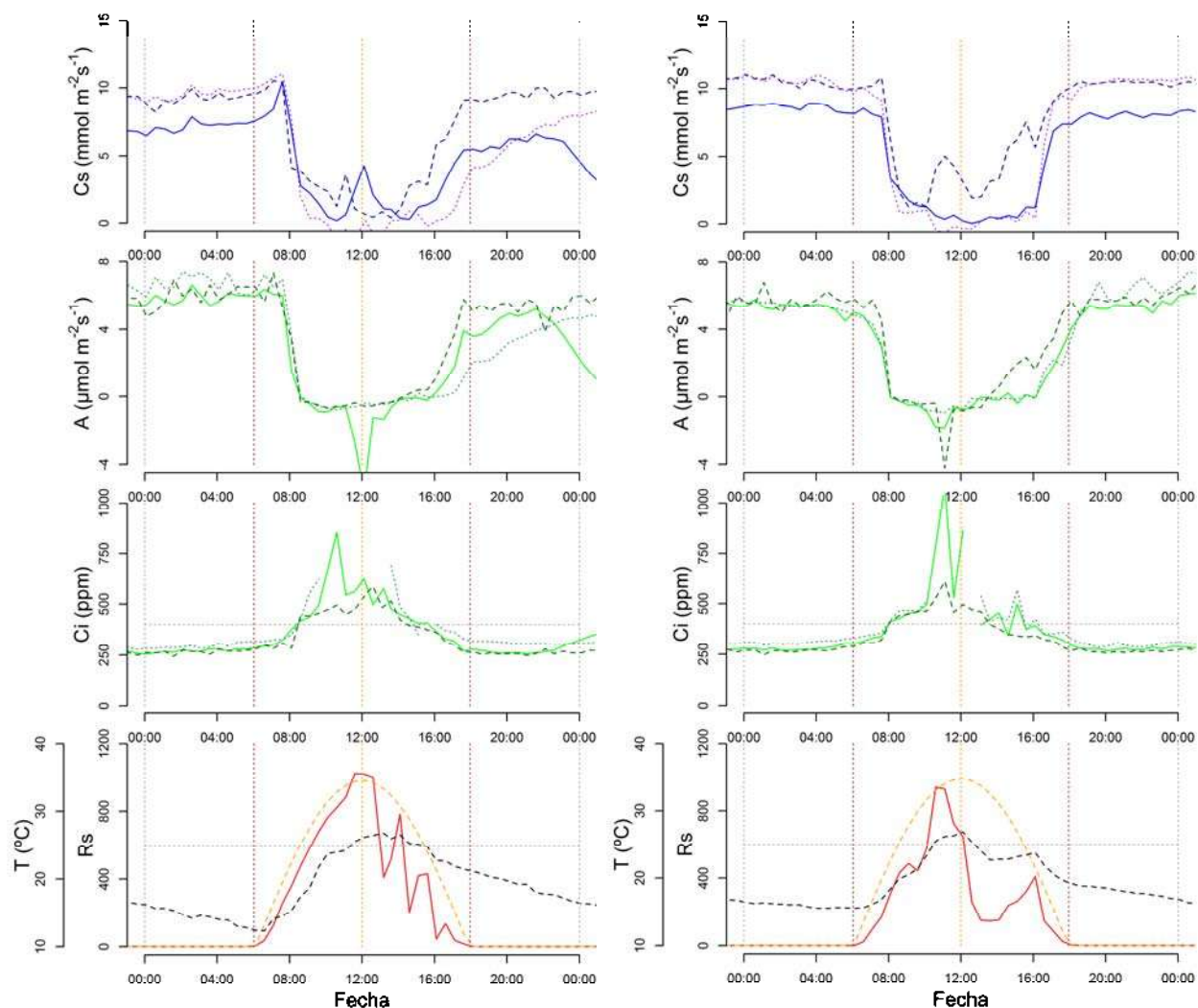


Figura 13. Dinámica de intercambio de gases durante dos días soleados en la mañana y nublados en la tarde. Conductancia estomática (Cs), asimilación (A) y concentración interna de CO₂ en la hoja (Ci), en tres hojas de una misma planta de 10 años de edad. La temperatura (T) y radiación solar (Rs). La línea punteada naranja indica la radiación solar esperada en ausencia de nubes. Las líneas verticales punteadas indican respectivamente la media noche, el medio día, y las horas de salida y puesta del sol.

Día nublado en la mañana y soleado en la tarde

Durante el experimento sólo se presentó un día nublado en la mañana y soleado en la tarde figura 14. El cierre estomático en la mañana y su apertura en la tarde sugieren una dinámica similar a la de los días nublados en la tarde. En particular, se observaron tiempos de inicio de la apertura estomática diferentes entre hojas (empezando entre las 15:30 para una hoja hasta las 19:00 para otra hoja) y un aumento progresivo hasta alcanzar la apertura completa después

de la puesta del sol. Sin embargo, a diferencia de lo observado en días nublados pero al igual que lo observado en días soleados, la dinámica de absorción de CO₂ fue idéntica en las tres hojas y no siguió la de la conductancia estomática. La concentración de CO₂ siguió la misma dinámica en todas las hojas, similar a la de los otros días observados con un pico de concentración de CO₂ entre las 10:00 y las 13:00 horas y valores aproximadamente iguales a la concentración atmosférica (400 ppm) después de las 14:00. Como durante los días nublados, la mayor concentración fue alcanzada entre las 12:00 y 14:00 horas.

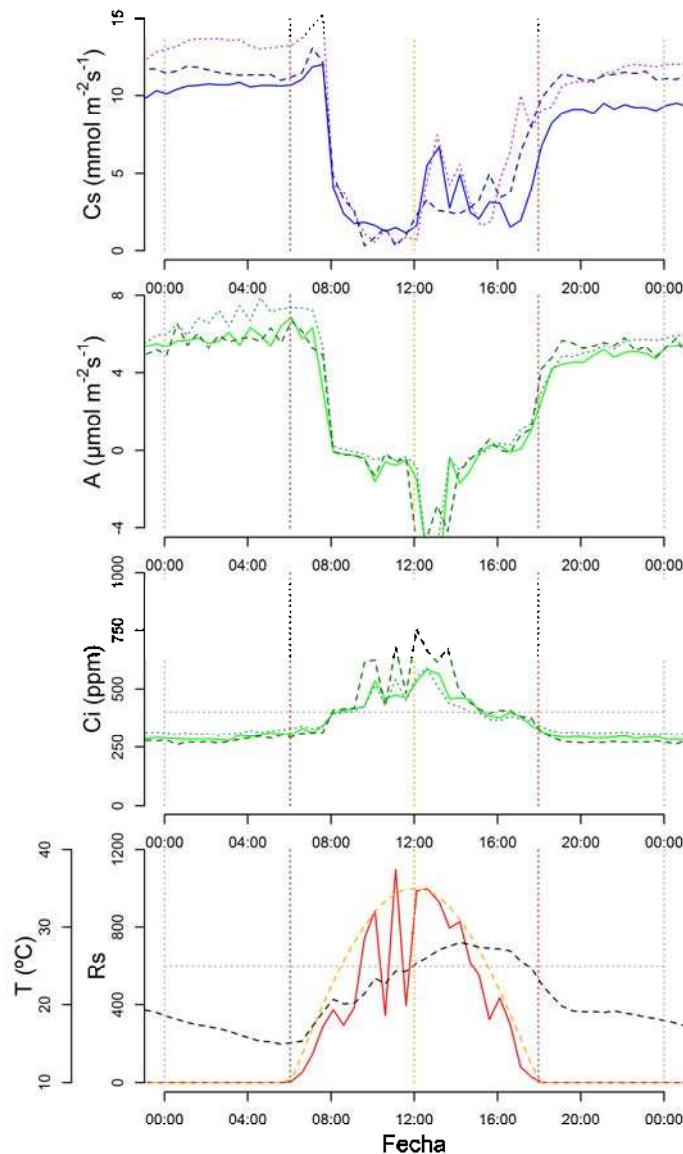


Figura 14. Dinámica de intercambio de gases durante un día nublado en la mañana y soleado en la tarde. Conductancia estomática (C_s), asimilación (A) y concentración interna de CO₂ en la hoja (C_i), en tres hojas de una misma planta de 10 años de edad. La temperatura (T) y radiación solar (R_s). La línea punteada naranja indica

la radiación solar esperada en ausencia de nubes. Las líneas verticales punteadas indican respectivamente la media noche, el medio día, y las horas de salida y puesta del sol.

2.4 Discusión y conclusiones

El cierre estomático al inicio del día siempre se observó alrededor de dos horas después de la salida del sol, y fue simultáneo entre las diferentes hojas de la misma planta. Parece relativamente independiente de las condiciones meteorológicas.

La apertura estomática de la tarde, a cambio, presentó fuertes variaciones entre días y hojas. Una explicación a esta diferencia podría ser la orientación e inclinación de las hojas, que determina a qué horas recibe la mayor radiación solar. La hoja expuesta al sureste, presentó el comportamiento más estable, con menos fluctuaciones de la hora de apertura estomática. La hoja en posición horizontal pero expuesta hacía el sur casi siempre presentó una apertura estomática más precoz que las otras hojas expuestas al norte (las otras expuestas al oeste), mientras que otra hoja presentó comportamientos diferentes según los días y estuvo expuesta al norte. La ausencia de sincronización entre hojas se observó en todos los tipos de condiciones meteorológicas estudiadas, aunque ligeramente más marcada en los días con mañanas soleadas.

La dinámica de absorción de CO_2 , aunque sigue de manera general la de la conductancia estomática, presenta diferencias. De manera general, parece que en los días con tardes soleadas todas las hojas presentan el inicio de la absorción de manera simultánea y sincronizado con el momento de la puesta del sol independientemente de la dinámica estomática. Al contrario en tardes nubladas, se observó un aumento de la absorción de CO_2 paralelo con el de la apertura estomática, y que precede de hasta 6 horas la puesta del sol. Esto sugiere que bajo condiciones nubladas, pero no soleadas, las hojas presentan una plasticidad hacia un metabolismo de tipo C_3 . Sin embargo, es difícil creer que el ciclo de Calvin sea activado en condiciones de baja radiación solar e inhibido en condiciones de alta radiación, por lo que la enzima responsable de esta fijación en la tarde podría ser también la PEPcase.

En todos los casos se observaron dinámicas similares de la concentración interna de CO_2 . Sin embargo, parece que la presencia de nubes durante la mañana retrasa la hora a la cual se observa la mayor concentración de CO_2 en la hoja. El pico de concentración de CO_2 fue entre las 10:00 y 12:00 en días nublados, y entre las 12:00 y 14:00 en días soleados. Este

comportamiento no parece depender de la radiación solar en la tarde (después de las 12:00 horas).

Por otro lado, parece existir una relación entre el momento en que la concentración interna de la hoja disminuye a bajo de la atmosférica y el inicio de la apertura estomática. En general, las hojas con la menor concentración de CO_2 son las primeras en que aumenta la conductancia estomática. También parece que la desincronización entre hojas se manifiesta en los días en que la concentración interna permaneció cercana a la atmosférica durante gran parte de la tarde. Esto sugiere que el CO_2 interno juega un papel importante en el control estomático.

Finalmente, las condiciones en que ocurre la pérdida de CO_2 debido a cortos periodos de apertura estomática durante el día parecen difíciles de identificar. Esta pérdida es observó en hojas de diferentes orientaciones, bajo diferentes condiciones de iluminación. Sin embargo, estos periodos parecen manifestarse bajo dos tipos de condiciones: sea alrededor del mediodía en condiciones de fuerte iluminación (pero no necesariamente de alta temperatura), o al final de la tarde cuando los estomas se abren de manera prematura. Por otro lado, una condición para que la apertura estomática derive en una pérdida de CO_2 es que la concentración interna en la hoja sea relativamente alta. Esta situación es posible cuando está activa la descarboxilación del ácido málico liberado de la vacuola pero la asimilación del mismo por el ciclo de Calvin es relativamente lenta. Esto nos lleva a proponer el siguiente modelo: 1) en condiciones nubladas durante la mañana, la conductancia estomática permanece baja y no permite la pérdida de CO_2 , 2) en condiciones soleadas durante la mañana, es posible que los estomas se abran durante la mañana pero debido a que la asimilación del CO_2 limita su concentración en la hoja, esta apertura no necesariamente se traduce por una pérdida de CO_2 , 3) en condiciones nubladas durante la tarde, los estomas pueden abrirse de manera anticipada, pero en general la reserva de ácido málico por descarboxilar se habrá acabado más temprano durante el día (excepto si hubo también condiciones nubladas durante la mañana que habrán frenado la descarboxilación del ácido málico), 4) En condiciones soleadas durante la tarde puede haber apertura estomática pero ésta se traducirá en pérdida de CO_2 sólo si queda ácido málico por descarboxilar (después de una mañana nublada).

Capítulo III. Respuestas del metabolismo fotosintético de *A. cupreata* a la aclimatación al sol y a la sombra y al cambio de iluminación

3.1 Introducción

A. cupreata habita de forma natural en bosques de pino-encino expuesto al sombreado de los árboles. Este sombreado, además de reducir la radiación solar total recibida, provoca fluctuaciones de la misma durante el día, conforme la sombra de los árboles se desplaza y deja a los agaves sucesivamente expuestos al sol o bajo la sombra. Es probable que esta disminución en la radiación solar afecte su metabolismo fotosintético y su regulación (tasa de descarboxilación, asimilación y regulación estomática).

En este capítulo se estudian las respuestas del metabolismo fotosintético a diferentes condiciones de iluminación, con los objetivos siguientes:

- 1) Detectar si existen diferencias de fotosíntesis (dinámica estomática y de fijación de CO₂, fluctuación día/noche de acidez titulable y fluorescencia de la clorofila) entre plantas aclimatadas al sol y a la sombra,
- 2) Caracterizar las respuestas, a plazo de unos días, del intercambio de gases a cambios de exposición a la radiación solar (cambio de sol a sombra, o de sombra a sol).
- 3) Caracterizar la respuesta del intercambio de gases a un sombreado intenso durante un día.

Nuestras hipótesis son que las plantas aclimatadas al sol tendrán mejor desempeño en su metabolismo fotosintético (mayor tasa de fijación nocturna, posterior descarboxilación, y asimilación diurna) que las que crecen sombreadas, y que cambios de iluminación en el día afectarán la dinámica estomática y la fijación de CO₂ durante la noche siguiente (reduciéndola en caso de un cambio de sol a sombra e incrementándola en caso de un cambio de sombra a sol).

3.2 Material y métodos

Material vegetal. En este experimento, se utilizaron 24 plantas, 12 aclimatadas al sol y 12 a la sombra antes y durante el experimento, como se indicó en material y métodos del capítulo I experimento tres.

Tratamientos

1. Plantas aclimatadas al sol y a la sombra durante un mes.
2. Plantas aclimatadas al sol y a la sombra pero con un periodo de estrés hídrico y doble malla sombra durante un día.

Una vez terminadas las mediciones previstas en el cuarto experimento, se aprovechó el hecho que los MACsuinos seguían funcionando para estudiar el efecto de un sombreo casi total sobre el ciclo de intercambio de gases. A los 14 días de mediciones de intercambio de gases durante el amanecer, se sombrearon dos plantas (una de sombra y una de sol) con una triple malla sombra de color negro. La malla se retiró el 18 de marzo al amanecer y siguieron las mediciones de intercambio de gases durante el día y la noche siguientes.

Mediciones

Intercambio de gases. En este experimento se utilizaron dos sistemas de medición de intercambio de gases: el MACsuino y el LI-COR 6400. Las mediciones de intercambio de gases con los MACsuinos se realizaron como se describió en materiales y métodos del capítulo I, tercer experimento. Las mediciones con LI-COR 6400 se realizaron durante un día (a los 15 días de iniciar el experimento). Durante el día se cortaron al azar hojas completas de plantas aclimatadas al sol y a la sombra. Cada 25 minutos aproximadamente se cortó una hoja y se midió el intercambio de gases, en estas mismas hojas se midió la fluorescencia de la clorofila y la acidez titulable.



Figura 15. Medición de intercambio de gases en hojas de *A.cupreata* aclimatadas a la sombra y al sol, en el tercer experimento.

Fluorescencia de las clorofilas

En las hojas que se midió durante un día el intercambio de gases se midió su fluorescencia bajo luz saturante, y la curva de respuesta a la luz de la fluorescencia. Esto se realizó utilizando un LI-COR equipado con el accesorio de medición de fluorescencia, instalado en un local adyacente al experimento. Las mediciones se hicieron inmediatamente después de cortar la hoja, según el protocolo siguiente. Al momento de cosechar la hoja, se midió su temperatura con un termómetro de infrarrojo (MASTERGRIP) y la hoja cortada fue colocada inmediatamente en la pinza. El control de temperatura de la cámara de la pinza se ajustó a una temperatura cercana a la de la hoja cosechada y durante 5 minutos, se dejó la hoja en la pinza para que se estabilizara a estas condiciones de temperatura y a una radiación saturante ($1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PAR). Al final de esta fase, se midió el intercambio de gases y se realizó la curva de respuesta a la radiación: se establecieron sucesivamente niveles de 1600, 800, 200 y $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PAR durante periodos de 150 segundos por nivel y al final de cada periodo se tomaron lecturas de F_s' , F_o' , F_m' al mismo tiempo que se midió el intercambio de gases. Una vez terminadas las mediciones, se guardó la hoja 25 minutos en la oscuridad (en una caja de cartón colocada en un cajón): después de este tiempo, se volvió a colocar la hoja en la pinza con la fuente de radiación apagada y se midieron los valores de F_o y F_m .

Medición de acidez titulable

La acidez titulable fue medida por titulación con una solución de NaOH a 0.05 N (obtenida diluyendo 2 g de NaOH en un litro de agua destilada). Las hojas fueron descongeladas a temperatura ambiente, se les retiró la humedad de condensación con papel absorbente, se tomó una fracción de la hoja la cual fue pesada (aproximadamente 2 gr de hoja), se agregó la misma cantidad de agua destilada, se maceró, se midió el pH y conductividad al inicio y al final de la titulación con un potenciómetro (Fisher Scientific, accument Research AR20), la solución fue agitada con un agitador magnético (Fisher Scientific) al mismo tiempo se fue agregando la solución de NaOH hasta obtener un pH de 7 y 8.1. La acidez titulable se expresó en unidades de equivalentes de iones hidrógeno (H^+) por kg de peso fresco, por área o por volumen de agua de los tejidos (Medina *et al.*, 1989). Este procedimiento se repitió en todas las muestras (Lobit *et al.*, 2002). Para calcular la acidez titulable (en meq kg^{-1}) se empleó la siguiente formula:

$$AT = \frac{0.001 \times \text{mL NaOH} \times 0.05}{0.001 \times \text{gr de muestra}} \times 1000$$

Mediciones climatológicas

Las mediciones climatológicas se realizaron como se indicó en material y métodos del capítulo I.

3.3 Resultados

Intercambio de gases: En este experimento, la planta con el MACsuino P1 tuvo un comportamiento atípico. Aparte de esta excepción, las otras tres plantas estudiadas presentaron una dinámica CAM típica, con un cierre y una apertura de los estomas rápidos y muy marcados y prácticamente ninguna pérdida de CO₂ durante el día (excepto por un breve momento el 19 de noviembre en la planta de sol con el MACsuino P4). La conductancia estomática máxima medida en la noche fue inferior en las plantas de sombra (alrededor de 3 y 4 mmol m⁻² s⁻¹ para las plantas con los MACsuinos P3 y P5 respectivamente) que en las de sol (alrededor de 3.5 y 5 mmol m⁻² s⁻¹ para las plantas con MACsuinos P1 y P4 respectivamente). Sin embargo, los valores de asimilación fueron muy similares entre tratamientos, con valores alrededor de 4.5 μmol m⁻² s⁻¹ excepto en la planta con el MACsuino P4 (de sombra) que mantuvo valores de conductancia estomática como de asimilación bajos. Se observan unas excepciones a este patrón general figura 16. Por un lado, en la planta con el MACsuino P4 (de sol), se presentó un cambio en el ciclo estomático a partir del 23 de noviembre, con una apertura nocturna más progresiva y retrasada, y también un cierre más progresivo en la mañana. Este cambio es difícil de explicar, ya que no corresponde a cambios en las condiciones meteorológicas ni a cambios en la exposición al sol, y no se observó en las otras plantas. Por otro lado, en las noche del 19 al 20 de noviembre, las tres plantas con los MACsuinos P3, P4 y P5) presentaron una disminución progresiva de la conductancia estomática en la noche, llegando a una conductancia estomática casi nula al final de la noche en las dos plantas de sombra con los MACsuinos P3 y P5. Este comportamiento se observó también, pero fue menos marcado en la planta de sol con el MACsuino P4, en la que la conductancia estomática se redujo sólo alrededor de un tercio. El mismo comportamiento se repitió en las noches del 25 al 26 y del 26 al 27 de noviembre en la planta con el MACsuino P5 (sombra), y en menor medida en la planta con el MACsuino P4 (sol). Todos los casos en que

se observó esta disminución nocturna correspondieron a noches cálidas, con temperaturas que quedaron arriba de 17 °C.

Diferencias fotosintéticas en plantas aclimatadas al sol y a la sombra.

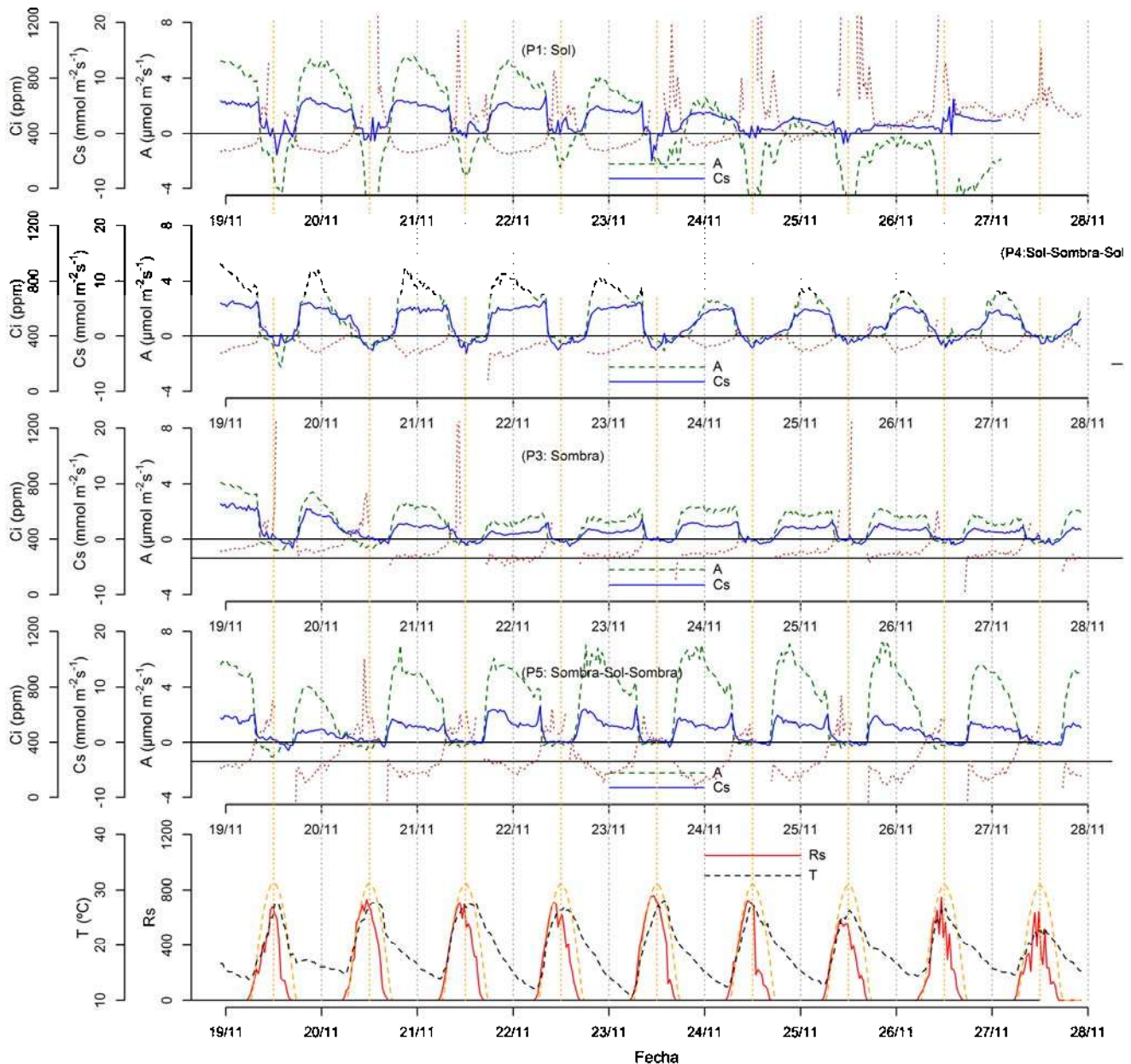


Figura 16. Dinámica del ciclo de intercambio de gases durante los primeros 9 días antes del cambio de condiciones de iluminación en plantas de *A. cupreata* aclimatadas al sol y a la sombra. Se muestran la conductancia estomática y tasa de asimilación en 4 plantas, dos expuestas al sol con los MACsuinos P1 y P4 y dos aclimatadas a la sombra con los MACsuinos P3 y P5. La última gráfica muestra la evolución de la temperatura

y de la radiación solar durante los días correspondientes. La curva naranja punteada muestra la radiación esperada en condiciones de cielo despejado, lo que permite, por diferencia con la curva de radiación (roja), detectar la presencia de nubes.

Integración de la fase diurna: Intercambio de gases, dinámica de la acidez titulable y la fluorescencia de la clorofila. Los intercambios de gases medidos por el LI-COR bajo luz saturante (figura 17) y la dinámica de degradación de acidez titulable (figura 19), sugieren unas diferencias muy ligeras entre plantas de sol y sombra. En ambos casos, la conductancia estomática y la asimilación presentaron el patrón esperado, con una conductancia estomática nula durante el día y un ligero aumento en la tarde. Sin embargo, en las plantas aclimatadas a la sombra, se observaron incrementos de la conductancia estomática en dos momentos, uno en la mañana alrededor de las 9:00 y otro en la tarde alrededor de las 14:00. Estos picos correspondieron con momentos de pérdida de CO₂. En cuanto a la concentración interna de CO₂, las hojas aclimatadas al sol presentaron una concentración máxima de 3800 ppm alrededor de las 10:30 horas, mientras que en las aclimatadas a la sombra la concentración máxima fue menor (2800 ppm) y se alcanzó más tarde, alrededor del mediodía. También, la concentración de CO₂ fue mayor durante el inicio de la mañana (antes de las 8:00) en las plantas de sombra. El hecho que la concentración máxima es menor y se alcanza más tarde en el día en las plantas de sombra podría explicarse por una descarboxilación más lenta, que terminaría más tarde que en las plantas de sol. Aunque la cantidad de datos es insuficiente para concluir, la evolución de la acidez titulable parece coherente con esta hipótesis, con una pendiente ligeramente menor de la disminución de acidez titulable y el hecho que la concentración mínima se alcanzó unas horas más tarde en las plantas de sombra figura 17.

La eficiencia del fotosistema II (Φ_{PSII}) fue ligeramente más alta en las plantas de sombra, y el quenching no fotoquímico (NPQ) ligeramente más bajo, pero no hubo diferencias en el quenching fotoquímico (qP) (figura 18). Tampoco se observó una relación entre la dinámica de las variables de fluorescencia y la del CO₂ en la hoja (como se había observado en Salinas Estrada *et al.*, 2014).

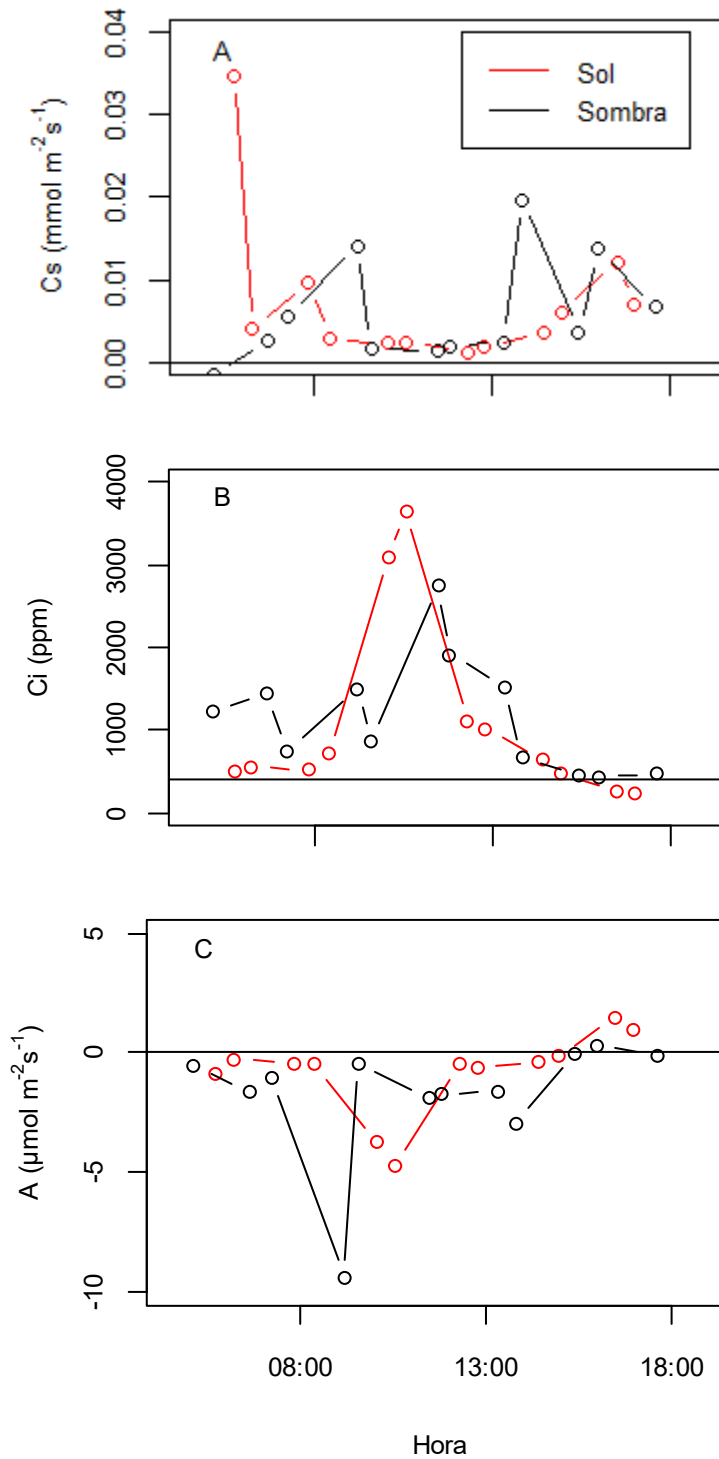


Figura 17. Dinámica diurna de intercambio de gases en hojas de *A. cupreata*, en hojas aclimatadas al sol y a la sombra durante un mes. Conductancia estomática (C_s) A, concentración interna de CO_2 en la hoja (C_i), B y asimilación (A). Las mediciones se realizaron con IRGA LI-COR 6400.

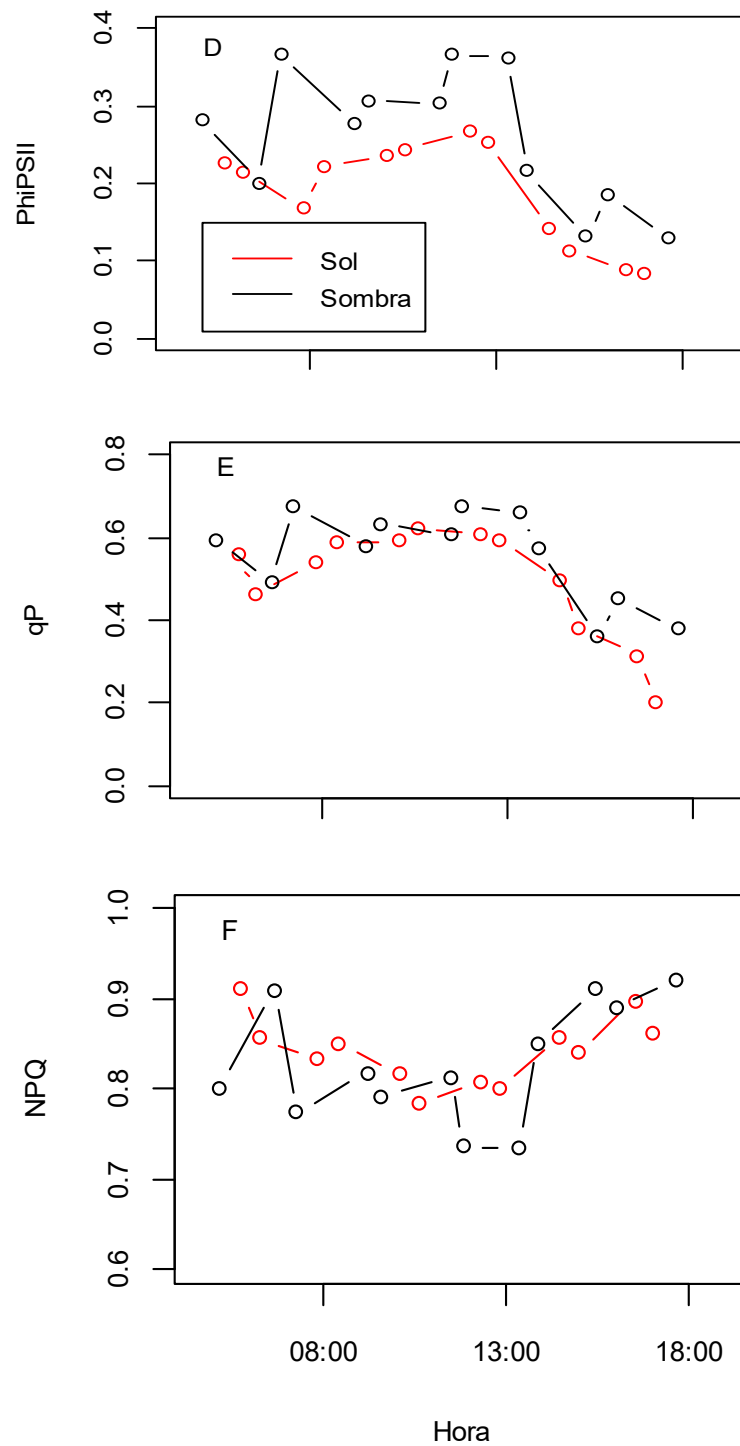


Figura 18. Índices de fluorescencia medidos durante el día en hojas de *A.cupreata* aclimatadas al sol y a la sombra con un PAR de 800. Las hojas medidas en ambas condiciones de aclimatación no sufrieron cambio de iluminación. A. Eficiencia cuántica del fotosistema II, B, Quenching fotoquímico y C. Quenching no fotoquímico.

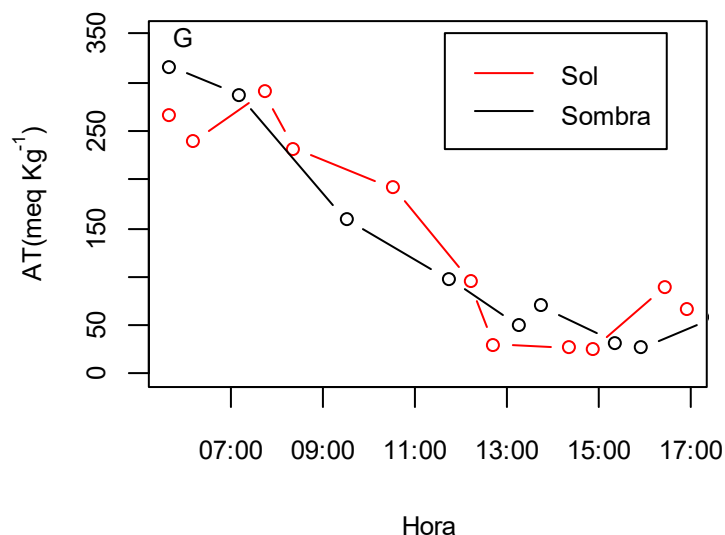


Figura 19. Dinámica diaria de acidez titulable en hojas de *A. cupreata*, en hojas aclimatadas al sol y a la sombra durante un mes.

Respuestas al cambio de iluminación

En la planta con el MACsuino H4, que pasó a la sombra del 28 al 1 de diciembre, se observó desde el primer día una alteración marcada del ciclo CAM (figura 20). El periodo de apertura estomática se redujo, empezando más progresivamente y más tarde: mientras que antes del sombreado la apertura estomática iniciaba alrededor de las 18:00, después del sombreado se retrasó prácticamente hasta la medianoche, con una conductancia al inicio de la noche prácticamente nula los días 29 y 30 de noviembre, y muy pequeña los días 1 y 2 de diciembre (figura 20).

La fijación de CO₂ siguió el mismo patrón, con una curva prácticamente paralela a la de conductancia estomática. A pesar de que se alteraron los periodos de la fase nocturna, los valores máximos de conductancia y asimilación se mantuvieron prácticamente idénticos a lo que eran antes del sombreado. Después de regresar la planta al sol, el inicio de la fase nocturna se mantuvo retrasado durante los dos días observados, aunque parece que se volvió a adelantar otra vez su inicio (figura 20).

En la planta con el MACsuino P5, que pasó de la sombra al sol, no se observó ningún cambio de la dinámica estomática. En contraste, la fijación de CO₂ fue fuertemente deprimida

el día después del cambio, para recuperarse en los días siguientes. También, en dos de los cuatro días en que estuvo expuesta al sol, se observaron periodos de apertura estomática y pérdida de CO₂ que no se observaban mientras estaba en la sombra (figura 20).

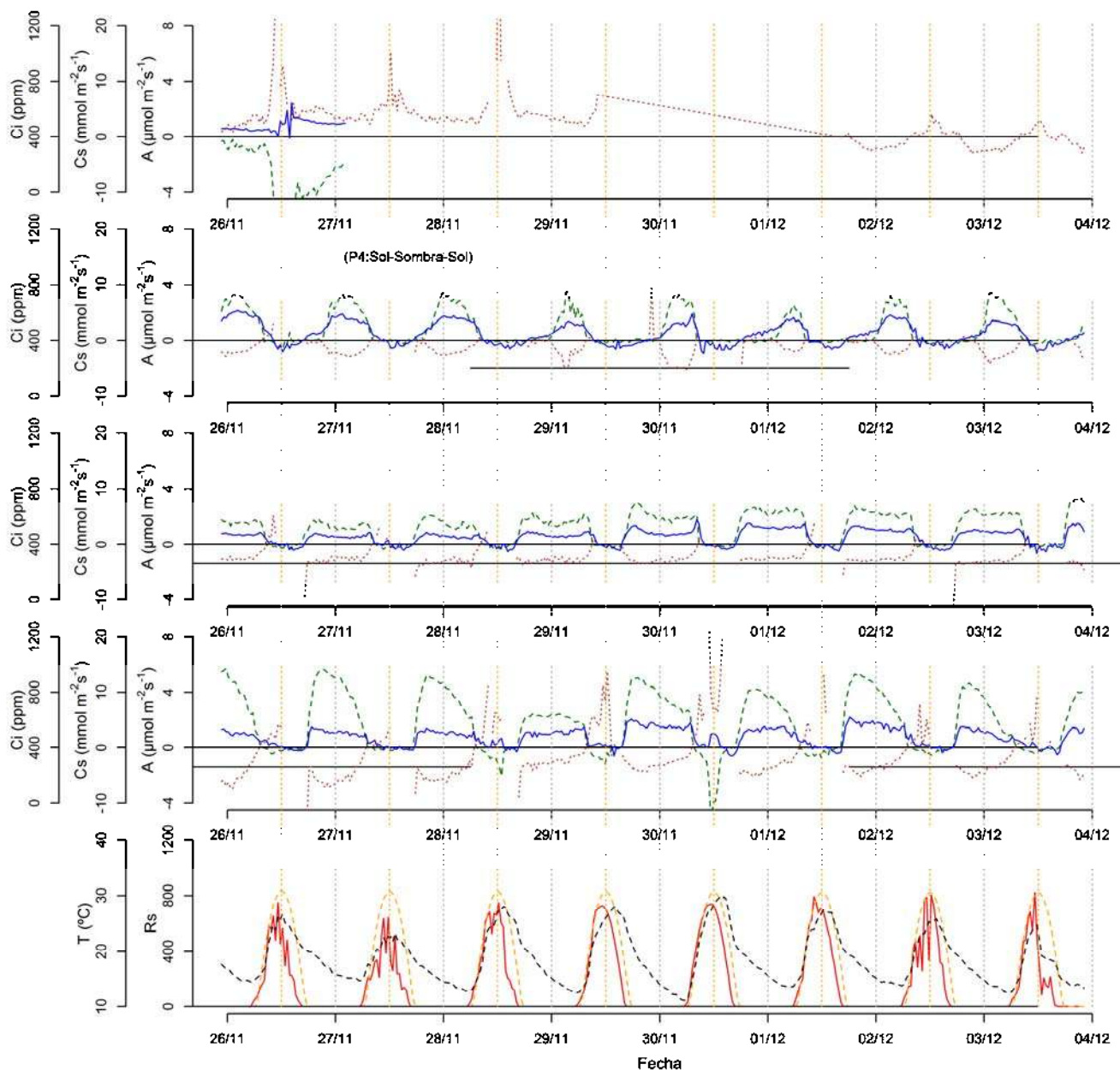


Figura 20. Dinámica de intercambio de gases y condiciones climatológicas (19 noviembre - 5 diciembre): A, B, C y D, dinámica de conductancia estomática, asimilación de CO₂ y concentración interna de CO₂ en la hoja. E condiciones meteorológicas. En hojas de plantas de 5 años de edad aclimatadas durante un mes con a la exposición directa al sol y a la sombra. Medidas con los MACsuinos en estas dos condiciones de sol y sombra. La línea punteada indica el tiempo en el que las plantas estuvieron bajo sombra.

Tratamiento de doble sombreado

Los datos que se presentan en la figura 21 fueron tomados del cuarto experimento, correspondientes a los tres últimos días de mediciones de intercambios de gases en la planta de sol con los MACsuinos P5 y P3 en la de sombra.

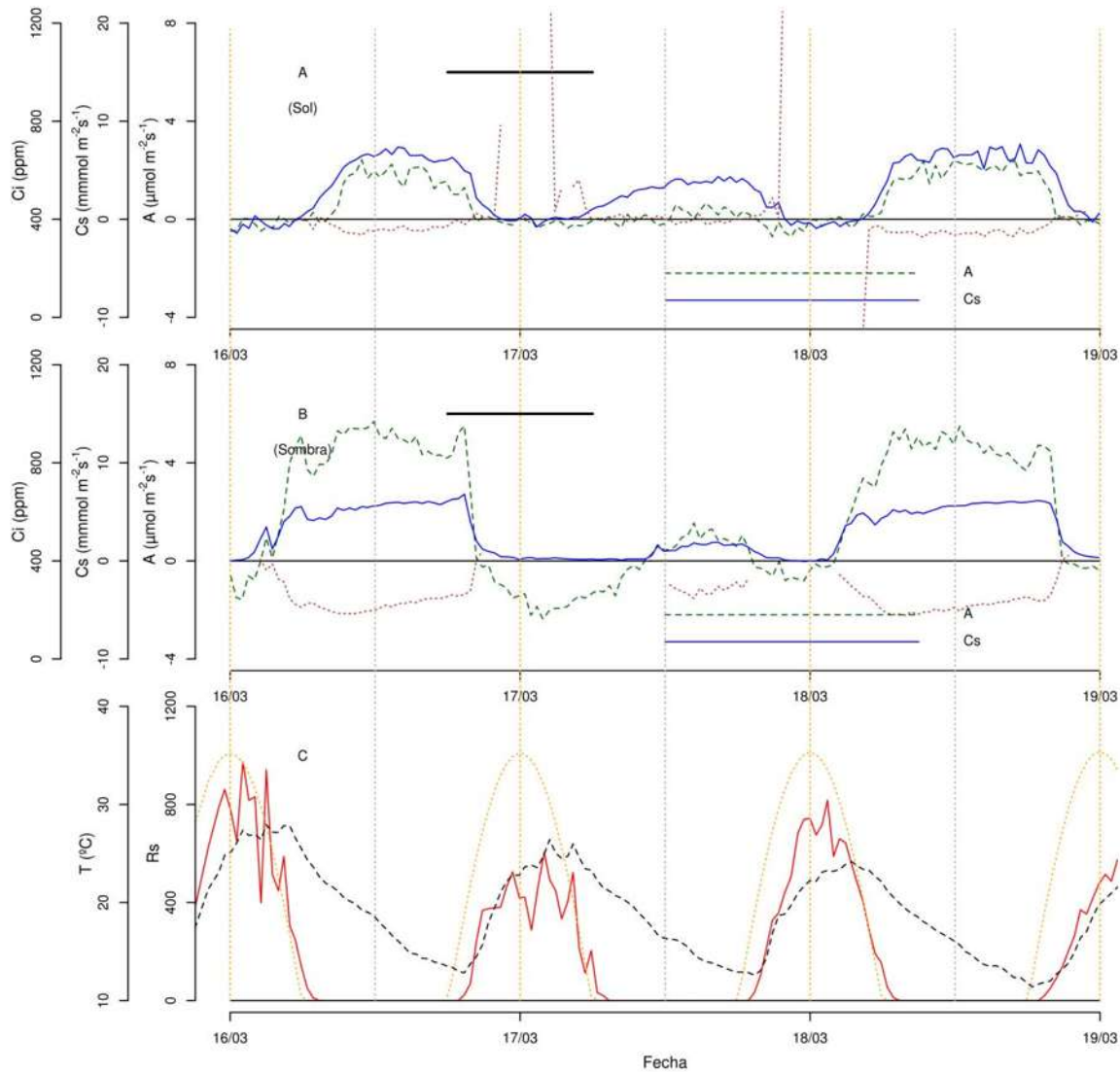


Figura 21. Intercambio de gases con doble sombreado durante tres noches y dos días en plantas aclimatadas al sol (A) o a la sombra (B), después de 9 días de recuperación de un estrés hídrico. El segundo día del experimento (17 de marzo), se aplicó un sombreado total (extendiendo un doble espesor adicional de malla sombra sobre la planta) a las dos plantas. La figura C muestra la radiación solar y temperatura observadas durante este experimento. La línea naranja punteada indica la radiación solar esperada en un día despejado, de tal forma que la diferencia entre la curva naranja y roja indica la nubosidad.

Durante el periodo de sombreo (de la salida a la puesta del sol del día 17 de marzo), no se observaron respuestas notables en cuanto a conductancia estomática: en ambas plantas, la conductancia estomática fue casi nula durante el día figura 21. En cuanto a la planta aclimatada al sol, no se observó pérdida de CO₂ durante el día, pero sí concentraciones altas de CO₂ en la hoja (en las mediciones en que la conductancia estomática fue bastante alta para poder medirlas), incluso con un pico de concentración justo antes de la puesta del sol. En la planta de sombra hubo pérdida de CO₂ durante todo el día y (lo que no se observó en otros experimentos) esta pérdida persistió casi hasta la medianoche figura 21. Estos resultados sugieren que hubo descarboxilación durante el día, pero bastante lenta para seguir hasta la noche, mientras que las altas concentraciones de CO₂ en la hoja en un caso, la pérdida de CO₂ en el otro, indican que no todo el CO₂ producido por la descarboxilación fue asimilado.

Durante la noche siguiente, la dinámica estomática fue diferente entre las dos plantas. En la planta aclimatada al sol, la conductancia estomática aumentó lentamente a partir de la puesta del sol, para alcanzar un valor de la mitad del día anterior ($4 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) después de la medianoche (figura 21). En la planta aclimatada a la sombra, la conductancia estomática se quedó en un nivel muy bajo (menos de $1 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), y sobre todo, no se abrieron los estomas hasta casi la medianoche. Esta diferencia podría deberse a diferentes causas: 1) diferencias en la regulación en función de la aclimatación, 2) el hecho que la planta bajo el sol recibió, a pesar de la malla sombra, un nivel de radiación solar muy bajo pero todavía ligeramente mayor a la de sombra, 3) una descarboxilación muy lenta, pero existente, en la planta bajo sombra.

En cuanto a la absorción nocturna, fue prácticamente nula en ambas plantas (figura 21). La ausencia de fijación de CO₂ en las plantas sombreadas durante la noche ya había sido demostrada en un experimento anterior (verano de la ciencia 2010, sin publicar). En este trabajo se había observado que en condiciones de sombreo total tampoco disminuía la acidez titulable durante el día, indicando que la exposición a cierto nivel de radiación era indispensable para la salida del ácido málico de la vacuola y posterior descarboxilación. En este experimento, se encontraron probablemente las mismas condiciones: al quedarse almacenado en la vacuola el ácido málico, no se pudo acumular más durante la noche siguiente. Cabe mencionar finalmente que durante la noche que siguió al día en el que se les retiró la malla sombra las plantas retomaron su ciclo normal de intercambio de gases, lo que indica que el efecto del

sombreo sólo fue temporal.

3.4 Discusión

Al inicio del experimento, las plantas aclimatadas al sol presentaron una conductancia estomática mayor pero una tasa de asimilación similar a las de sombra. Desafortunadamente, este comportamiento no pudo ser confirmado después de unos días ya que se pudrió una de las dos hojas estudiadas (P1). Además, con sólo dos porómetros por tratamiento, los resultados son poco significativos, sobretodo porque las dos plantas de sombra presentaron dinámicas de intercambio de gases diferentes entre sí, siendo una muy similar a las plantas de sol mientras que la otra presentaba conductancia estomática y asimilación baja. Las mediciones de acidez titulable, e intercambio de gases y fluorescencia realizados con el IRGA LI-COR 6400 no aportaron información muy contundente, por el pequeño número de mediciones que se pudieron realizar (una cada 25 minutos, permitiendo sólo 12 mediciones por tratamiento en el transcurso del día). Ni la acidez titulable al final de la noche, ni la residual al final del día difieren entre tratamientos: el sombreado no parece haber afectado la cantidad de CO₂ fijado en la noche, ni la cantidad descarboxilada durante el día. Sin embargo, parece que la dinámica sí cambió, con una degradación más lenta, y que termina más tarde, de la acidez titulable en las plantas bajo sombra. Esto sugiere una descarboxilación más lenta en estas plantas, coherente con menores concentraciones de CO₂ en la hoja y un pico de concentración desplazado en la tarde.

Finalmente, los datos de fotosíntesis muestran, a iluminación comparable, una eficiencia del fotosistema II ligeramente mayor y una reducción del quenching no fotoquímico en las plantas aclimatadas a la sombra, pero un quenching fotoquímico similar. Esto parece indicar que las plantas aclimatadas a la sombra compensaron la menor radiación disponible por una mayor cantidad de clorofila y/o una disminución de la disipación no fotoquímica para lograr la misma producción de energía química que las plantas de sol.

Al cambiar el nivel de iluminación, se observaron respuestas en la dinámica de intercambio de gases. Cuando la planta aclimatada a la sombra pasó a la exposición directa al sol, se observaron pérdidas de CO₂ por periodos cortos alrededor del medio día el primer y tercer día después del cambio, mientras que ninguna de las plantas sombreadas presentó este

comportamiento. Esto sugiere que la exposición al sol estimuló la liberación y descarboxilación de los ácidos orgánicos contenidos en la vacuola en mayor proporción que la asimilación del CO₂, llevando a un desbalance entre producción y asimilación y una pérdida de la diferencia a la atmósfera. También, durante la noche que siguió el cambio de exposición se redujo la absorción de CO₂, para después recuperarse en las noches siguientes. Sin embargo, se desconoce el mecanismo responsable esta reducción. Cuando se pasó a la sombra la planta aclimatada al sol, el principal efecto fue de atrasar tanto la apertura estomática nocturna como la fijación de CO₂ prácticamente hasta la medianoche, reduciendo la duración del ciclo de fijación de más de 12 horas a menos de 6 horas. Esta observación parece contradictoria con las del segundo experimento, en el que se observó que la apertura estomática se adelantaba durante días de baja radiación solar: bajo sombreado artificial, se observó el efecto contrario. Esta contradicción se podría explicar si suponemos que la apertura estomática está controlada por la concentración de CO₂ en la hoja: al reducir la tasa de descarboxilación durante el día, el sombreado podría atrasar la fase de descarboxilación de tal manera que seguiría en la noche, manteniendo una concentración más alta de CO₂ que en la atmósfera que podría inhibir la apertura estomática.

3.5 Conclusiones

- La aclimatación a la sombra provocó un aumento de la eficiencia fotosintética que permite compensar, por lo menos en parte, la reducción de radiación solar.
- La fijación nocturna de CO₂ y acumulación de ácido málico sólo se ve afectada muy poco, o nada, en plantas aclimatadas a la sombra.
- La dinámica de intercambio de gases y la de descarboxilación del ácido málico son prácticamente idénticas en plantas aclimatadas a la sombra que en las expuestas al sol. Sin embargo hay una tendencia a que la tasa de descarboxilación del ácido málico sea menor, la concentración de CO₂ en la hoja también, y que como consecuencia el período de mayor concentración de CO₂ en la hoja se atrase hasta la tarde.
- Un aumento de radiación solar durante el cambio de condiciones de exposición provocó una pérdida diurna de CO₂.
- Una disminución de radiación provocó un atraso del inicio de la fijación nocturna.

Capítulo IV. Respuestas al estrés hídrico y a la rehidratación en *A. cupreata*.

4.1 Introducción

Las plantas con el metabolismo ácido de las crasuláceas, presentan una menor tasa fotosintética respecto a las C3 y C4, esto les confiere un lento crecimiento, lo cual puede ser benéfico, en condiciones de baja disponibilidad de recursos (por ejemplo ante déficit hídrico). Además de la capacidad de almacenamiento de recursos (almacenamiento de agua en las suculentas). Estas características les confiere una mejor resistencia al estrés hídrico (Chapin, 1991). Aunado a todo esto el poseer el metabolismo CAM les permite minimizar la pérdida de agua durante el día gracias a la separación temporal entre la fijación y la asimilación del CO₂ (Taiz y Zeiger, 2002). Este mecanismo les permite vivir en ambientes con climas más extremos y con poca disponibilidad de agua (Nobel, 1988). En el caso de *A. cupreata* el clima en su hábitat no es árido, pero sí está marcado por una temporada de lluvias y una temporada de sequía.

Nuestra experiencia en campo indica que, aunque en general las plantas adultas rara vez muestran síntomas de deshidratación (probablemente porque pueden almacenar un volumen importante de agua en sus hojas y piña y extraer agua del suelo gracias a algunas raíces profundas), las plantas más jóvenes o pequeñas sí presentan síntomas de estrés al final de la temporada seca, con hojas rojizas, delgadas y hasta arrugadas. No está claro hasta qué nivel de deshidratación pueden aguantar estas plantas, ni si la deshidratación provoca daños irreversibles que pudieran impedir su reactivación con el inicio de las lluvias.

Y en la actualidad han sido pocos los estudios sobre las respuestas de los agaves al estrés hídrico, y todos coinciden en que hay una disminución en la tasa de fijación de CO₂, cierre estomático, detienen su crecimiento y disminuye su productividad (Nobel, 1985; Yordanov 2003; Ramirez-Tobias *et al.*, 2014). Por ejemplo en *A. fourcroydes* con plantas de un año y medio de edad, al ser estresadas durante 30 días por falta de riego la fijación de CO₂ decreció 99% en un período de 24h, con una temperatura nocturna de 20 y 30 °C de día (Nobel, 1985).

Otro estudio realizado en 12 especies de agave (*A. lechuguilla*, *A. striata*, *A. americana* variedad *marginata*, *A. angustifolia* subespecie *tequilana*, *A. asperima*, *A. duranguensis*, *A. salmiana* y *A. cupreata*) se evaluó el efecto de dos potenciales de agua (Ψ) en el sustrato (-0.7

y -3.5) Mpa durante 14 meses en invernadero sobre el crecimiento, la distribución de la biomasa, el grosor foliar y el contenido de prolina. Y se encontró que en la mayoría de las especies el menor potencia (Ψ) de agua en el sustrato promovió una mayor asignación de biomasa a la raíz, mientras que en *A. cupreata* el resultado fue contrastante ya que la mayor acumulación de biomasa en la raíz fue con el menor riego (-0.7 Mpa y viceversa la mayor acumulación de biomasa en las hojas fue con el riego reducido (0.7 Mpa) que con el riego frecuente (3.5 Mpa) (Ramirez-Tobias *et al.*, 2014).

En otras plantas (no agaves) ha sido más estudiado el efecto del déficit hídrico, y del estrés hídrico severo en el metabolismo fotosintético. Por ejemplo Yordanov en 2003 hace una revisión bibliográfica sobre las respuestas de las plantas a la sequía y la tolerancia al estrés donde destacan que la sequía leve induce a las plantas a regular la pérdida y captación de agua permitiendo mantener el contenido de agua foliar dentro de sus límites, donde la capacidad fotosintética y el rendimiento cuántico del fotosistema dos no se vean afectados. En cambio cuando la sequía es severa si se observan cambios desfavorables como la inhibición de la fotosíntesis y el crecimiento. Otros mecanismos que resultan afectados son el cierre estomático, la reducción en la tasa de asimilación. Se activa la acumulación de ácido abscísico (ABA), prolina, manitol, sorbitol y la formación de radicales libres.

Por otro lado Prakash and Rao (1996) al estudiar la deshidratación de las hojas en dos plantas de maíz encontraron que la inhibición de la fotosíntesis se debió no solo al cierre estomático sino también a la disminución de las actividades de las enzimas anhidrasa carbónica, fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y de la Rubisco.

Otros factores a considerar son la adaptación de los cloroplastos a condiciones de alta radiación, la regulación del fotosistema 2 que sirve como fotoprotector al aumentar los niveles de disipación de la energía (NPQ) que disminuyen el rendimiento cuántico del fotosistema 2, ayudan a protegerlo de la excitación excesiva y daño (Shindler y Lichtenthaler, 1996). Otro mecanismo que también ayuda en la disipación y la absorción de la energía de la luz es el ciclo de las Xantofilas. Yordanov (2003) y Tambussi *et al.*, 2002 encontraron un incremento en el contenido de zeaxantina y antheraxantina bajo condiciones de estrés hídrico.

En plantas CAM Bastide *et al.*, en 1993 estudio el efecto del estrés hídrico severo en

Xerosicyos danguyi, con un máximo de 54 días sin riego y posterior rehidratación, y un control con riego todo el tiempo. Y encontró que después de 54 días sin riego las plantas no mostraron fijación de CO₂ y la acidez titulable disminuyó hasta 10 µeq. En cambio los niveles de ABA aumentaron cerca del 75%. Bastide demostró que cuando la planta creció en buenas condiciones de agua presentó un metabolismo CAM típico, pero cuando fue estresada por la falta de riego cambió a la forma CAM-idling o también llamada CAM-fútil, en la cual los estomas son cerrados de día y de noche, pero con pequeñas fluctuaciones de ácidos orgánicos durante el día. En estas condiciones cesan la captación de CO₂ durante todo o la mayor parte del ciclo diario, en este estado las plantas CAM para su supervivencia captan y por ende reciclan todo o gran parte del CO₂ liberado durante la respiración (Herrera, 2009). Y cuando comenzó el riego recuperaron su metabolismo CAM.

Como se puede observar las respuestas de las plantas al estrés hídrico pueden ser muchas y en este capítulo se pretende conocer algunas de ellas en *A.cupreata* para lo cual nos planteamos las preguntas siguientes:

1) En qué medida se reduce el intercambio de gases durante la deshidratación: ¿Se mantendrá el ciclo de apertura estomática y fijación nocturna de CO₂?, ¿Lograrán las plantas deshidratadas cerrar sus estomas completamente durante el día, o presentarán los mismos periodos de apertura estomática durante el día?. Si se detiene la fijación nocturna de CO₂, ¿Se detendrá también la acumulación de acidez titulable?, ¿Cuáles serán las consecuencias sobre la fotosíntesis durante el día siguiente?.

2) ¿Cuál será la respuesta a la rehidratación de las plantas: ¿Se recuperará un ciclo CAM normal después de la rehidratación?, ¿Qué tan rápido se recuperará?.

3) ¿Habrá diferencias en estas respuestas entre las plantas expuestas al sol y las sombreadas?.

Con el objetivo de caracterizar estas respuestas, se siguieron plantas que estaban en estado de deshidratación al inicio del experimento, antes y después de recibir riegos y lluvias por dos días. Se midió:

-1) El intercambio de gases, con 4 MACsuinos (dos colocados en dos hojas de plantas aclimatadas al sol y dos a la sombra).

- 2) El intercambio de gases durante el día y la fluorescencia de las clorofilas durante la

fase diurna del ciclo CAM, utilizando el sistema IRGA LI-COR 6400 durante dos períodos: un día antes de la rehidratación (8 de marzo) y 6 días después (15 de marzo).

- 3) La evolución de la acidez titulable durante el día, en estos mismos períodos (8 de marzo y 15 de marzo).

Según nuestra hipótesis de trabajo, se espera que la adaptación a un déficit hídrico se traduzca por una menor apertura estomática tanto diurna como nocturna. Como consecuencia, se espera una reducción de la fijación nocturna de CO₂, pero también de las pérdidas de CO₂ durante el día. Sobre las respuestas a la rehidratación: Se espera que recuperen sus actividades fotosintéticas (conductancia estomática, absorción de CO₂, acumulación y degradación de ácidos orgánicos etc.). También se espera que las plantas aclimatadas a la sombra recuperen más rápido sus actividades fotosintéticas que las plantas aclimatadas al sol.

4.2 Material y métodos

Material vegetal y tratamientos: Se utilizaron las mismas 24 plantas que en el tercer experimento, las cuales se mantuvieron en las mismas condiciones (12 aclimatadas al sol y 12 a la sombra) hasta el inicio del experimento, el 3 de marzo. Durante este período, ninguna de estas plantas recibió riego alguno y no llovió. El 7 de marzo en la noche, se regaron la mitad de las plantas (6 plantas bajo sol y 6 bajo sombra). Sin embargo, a partir de la tarde del 8 de marzo y hasta la tarde del 9 de marzo, el paso de un ciclón causó lluvia ligera pero continua, por lo que todas las plantas acabaron perfectamente rehidratadas, el día 15 de marzo también recibieron riego asistido.

Mediciones de intercambio de gases: Las mediciones de intercambio de gases se realizaron después de tres meses de no recibir riego las plantas aclimatadas a la sombra y al sol, como se indicó en el experimento cuatro del capítulo I.

Acidez titulable y fluorescencia de las clorofilas durante el día: Cinco días después del inicio de las mediciones de intercambio de gases con los MACsuinos (8 de marzo antes del inicio de la rehidratación), se cosecharon hojas cada 25 minutos, alternando plantas de sol y sombra. En estas hojas, se realizaron mediciones de acidez titulable, fluorescencia e intercambio de gases bajo luz saturante, y curva de respuesta a la luz de la fluorescencia. Se

repitieron las mismas mediciones el 15 de marzo; sin embargo una falla en la conexión del fluorómetro hizo que se mantuviera apagada la fuente de luz, por lo que sólo se obtuvieron mediciones de acidez titulable e intercambio de gases en la oscuridad.

4.3 Resultados

De manera general, se observó un patrón similar en todas las plantas. Antes de la rehidratación, la mayoría de las plantas presentaron intercambios de gases prácticamente nulos, con estomas cerrados y ausencia de asimilación de CO₂. Después de la rehidratación, los intercambios se reactivaron a partir del primer día de riego. Tanto la conductancia estomática como la asimilación nocturna aumentaron, hasta llegar a un valor máximo entre el séptimo y octavo día a partir de que comenzó la rehidratación. Sin embargo, se observaron comportamientos ligeramente diferentes entre plantas expuestas al sol y a la sombra.

Intercambio de gases con los MACsuinos

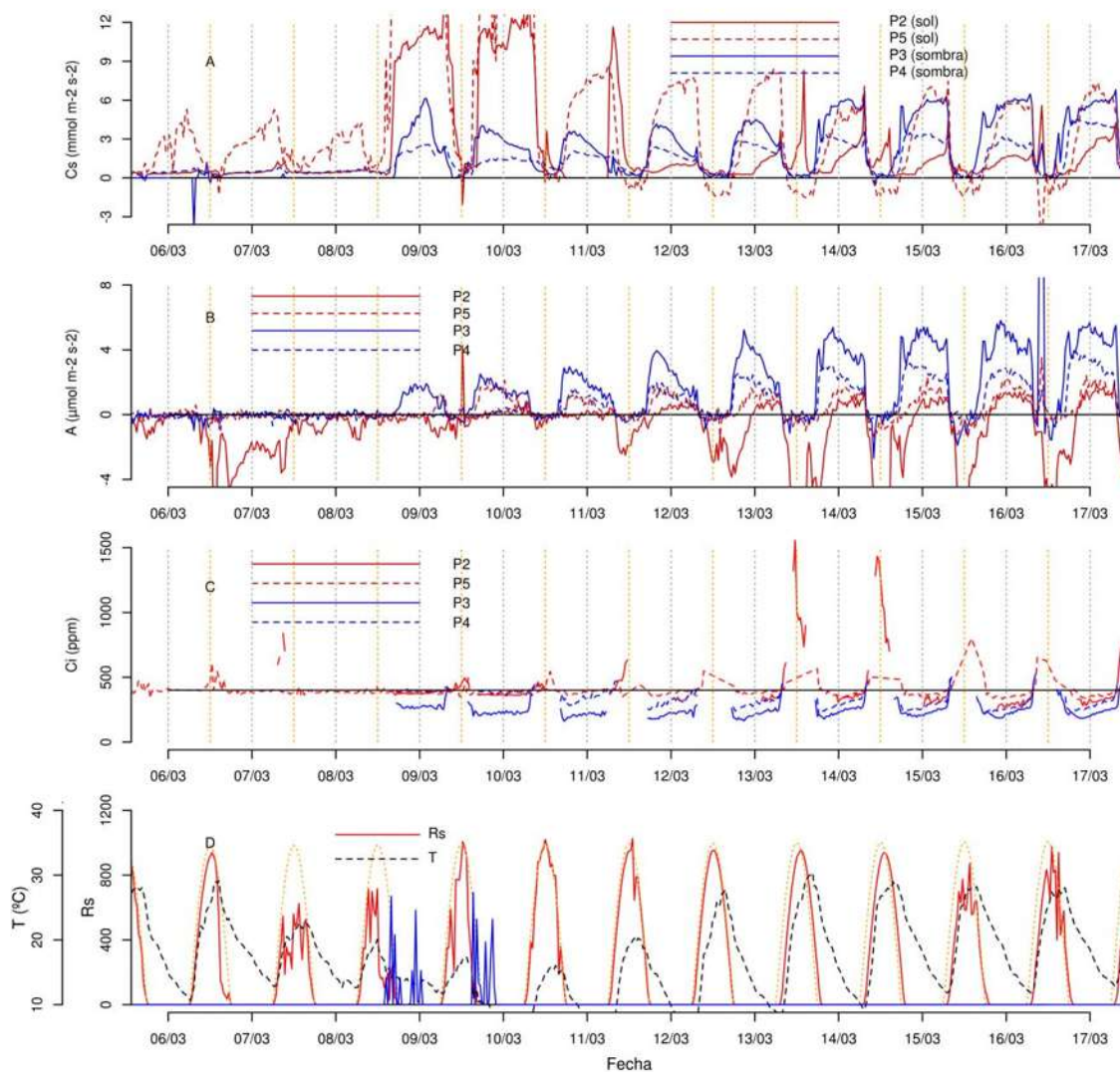


Figura 22. Dinámica del ciclo de intercambio de gases antes y después del riego. Antes del riego las plantas no recibieron riego durante tres meses. Después del riego, las plantas recibieron un riego continuo (días 7,8,9 y 15 de marzo). Se muestran la conductancia estomática y tasa de asimilación en 4 hojas de *A. cupreata*, dos aclimatadas al sol con los MACsuinos P1 y P4 y dos aclimatadas a la sombra con los MACsuinos P3 y P5. La última gráfica muestra la evolución de la temperatura y de la radiación solar durante los días correspondientes. La curva naranja punteada muestra la radiación esperada en condiciones de cielo despejado, lo que permite, por diferencia con la curva de radiación (roja), detectar la presencia de nubes.

Plantas de sombra: Las dos plantas mantenidas bajo sombra presentaron un comportamiento casi idéntico en cuanto a sus intercambios de gases, con la diferencia que

tanto la conductancia estomática como la tasa de asimilación fueron alrededor de 25% a 50% más bajas en la hoja con el MACsuino P4 que en la hoja con el MACsuino P3 durante todo el experimento. Antes de la rehidratación (del 3 al 7 de marzo) tanto la conductancia estomática como la tasa de asimilación de CO₂ fueron prácticamente nulas, durante el día como durante la noche. Después de la rehidratación, la conductancia estomática se incrementó inmediatamente. Al segundo día de lluvia, la conductancia estomática se redujo ligeramente, para después aumentar durante el resto del experimento, hasta llegar a valores máximos de 6 y 4.5 mmol m⁻² s⁻¹ en la hoja con el MACsuino P4 y la hoja con el MACsuino P3 respectivamente. Para la tasa de asimilación, se presentó un patrón similar, con la diferencia que ésta se recuperó más lentamente en la hoja con el MACsuino P3. En la hoja con el MACsuino P4, la tasa máxima nocturna de asimilación incremento a partir del 9 al 17 de marzo de 2 a 6 μmol m⁻² s⁻¹. En la hoja con el MACsuino P3, el incremento de la asimilación sólo se empezó a observar a partir del 10 de marzo con una tasa máxima nocturna de 0.5 hasta 4.5 μmol m⁻² s⁻¹ el 17 de marzo.

La evolución en la dinámica de intercambio de gases en las plantas de sombra después de la rehidratación fue la siguiente: Los primeros días tanto la conductancia estomática como la tasa de absorción de CO₂, presentaron valores altos al inicio de la noche pero disminuyeron progresivamente durante la noche, hasta alcanzar antes del amanecer valores alrededor de la mitad de los observados al inicio de la noche. A partir del cuarto o quinto día de rehidratación, este comportamiento empieza a desaparecer progresivamente y la conductancia estomática como la tasa de absorción de CO₂ se mantienen a un nivel alto durante toda la noche con un comportamiento similar al observado en el experimento anterior, en ausencia de estrés hídrico (figura 22).

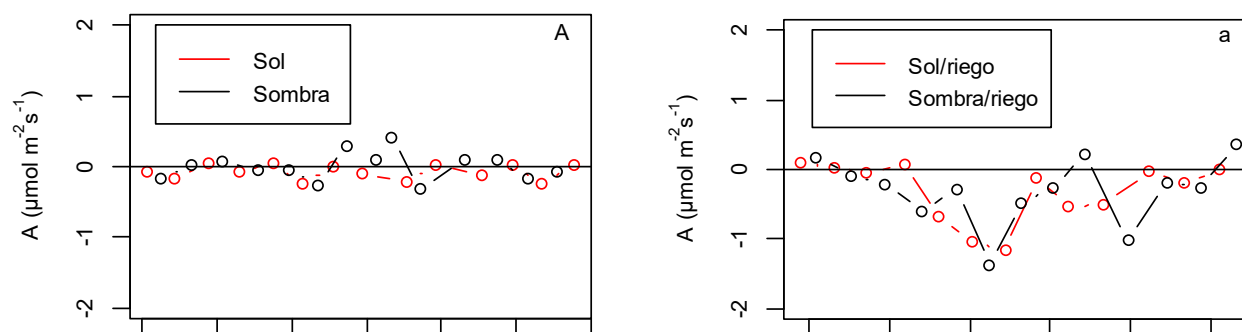
Plantas de sol: En las dos plantas de sol, se observaron respuestas más complejas, y muy contrastadas, entre la hoja con el MACsuino P5 y la hoja con el MACsuino P2 (figura 22). La hoja con el MACsuino P5, aun estando bajo estrés hídrico, mantuvo una dinámica estomática de tipo CAM, con una apertura de los estomas durante la noche. Durante estos días, la conductancia máxima nocturna llegó a valores alrededor de 4.5 mmol m⁻² s⁻¹. Después de la rehidratación, la conductancia estomática llegó a 8 mmol m⁻² s⁻¹ el tercer día después de iniciar la lluvia, y este nivel disminuyó ligeramente hasta el final del experimento a 7 mmol m⁻²

s⁻¹. En contraste con la conductancia estomática, la tasa de asimilación de esta planta fue prácticamente nula hasta el primer día de lluvia (con un corto período de asimilación observado el día 9 de marzo). Después del riego, la tasa de asimilación siguió una dinámica muy similar a las plantas de sombra: después de un pico alrededor de 1.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el 10 de marzo, disminuyó hasta alrededor de 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la noche del 10 al 11 de marzo, para después aumentar progresivamente hasta alcanzar alrededor de 2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ al final del experimento. Estas observaciones sugieren que esta planta estaba en un nivel de estrés intermedio al inicio del experimento: bastante deshidratada para inhibir la fijación y asimilación de CO₂, pero todavía bastante hidratada para permitir el ciclo de apertura estomática. La hoja con el MACsuino P2, en cambio, presentó un comportamiento muy diferente de las demás. Antes del riego, mantenía los estomas completamente cerrados de día como de noche. Después de la lluvia, empezaron a aparecer episodios de alta conductancia estomática durante el inicio de la mañana (11, 13, 14 15 y 16 de marzo) y durante el día (13, 14 y 16 de marzo). Sin embargo, la apertura estomática nocturna sólo empezó a aumentar a partir del 12 de marzo, aumentando progresivamente hasta el 16 y 17 de marzo (figura 22). Al inicio de este período, la conductancia estomática sólo aumentaba en la segunda mitad de la noche, alcanzando la conductancia estomática máxima unos momentos antes del amanecer. Conforme pasó el tiempo, la apertura estomática se hizo más temprana, y poco a poco se extendió a toda la noche. En cuanto a CO₂, esta planta presentó una fuerte pérdida de CO₂ desde antes de la rehidratación, con valores negativos, hasta 3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el 7 de marzo. Después de la rehidratación, hubo una pérdida diurna de CO₂ que se incrementó hasta más de 5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ hasta el final del experimento. Sin embargo, durante el mismo tiempo, se registró una recuperación de la fijación nocturna de CO₂ que empezó el 13 de marzo con valores de 0.7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$ y aumentó hasta valores de 2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (similares a los observados en la hoja con el MACsuino 5) hasta el final del experimento. En cuanto a la concentración de CO₂ en el mesófilo, se observaron valores muy altos durante todos los días del experimento, pero inferiores a la concentración atmosférica durante la noche. Estos resultados que esta hoja presentó a la vez bastante respiración diurna y una recuperación de la capacidad de fijación de CO₂ después de la rehidratación. Se propone la hipótesis que se trataba de una hoja que había iniciado su proceso de senescencia.

En las plantas expuestas al sol, tanto la apertura estomática nocturna como el inicio de

la absorción de CO₂ se presentaron siempre más tarde en la noche que en las plantas de sombra (figura 22). En la hoja con el MACsuino P5, el inicio de la fase nocturna se observó alrededor de una hora más tarde que en las plantas de sombra, y la tasa máxima de intercambio de gases no se alcanzó hasta la medianoche. En la hoja con el MACsuino P2, que presentó una fuerte respiración durante el día, y en la primera mitad de la noche, el atraso fue todavía mayor. Cabe notar que en ambos casos, el inicio de la apertura estomática correspondió aproximadamente con el momento en que la absorción de CO₂ se volvió positiva, es decir, el momento en que la concentración interna de CO₂ se volvió inferior a la atmosférica.

Intercambio de gases durante el día con IRGA LI-COR y acidez titulable antes y después del riego: Las mediciones de intercambio de gases antes y después del riego medido durante el día con el IRGA LI-COR corroboran los datos obtenidos por los MACsuinos. La conductancia estomática diurna fue baja (inferior a 0.002 mmol m⁻² s⁻¹) tanto antes como después de la rehidratación, independientemente del estado de las plantas). Al final de la tarde (entre las 16 horas y 18 horas) aumentó ligeramente (figura 23).



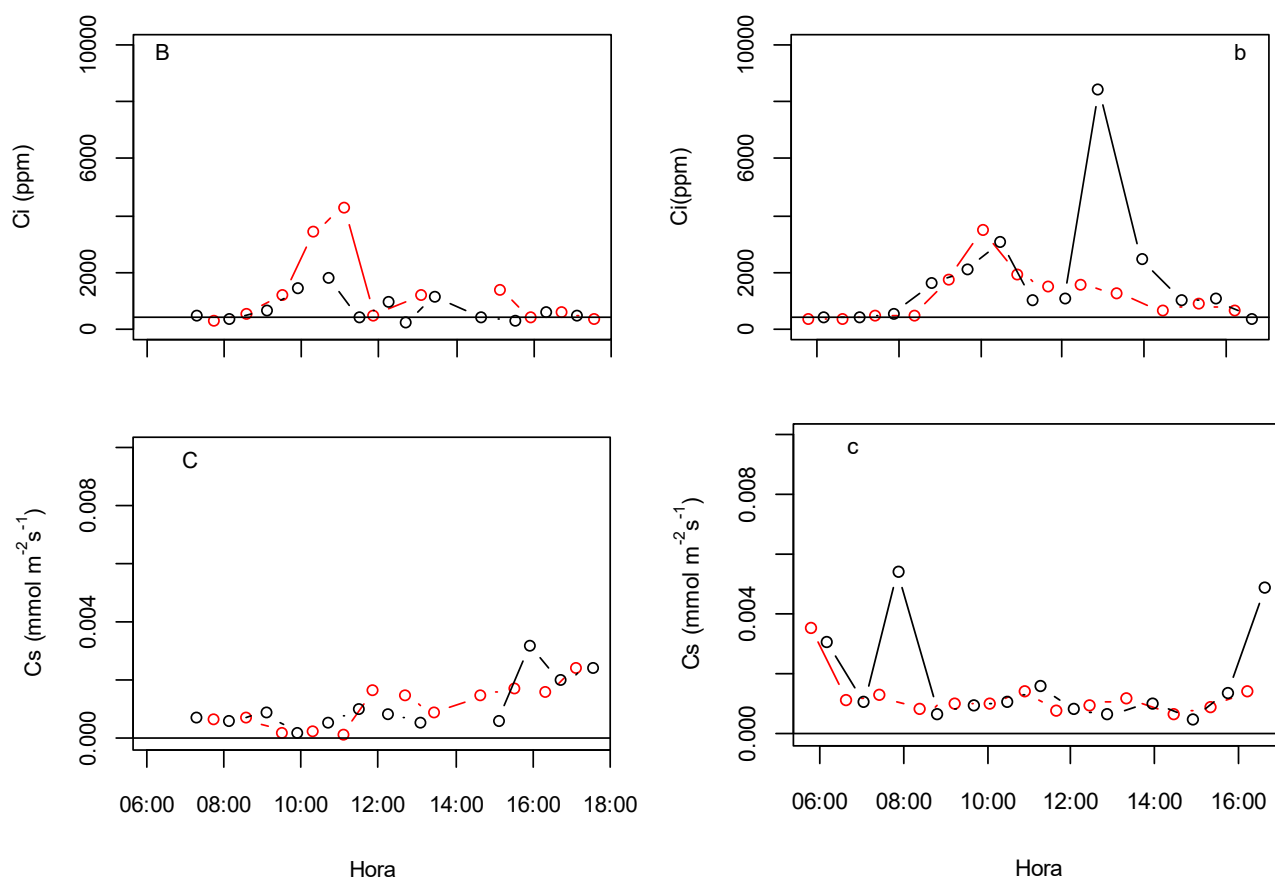


Figura 23. Dinámica diaria de intercambio de gases diurna en hojas de *A.cupreata*, en hojas aclimatadas al sol y a la sombra antes (A, B, C) y después del riego (a,b,c) . Asimilación (A), conductancia estomática (Cs), concentración interna de CO₂ en la hoja (Ci). Las mediciones se realizaron con IRGA LI-COR 6400.

Antes de la rehidratación, la tasa de asimilación fue prácticamente nula durante el día y no hubo pérdida de CO₂, mientras que después de la rehidratación, se observó una pérdida de CO₂ entre las 9 y 11 de la mañana. Otro pico de pérdida de CO₂ se observa en dos hojas alrededor de las 13 horas, pero con sólo 2 hojas medidas, puede no ser significativo. La pérdida de CO₂ durante del día sólo puede ocurrir en presencia de una descarboxilación de los ácido orgánicos, lo que implica una acumulación durante la noche anterior. La concentración de CO₂ calculada en el mesófilo confirma la presencia de un pico de concentración alrededor de las 11 horas en las plantas rehidratadas. Este pico, aunque alcanza concentraciones mayores después de la rehidratación, también se nota antes de la rehidratación, lo que indica que el ciclo CAM de descarboxilación no está completamente suprimido por la deshidratación.

Dinámica de acidez titulable diaria antes y después del riego

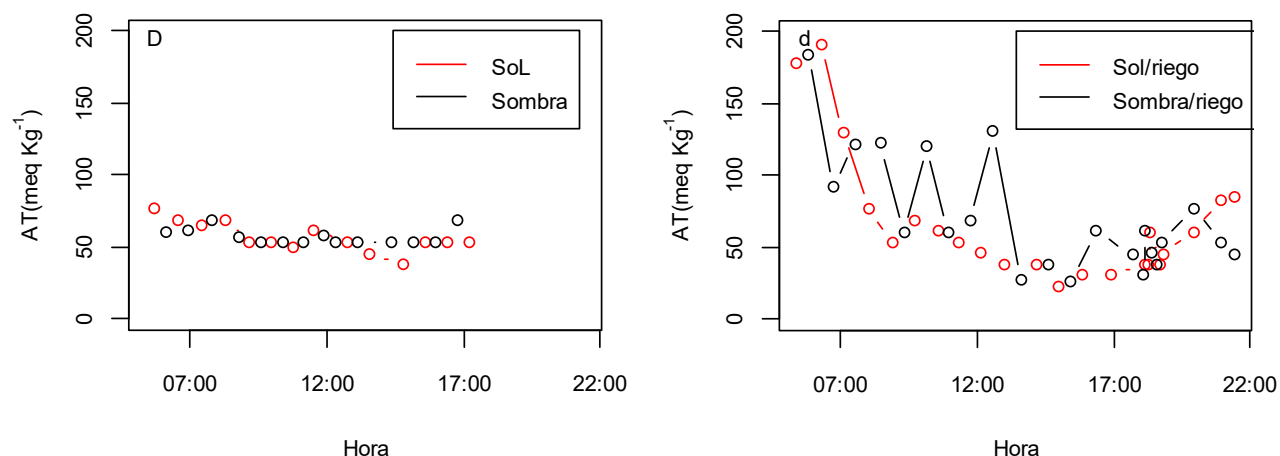


Figura 24. Dinámica diurna de acidez titulable en hojas de *A.cupreata*, aclimatadas al sol y a la sombra durante tres meses y sin recibir riego y posterior rehidratación (a los 5 días de iniciar la mediciones de intercambio de gases con los MACsuinos). Acidez titulable antes del riego (D) y después del riego (b).

Antes de la rehidratación de las plantas la acidez titulable fluctuó muy poco durante el día figura 24. Sin embargo, se observó una muy ligera reducción de acidez titulable entre el amanecer (alrededor de 70 meq kg⁻¹) y el inicio de la tarde (con un mínimo alrededor de 50 meq kg⁻¹). Después de la rehidratación se restableció la acumulación nocturna de acidez, con valores alrededor de 180 meq kg⁻¹ tanto en plantas de sol como de sombra. El valor mínimo de acidez titulable (alrededor de 40 meq kg⁻¹) fue alcanzado alrededor de las 15:00 horas en ambos tratamientos. El ligero aumento de acidez titulable entre las 15:00 y la puesta del sol (19:00 horas) sugiere que la fijación de CO₂ empezó durante el final de la tarde, a partir de las 16:00 horas.

Fluorescencia de las clorofilas, presión parcial de CO₂ en la hoja antes del riego: Excepto para el quenching no fotoquímico (NPQ), que fue menor en las plantas de sombra (entre 0 y 15) que de sol (entre 5 y 20), los otros parámetros de fluorescencia medidos en plantas sin rehidratar fueron idénticos entre plantas de sol y sombra. Se observó una eficiencia de fotosistema II baja (inferior a 0.1), un flujo de electrones bajo (inferior a 70), y un quenching fotoquímico bajo (inferior a 0.4). Todas estas variables con un ligero incremento entre las 10:00 y 13:00 horas (figura 25).

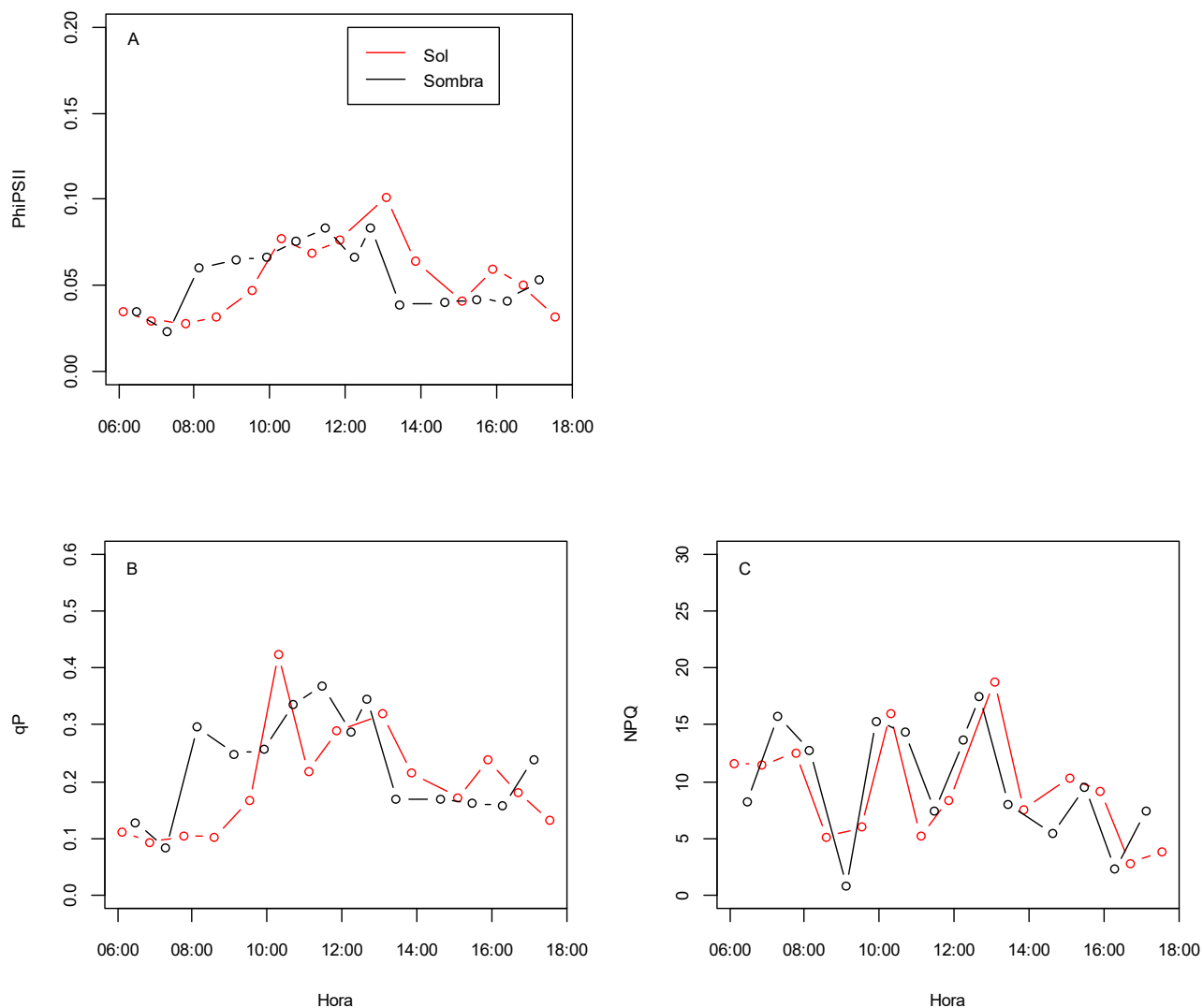


Figura 25. Índices de fluorescencia de la clorofila medidos durante el día en hojas de *A. cupreata* aclimatadas al sol y a la sombra antes del riego. Eficiencia cuántica del fotosistema II, A. Quenching fotoquímico, B. Quenching no fotoquímico C.

4.4 Discusión

Al inicio del experimento, dos plantas (las dos hojas de plantas bajo sombra) presentaban una conductancia estomática y una fijación de CO₂ nulas, de día como de noche. Una de las dos plantas expuestas al sol, la planta con el MACsuino P2, además de una conductancia estomática nula, presentó una fuerte pérdida de CO₂ durante el día. Al contrario, la planta con el MACsuino P5, expuesta al sol todavía presentó el ciclo diurno de apertura estomática, pero una absorción nula de CO₂. Estas diferencias se podrían explicar asumiendo

la secuencia siguiente de respuesta a la deshidratación: en un estado moderado de deshidratación, se pierde la capacidad de fijación del CO_2 pero se mantiene el ciclo estomático, tal como observado en la planta con el MACsuino P5. En un estado más avanzado, se detienen tanto la fijación de CO_2 como el ciclo estomático, caso de las plantas P3 y P4 como lo reportado por Nobel, 1985. Finalmente, en caso de deshidratación extrema, la hoja iniciaría un proceso de senescencia acompañada de una fuerte respiración diurna, tal como observado en la planta P2. Esta senescencia, sin embargo, podría ser reversible ya que durante el tiempo del experimento esta planta empezó a recuperar cierta fijación nocturna de CO_2 .

En las plantas bajo sombra y en la planta con el MACsuino P5 (presuntamente menos deshidratadas) el ciclo día noche de fijación de CO_2 se reinició progresivamente después de la rehidratación, y la dinámica nocturna cambió de aspecto con el tiempo: mientras la tasa de fijación del CO_2 y la conductancia estomática disminuía durante la noche en los primeros días después de la rehidratación, después de unos días las plantas volvieron a mantener una tasa de asimilación alta y constante durante toda la noche. Esta disminución de la fijación al inicio de la recuperación indica que alguna etapa del mecanismo de fijación nocturna se vuelve limitante durante la noche: una explicación podría a ser que, mientras no estén completamente hidratadas, las hojas presentan un volumen vacuolar insuficiente para almacenar todos los ácidos carboxílicos formados en la noche, y que esta limitación desaparece conforme aumenta el volumen de la vacuola. Otra sería que después de varios días de fotosíntesis limitada, la reserva de azúcares que sostiene la producción nocturna de fosfoenolpiruvato es insuficiente para durar toda la noche. Un fenómeno difícil de explicar fue que en las plantas expuestas al sol la fijación nocturna de CO_2 se reinició más tarde durante la noche que en las de sombra.

Las demás variables medidas corroboran lo observado en el intercambio de gases: en estado de deshidratación, no sólo se detienen la respiración y asimilación, sino también la fijación nocturna de CO_2 y el flujo de electrones en el fotosistema II durante el día siguiente. Un resultado interesante es que esta ausencia de flujo de electrones se hace a cambio de un quenching no fotoquímico alto: esto sugiere que el fotosistema no perdió clorofila, sino que desarrolló mecanismos de protección para disipar su energía de excitación en ausencia de posibilidades de utilizar los productos de la fase luminosa como lo sugiere Shindler y Lichtenthaler (1996).

4.5 Conclusiones

En todas las plantas observadas, la deshidratación se acompañó de una pérdida total de la capacidad de fijar CO_2 durante la noche. En tres de las plantas, también se mantuvieron totalmente cerrados los estomas. Entre las dos plantas expuestas al sol, una, probablemente menos deshidratada, mantuvo el ciclo estomático, aunque con valores de conductancia estomática alrededor de la mitad la que presentó en el estado rehidratado. Otra, probablemente iniciando un proceso de senescencia, mantuvo valores altos de pérdida de CO_2 . La rehidratación se acompañó en todas las plantas de una recuperación rápida (desde el primer o segundo día de hidratación) del ciclo de apertura estomática y un poco más lenta (dos días después) de la fijación nocturna de CO_2 . Sin embargo, en las plantas expuestas al sol, en particular en la que al parecer estaba iniciando su senescencia P2, la apertura estomática y la fijación de CO_2 se retrasaron hasta la noche. Los datos de acidez titulable confirman que la fijación de CO_2 fue casi nula en las plantas deshidratadas, y los de fluorescencia que la asimilación diurna también. Sin embargo, los datos de intercambio de gases medidos por el IRGA LI-COR 6400 durante el día indican que permanece una ligera liberación de CO_2 durante el día, aún en plantas deshidratadas.

VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los experimentos realizados en este trabajo permitieron obtener dinámicas de intercambio de gases (apertura y cierre estomático, tasa de asimilación, y concentración interna de CO₂ en la hoja. En dos de los experimentos, se obtuvieron además la dinámica de disminución diurna de la acidez titulable (indicador de la descarboxilación del ácido málico) y de fluorescencia (indicador del flujo de electrones a través del fotosistema II). Al conjuntar estas observaciones, se puede obtener información sobre la regulación de los mecanismos implicados y el grado de sincronización que presentan bajo diferentes condiciones ambientales, durante las fases diurna y nocturna del ciclo CAM.

Para la fase nocturna

En los diferentes experimentos de este trabajo, se observaron las particularidades siguientes:

- En la mayoría de los casos, se observaron dinámicas de asimilación y conductancia estomática paralelas (por ejemplo en los días 27 y 28 C y D).
- La evolución de la tasa de asimilación presentó aspectos diferentes según los experimentos: en unos casos (experimento 2, hoja de la planta 3 y en el experimento 3) se observa una tasa de asimilación prácticamente constante durante toda la noche, pero en otros es alta al inicio de la noche y disminuye progresivamente hasta el amanecer (ejemplos en el experimento 3 días del 22 al 25 de noviembre figura 9 D).
- Esta disminución de la tasa de asimilación puede ser acompañada, o no, de una reducción de la conductancia estomática. En algunos casos, la conductancia estomática se mantiene constante a pesar de la disminución de la tasa de asimilación, en otros las dos variables evolucionan de manera paralela.

Los mecanismos que limitan la fijación nocturna de CO₂ pueden ser muchos, en particular: 1) la saturación de la vacuola, 2) la conductancia estomática, la actividad PEPcase, o la actividad de los sistemas de transporte vacuolares, o 3) la falta de precursores (azúcares solubles) para la síntesis del PEP. Estos mecanismos pueden ser afectados bajo las condiciones siguientes:

- En caso de radiación muy insuficiente durante el día anterior, es posible que la totalidad del ácido málico no haya sido utilizado, dejando una concentración residual en la vacuola. En

este caso, la cantidad que puede ser acumulada en la noche es menor, y se espera que se sature durante la noche. Por otro lado, se conoce que el pH vacuolar que pueden sostener los sistemas de transporte aumenta con la temperatura (Lobit *et al.*, 2002): en condiciones de temperaturas nocturnas elevadas, la imposibilidad de mantener un pH bajo podría limitar la acumulación de ácido málico.

- Temperaturas nocturnas bajas pueden limitan las actividades enzimáticas implicadas en la actividad de transporte y la capacidad de la vacuola.

- En las plantas CAM, el PEP se produce a partir del almidón y/o de los azúcares solubles acumulados durante la fase de asimilación del día anterior: una asimilación insuficiente (por ejemplo debida a un día nublado) podría limitar esta disponibilidad.

Un criterio que permite distinguir si la fijación está limitada por la apertura estomática o por el resto del metabolismo es la concentración interna de CO₂: en el primer caso, la fijación se mantiene adentro de la hoja, lo que reduce su concentración mientras los estomas detienen la entrada, en el segundo caso la falta de utilización del CO₂ hace que su concentración interna aumente para acercarse a la atmosférica. En todos los casos observados en que la asimilación nocturna ha disminuido en el transcurso de la noche, observamos la segunda situación, y nunca se ha observado un aumento de la concentración interna de CO₂ en la segunda parte de la noche. En particular, se observaron varios días en que la reducción de fijación puede ser asociada con temperaturas nocturnas altas (ejemplos días 20 y 26 de noviembre con noches calientes figura 9). En estos días, la concentración de CO₂ aumentó mientras la fijación disminuía y se cerraban los estomas: esto indica que el principal factor limitante fue sea el transporte vacuolar sea las actividades enzimáticas (la primera opción siendo la más probable ya en es poco común que las actividades enzimáticas disminuyan cuando la temperatura aumenta).

Para la fase diurna

La fase diurna se caracteriza por dos fases: la fase III, con la liberación y descarboxilación de ácido málico contenido en la vacuola y posterior asimilación del CO₂ liberado, y la fase IV, cuando cesa la descarboxilación del ácido málico e inicia la apertura estomática y la asimilación o fijación de CO₂ en la tarde. En los diferentes experimentos de este trabajo, se observaron las particularidades siguientes:

- Mientras que la hora de cierre estomático y final de la fijación de CO₂ en la mañana suelen ser prácticamente simultáneas y relativamente constantes entre diferentes días, en la que termina la fase diurna de descarboxilación y la de apertura estomática en la tarde son muy variables, y no siempre sincronizadas.

- La pérdida de CO₂ durante el día suele ocurrir en dos situaciones: 1) alrededor del mediodía, 2) en la tarde, cuando la apertura estomática se adelanta en tiempos en que todavía está alta la concentración interna de CO₂ en la hoja (es decir, en período de descarboxilación).

Se propone el modelo siguiente para interpretar estas observaciones: suponemos que la tasa de liberación del malato de la vacuola y de su descarboxilación están controladas principalmente por la radiación solar. En condiciones de radiación alta ocurre a una tasa suficiente para que la reserva de ácido málico se agote al inicio de la tarde (alrededor de las 13:00 horas). En condición de radiación solar limitante (en presencia de nubes), ocurren dos cosas: 1) la tasa de liberación de CO₂ limita la concentración interna en la hoja y la asimilación por el ciclo de Calvin, 2) el agotamiento de la reserva de ácido málico ocurre más tarde y la liberación de CO₂ se prolonga en la tarde. Por otro lado, suponemos que los estomas responden principalmente a la concentración interna de CO₂ y a la temperatura, abriéndose cuando la temperatura sea baja (inferior a 25 °C) o muy alta (superior a 35 °C) y cuando la presión de CO₂ es baja (inferior a 450 ppm).

La combinación de estos mecanismos en diferentes condiciones de radiación y temperatura genera los escenarios siguientes: bajo condiciones de radiación alta en la mañana (en ausencia de nubes), la liberación del CO₂ es rápida, y la reserva del ácido málico se agota temprano en la tarde. Mientras tanto, la concentración interna de CO₂ permanece alta y si la temperatura no es excesiva, los estomas se mantienen cerrados y se logra una asimilación óptima del CO₂ liberado. Al contrario, en caso de pico de temperatura, se abren los estomas y se libera CO₂ a la atmósfera. Durante el resto de la tarde, si la temperatura permanece alta, los estomas se mantienen cerrados hasta la puesta del sol, cuando reinicia la apertura estomática y la fijación nocturna. Si al contrario la temperatura disminuye (por ejemplo si se nubla la tarde), los estomas se abren más temprano e inicia un periodo de asimilación en modo C3 (fase IV). Bajo condiciones de radiación baja en la mañana (en un día nublado desde la mañana o bajo sombreado), la liberación del CO₂ es lenta, y la reserva del ácido málico se agota más tarde. Mientras tanto, la concentración interna de CO₂ permanece relativamente baja

(pero superior a la atmosférica), limitando la asimilación. Si durante este período ocurre un pico de temperatura, habrá pérdida de CO₂ en la tarde. Si al contrario la temperatura baja bastante, se adelantará la apertura nocturna de los estomas, y en caso de que ocurra antes de que haya terminado la fase diurna también se perderá CO₂ a la atmósfera.

En las condiciones en la que se estudiaron en este trabajo las plantas de *A. cupreata* parecen tener una regulación imperfecta de los diferentes procesos del ciclo CAM, que en diferentes condiciones lleva durante el día a un desajuste en el metabolismo del CO₂ y en algunas condiciones a una pérdida a la atmósfera del CO₂ fijado durante la noche anterior. Estas condiciones son, al parecer, temperaturas muy altas durante el día, y/o niveles insuficientes de radiación solar durante la mañana. Al opuesto, las condiciones óptimas corresponden a temperaturas moderadas de las hojas (de 25 a 35 °C) y días soleados en la mañana pero nublados en la tarde (permitiendo una actividad de asimilación adicional durante la fase IV).

Estas condiciones son las que existen durante la temporada de lluvia en la sierra de Michoacán y Guerrero de la que *A. cupreata* es endémica: mientras la altitud y las brisas térmicas mantienen las temperaturas en el rango óptimo, el relieve favorece la formación de nubes en las tardes. Al contrario, la sensibilidad del metabolismo a condiciones diferentes podría ser la explicación del hábitat tan restringido de esta especie y de su carácter endémico.

VII. LITERATURA CITADA

- Andrade J. L, De la Barrera E, Reyes-García C, Ricalde M. F, Vargas-Soto G, Cervera JC. 2007.** El metabolismo ácido de las crasuláceas: Diversidad, fisiología ambiental y productividad. *Bol. Soc. Bot. Méx.* **81**:37-50.
- Azcón-Bieto J y Talón. 2000.** Fundamentos de Fisiología Vegetal. 1^{era} ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana. España. 168-171pp.
- Bastide B, Sipes D, Hann J, Ting I.P. 1993.** Effect of severe water stress on Aspects of Crassulacean Acid Metabolism in Xerosicyos. *Plant physiol.* **103**:1089-1096.
- Borland A. M, Griffiths H. 1992.** Properties of phosphoenolpyruvate carboxylase and carbohydrate accumulation in the C3-CAM intermediate *Sedum telephium* L. Grown under different light and watering regimes. *Journal of Experimental Botany* **43**:353-361.
- Chase M. W, Reveal J. L and Fay M F. 2009.** A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society.* **161**: 132–136.boj_999 132.
- Colunga-García M. P., A. Larqué S., L. E. Eguiarte, Zizumbo-Villarreal D. 2007.** En lo Ancestral hay Futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. 1^{era} Ed. CICY-CONACYTCONABIO-INE. México. pp. 287-317.
- Drennan P. M, Nobel P. S. 2002.** Responses of CAM species to increasing atmospheric CO₂ concentrations. *Plant, Cell and Enviroment.* **23**: 767-781.
- Dodd A. N, Borland A. M, Haslam R. P, Griffith H, Maxwell K. 2002.** Crassulacean acid metabolism: plastic fantastic. *Journal of Experimental Botany* **53**: 569-580.
- Franco A.C. Ball E. Lüttge U. 1990.** Patterns of gas exchange and organic acid oscillations in tropical trees of the genus *Clusia* *Oecologia* **85**: 108-2074.
- Gentry S. H. 1982.** Agaves of Continental North América. Univ. Arizona Press, Tucson, Arizona. U.S.A. 670 pp.

- García-Herrera E. J, Méndez-Gallegos S de J, Talavera-Magaña D. 2010.** El genero *Agave* spp. en México: Principales usos de Importancia socioeconómica y agroecológica. *RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición* **5**: 109-129
- Geydan T. G, Melgarejo L. M. 2005.** *Metabolismo ácido de las crasuláceas*. *Acta Biológica Colombiana* **10**(2):3-15
- Ginson A. C. y Nobel P.S. 1986.** *The Cactus Primer*. Harvard University Press, Cambridge, 286 pp.
- Gómez-Sierra J. 2005.** Organogénesis y Embriogénesis Somática de *Agave mezcalero* (*Agave cupreata* Trel & Berger, Agavaceae) con potencial industrial. Tesis profesional Facultad de Biología. UMSNH. México.
- Gómez Pompa A. 1963.** El género *Agave*. *Cat. Suculent. Mexico*. **8**:3-28
- Griffiths H y Parry M. A. J. 2002.** Plant responses to water stress. *Annals of Botany*. **89**: 801-802.
- Hartsock T L y Nobel P S, 1976.** Watering converts a CAM plant to daytime CO₂ uptake. *Nature* **262**:574-576.
- Holtum JAM. 2002.** Crassulacean acid metabolism: plasticity in expression, complexity of control. *Functional Plant Biology* **29**: 657-661.
- Illsley C, Vega E, Pisanty I, Tlacotempa A, García P, Morales P, Calzada M. 2007.** Maguey papalote: Hacia el manejo campesino de un recurso colectivo en el trópico seco de Guerrero, México. CICY-CONACYT-CONABIO-INE. México. 319-338 pp.
- Jewer P. C, Incoll L. D y Howarth G. L, 1981.** Stomatal responses in isolated epidermis of the crassulacean acid metabolism plant *Kalanchoe daigremontiana* Hammett et Perr. *Planta* **153**: 238-245.
- Judd W S, Campbell C S, Kellogg E A, Stevens P F, Donoghue M J. 2007.** Plant systematics: a phylogenetic approach. *International Association for Plant Taxonomy (IAPT)*. **4**: 1315-1316.

- Lobit P, Soing P, Génard M. Habib R. 2002.** Theoretical analysis of relationships between composition, pH, and titratable acidity of peach fruit. *Journal of Plant Nutrition* 25) **12**: 2775-2792.
- Lock G. W, 1962.** Sisal: Twenty-five Years Sisal Research. Longmans, London, pp 355.
- Lüttge U, 2004.** Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). *Annals of Botany* **93**: 629-652.
- Martínez Palacios A, Morales-García J.L, Guillén Rodríguez S. 2015.** Aspectos sobre el manejo y la conservación de Agaves mezcaleros en Michoacán. México, pp: 61-77.
- Maxwell K, Johnson G. N. 2000.** Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345): 659–668.
- Medina E, Cram E. J, Lee HSJ, Lüttge U, Popp M, Smith JAC, Diaz M. 1989.** Ecophysiology of xerophytic and halophytic vegetation of a coastal alluvial plain in Northern Venezuela. I Site descriptions and plant communities. *New Phytologist* 111:233-243.
- Neales T. F. 1973.** The effect of night temperatures on CO₂ assimilation, transpiration, and water use efficiency in *Agave Americana* L. *Australian Journal of Biological Sciences* **26**:705-714.
- Nobel P. S y Quero E 1986.** Environmental Productivity Indices for a Chihuahuan Desert Cam Plant, Agave Lechuguilla. *Ecology*. **67**:1-11.
- Nobel P. S 1985.** PAR, water and temperature limitations on the productivity of cultivated Agave fourcroydes (henequen). *Journal of Applied Ecology* **22**:157-173
- Nobel P. S 1988.** Environmental Biology of Agaves and Cacti. USA, Cambridge University Press, pag 270.
- Nose A. S, Matake K, Miyazato y Murayama S. 1985.** Studies on matter production in pineapple plants III. Effects on nitrogen nutrition on the gas exchange of plants tops. *Japanese Journal of Crop Science* **54**: 195-204.
- Ramírez-Tobías H. M, Peña-Valdivia C.B, y Rogelio Aguirre J. 2014.** Respuestas bioquímico-fisiológicas de especies de Agave a la restricción de humedad. *Botanical Sciences*. **92** (1): 131-139.

Osmond C. B. 1978. Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Annual Review of Plant Physiology* **29**: 379-414.

Osmond C.B. Adams III W.W. y Smith S.D. 1994. Crassulacean acid metabolism. En: Pearcy R.W, Ehleringer J, Mooney H. A. y Rundel P. W. Eds. *Plant Physiological Ecology. Field Methods and Instrumentation*. Londres 255-280 pp.

Pimienta-Barrios E, Zañudo-Hernandez J, García-Galindo J. 2006. Fotosíntesis estacional en plantas jóvenes de *Agave tequilana*. *Agrociencia*. **40**:699-709.

Sáenz-Romero C, Martínez-Palacios A, Gómez Sierra J.M, Pérez-Nasser N, Sanchez-Vargas N.M. 2012. Estimación de la disociación de *Agave cupreata* a su habitat idóneo debido al cambio climático. *Revista Chapingo Serie Ciencia Forestales y del Ambiente*.

Salinas Estrada H. Lobit P. De la Barrera E. 2014. Efecto de la temperatura sobre la fotosíntesis de *Agave cupreata* (Trel & Berger). México. pp:34-51. Tesis profesional Facultad de Biología. UMSNH. México.

Smith Jr. C. E 1986. Preceramic Plant Remains from Guilá Naquitz. In Guilá Naquitz. *Archaic Foraging and Early Agriculture in Oaxaca, México*. Flannery K.V (Ed.), Academic Press. New York. 265-301pp.

Stuart Chapin .F. 1991. Integrated responses of plants to stress III. *BioScience*, 41(1), pp. 29-36.

Taiz L y Zeiger E. 2002. *Plant Physiology*. Sinauer Associates. 3rd ed. 690 pp.

Winter K, Smith JAC. eds. 1996. *Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution*. Ecological Studies vol114. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 389-426.

Consultas de internet:

(<http://biodiversidad.gob.mx>), último acceso en enero del 2016.

(<http://www.sabelotodo.org/electrotecnia/termostato.html>), último acceso en agosto del 2013.

(www.cuentame.inegi.org.mx), último acceso en octubre del 2014.

(www.thecompositaehut.com), último acceso en junio del 2017.

VIII. ANEXOS

Prototipos de los MACsuinos utilizados en los diferentes experimentos



Figura 26. Primer prototipo del MACsuino que se provó.



Figura 27. Segundo prototipo del MACsuino que se provó.



Figura 28. Tercer prototipo de MACsuino que se provó.

Sistema de fotosíntesis automatizado de bajo costo para el estudio de la fotosíntesis en plantas de metabolismo ácido de las crassuláceas, MACsuino (Medición de Asimilación y Conductancia estomático con arduino)

Hermelinda Salinas Estrada¹, Alberto Gómez-Tagle², Luis López Pérez¹, Alejandro Martínez Palacios,¹ Martha Pedraza Santos³, Erick De la Barrera Montppellier⁴, Philippe Lobit^{1*}.

¹ Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, km 9.5 Carr. Morelia-Zinapécuaro, 58190 Tarímbaro, Michoacán, México.

² Instituto de Investigaciones sobre Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Avenida Juanito Itzicuaró SN, Nueva Esperanza, 58330 Morelia, Michoacán México.

³ Facultad de Agrobiología Presidente Juárez. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Avenida Revolución esq. Berlín. 60000, Uruapan. Michoacán, México.

⁴ Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, UNAM Campus Morelia, Antigua Carretera a Pátzcuaro 8701, Col. Ex-Hacienda de San José de la Huerta, 58190, Morelia, Michoacán, México.

Autor para correspondencia: Philippe Lobit. Tel.+52 443 322 3500, plobit@gmail.com

Resumen

En la fotosíntesis las plantas intercambian gases con la atmósfera. Este intercambio de gases ocurre en los procesos de transpiración y absorción (o pérdida) de CO₂ por las hojas. Con la introducción de los analizadores de gases por infrarrojo se ha hecho posible la medición del intercambio de gases en campo, sin embargo su costo es muy alto. Aquí presentamos un sistema de fotosíntesis que se diseñó para estudiar la fotosíntesis en plantas CAM. Para su construcción se utilizó un sistema cerrado utilizando un sensor infrarrojo de CO₂ y un sensor capacitivo de humedad relativa y temperatura, acoplados a un microcontrolador Aduino® de

código abierto. El porómetro fue puesto a prueba durante diez días de medición de forma continua y validado contra una pinza a fotosíntesis comercial (modelo LI-COR 6400), midiendo dos plantas de agave chino (*Agave cupreata*) en forma simultánea durante 36 horas seguidas. El porómetro es una alternativa al modelo comercial y puede ser utilizado en laboratorio y en campo.

Palabras clave: Arduino, fotosíntesis, intercambio de gases, sensor de CO₂, sensor de humedad relativa y temperatura.

Introducción

Existen varios métodos para medir el intercambio de gases, entre los que se encuentran sistemas cerrados o abiertos. En ambos métodos, la hoja se encierra en una cámara (sea transparente o con iluminación artificial) y se estiman los flujos de vapor y CO₂ entre la hoja y la cámara. En un sistema abierto, se impone un flujo aire de concentración conocida y constante hacia la cámara, se miden las concentraciones de vapor de agua y CO₂ a la entrada y a la salida, y a partir de estos datos se calculan la tasa transpiración de absorción (o liberación) de CO₂. En el sistema cerrado, se alternan fases abiertas durante las cuales la cámara se llena de aire fresco, y fases cerradas durante las cuales se mide la evolución en el tiempo de la concentración de CO₂ y vapor de agua. Transpiración y absorción de CO₂ se calculan analizando las tasas de acumulación de agua. Existe una variedad de sistemas de medición de fotosíntesis e intercambio de gases comerciales para el estudio de la fotosíntesis, en condiciones de laboratorio como de campo. La mayoría de estos equipos son de tipo abierto y utilizan la tecnología de análisis de gases por infrarrojo, en la que la concentración de gas (CO₂ o vapor de agua) se puede medir electroópticamente por la absorción de una determinada longitud de onda en el infrarrojo (Long *et al.*, 1996). Sin embargo, la mayoría de los sistemas son costosos, complejos de usar, y poco portátiles. Además, suelen venir equipados de una cámara de medición para hojas delgadas, poco adaptada al estudio de plantas suculentas o cactus.

Uno de los temas de investigación en nuestro grupo de trabajo es el estudio de la fotosíntesis en plantas de tipo CAM. En particular, se busca describir los efectos de diferentes variables ambientales (radiación solar, temperatura y estado hídrico de la planta) sobre la

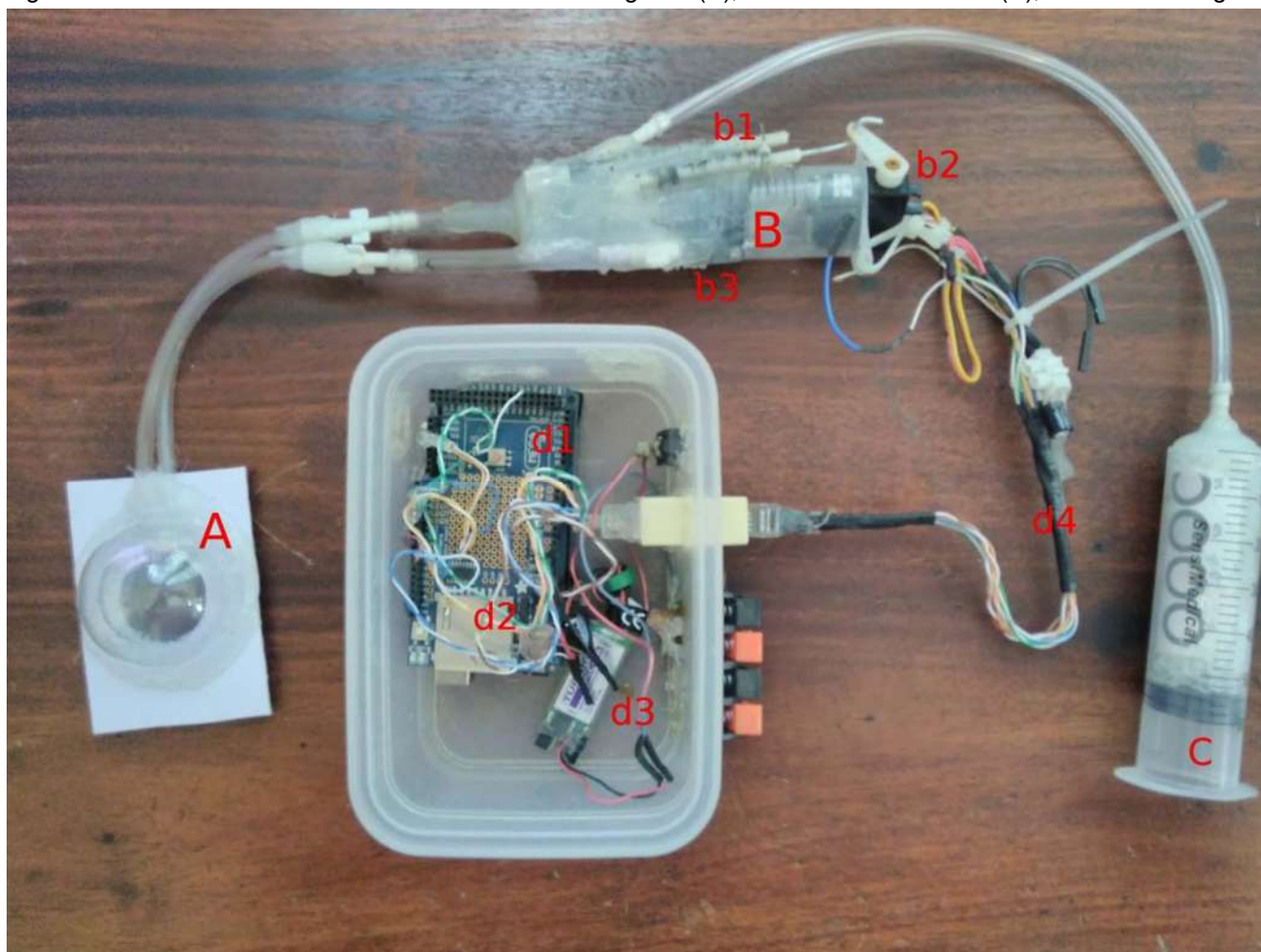
regulación de su ciclo de intercambio de gases. Para estos estudios, se requiere tomar mediciones de intercambio de gases de manera continua y automatizada durante varios días y replicar estas mediciones en plantas sometidas a diferentes tratamientos. Por estas razones, se diseñó un sistema de medición de intercambio de gases, con los objetivos que 1) sea de bajo costo, 2) sea fácil de instalar en hojas de cualquier forma y 3) realice mediciones de manera automática por largos periodos de tiempo (varias semanas). El presente trabajo presenta el desarrollo de este sistema, basado completamente en tecnología de bajo costo y fácilmente accesible, algunas pruebas de funcionamiento, y unos primeros resultados obtenidos en *A. cupreata* (agave mezcalero endémico de Michoacán y Guerrero, conocido como maguey chino, o papalote).

Materiales y métodos

Construcción del MACsuino

El sistema de medición completo se presenta en la figura 1. Consta de dos cámaras: una cámara de colecta de gases que se coloca sobre la hoja, y una cámara de medición que contiene un juego de sensores de humedad relativa y temperatura y de CO₂. Las dos cámaras están conectadas entre sí con mangueras flexibles, de tal manera que forman un circuito cerrado. La cámara de medición contiene además un ventilador que impulsa la circulación de aire entre ambas cámaras, y dos válvulas operadas por un servo-motor, una de cada lado del ventilador, que permiten abrir el sistema para reemplazar el aire por aire limpio. Del lado en que el ventilador succiona el aire, la válvula se conecta mediante una manguera flexible a un contenedor lleno de silica-gel, que permite desecar parcialmente el aire entrante.

Figura 1. Partes del MACsuino: la cámara de colecta de gases (A), la cámara de medición (B), donde se distinguen



las dos jeringas que sirven de válvula (b1) y el servo-motor que las controla (b2) y, a través de la transparencia de la jeringa, los dos sensores de humedad y CO₂ (b3), la jeringa que contiene el gel de sílice para secar el aire (C), y la caja que contiene al sistema de control (D), con el Arduino (d1), la tarjeta de adquisición (d2) y la fuente de poder (d3). La conexión entre el sistema de control y los sensores se hace con un cable de red (d4).

Los componentes utilizados para la construcción de este diseño (cuadro 1) son los siguientes: la cámara de colección de gases está hecha con un hemisferio de poliestireno transparente de 2.5 cm de diámetro (se trata de la mitad de una esfera en forma de chupón, que se usa para regalos de bautizo, y se consigue en las tiendas de manualidades "La Parisina") pegada a una placa delgada de PVC blanco, conectada a las dos mangueras flexibles (obtenidas de máscaras de oxígeno para hospitales), y sellada con silicón caliente. La cámara de medición está construida en una jeringa de 60 mL, en la que se colocan los sensores, el ventilador, las dos válvulas y el servo-motor. El sensor de CO₂ (SenseAir®S8, SE-0119, Suecia) es basado en el principio de infrarrojo no dispersivo, que mide la concentración CO₂ electroópticamente por la absorción de una determinada longitud de onda en el infrarrojo (IR)

(<http://www.co2meter.com/collections/co2-sensors/products/s8-miniature-co2-sensor>). El sensor de humedad relativa (HR) y temperatura (T) es de tipo capacitivo (DHT22) y tiene un tiempo de respuesta de 5 y 10 segundos para la HR y T respectivamente (<http://www.geekfactory.mx/tienda/sensores/dht22-sensor-de-temperatura-y-humedad/>).

Ambos sensores se colocan en un tapón hecho con dos de los empaques provenientes de los mismos pistones de jeringas, con sus cables de conexión atravesando el tapón para conectarse al Arduino mediante un cable de red. El miniventilador (AD2005LB-G73,) que hacer circular el aire dentro del sistema se coloca en la extremidad de la jeringa. Las válvulas están hechas con dos jeringas de insulina (BD Ultra-Fine™ 1ml) en medio de las cuales se hizo un agujero y se pegó un conector para mangueras de aire, de tal manera que la jeringa funciona como una válvula cerrada cuando el pistón está empujado y abierta cuando está jalado. Una de las jeringas se conecta a la cámara de medición del lado de la succión del ventilador y permite la entrada de aire fresco, y la otra la salida del aire usado a la atmósfera. Un servomotor miniatura (HD-1160A), instalado en la extremidad de la jeringa de 60 mL, acciona los pistones de las válvulas mediante un perno hecho con un alambre metálico. Finalmente, se construyó un sistema de filtración usando una jeringa de 60 mL con silica gel y una tira con indicador de humedad en su interior, para secar el aire que entra al sistema.

COMPONENTES	DESCRIPCIÓN	IMAGEN
Arduino Mega (2560)	Microcontrolador: 54 pines digitales que funcionan como entrada y salida, 16 entradas análogas, un cristal oscilador de 16MHz, memoria flash de 256 KB y voltaje operativo de 5V	
Sensor de CO ₂ (SenseAir®S8 SE-0119)	Rango de medición: de 400 a 2 000 ppm con una precisión de ± 40 ppm, temperaturas, de 0 a 50 °C, humedad relativa de 0 a 85%, alimentación de 4.5 a 5.25V y consumo promedio de energía de 18 Ma	
Sensor de Humedad Relativa y Temperatura (DHT22)	Rango de medición de 0 a 100% con una precisión de 2 a 5%. Rango de medición de temperatura de -40 a 80°C con una precisión de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y voltaje operativo de 3 a 5V	
Miniventilador (AD2005LB-G73)	Voltaje operativo de 5V y 80 mA	
Cámara	Esfera de plástico, lámina de plástico, pegamento UHU, silicón, plastilina automotriz, ganchos de alambre, manguera y espigas	
Válvulas	3 jeringas de 1 mL acopladas a un servo-motor.	
Otros componentes	Regulador de voltaje, batería de 12V, cables y conectores, cable USB (Tipo A-B 2.0), Tarjeta SD (16GB), gel de sílice, tira indicadora de humedad, 2 jeringas de 60ml, 2 jeringas para insulina de 1ml BD Ultra-Fine™	

Cuadro1. Descripción de los principales componentes utilizados en la construcción de un MACsuino

La operación del sistema está controlada por una placa Arduino Mega (<http://www.arduino.cc/en/Main/ArduinoBoardMega2560>), asociada a una placa registradora de datos (data logger shield, genérico). Para el suministro de energía utilizamos una fuente de poder regulada (UBEC 5V, 3A, Hobbywing, USA), a la cual se conectaron dos capacitores de 100 μ F (uno en la placa Arduino, otro en la alimentación de los sensores) para estabilizar el voltaje. La fuente de poder escogida permite alimentar el circuito con una batería estándar de 12 volts. Se programó el Arduino para controlar la apertura y cierre del sistema, la toma de mediciones de los sensores, y el registro de los datos obtenidos en una tarjeta de memoria SD. Al final de un experimento, se obtiene un fichero de texto (formato .csv) en que cada línea corresponde a una medición, registrando hora de medición, número del ciclo, temperatura, humedad relativa y presión parcial de CO₂. La programación se hizo utilizando el software IDE versión 1.6.8 de Arduino (<https://www.arduino.cc/en/Main/Software>).

Funcionamiento

El MACsuino funciona como un sistema cerrado (el aire que se analiza no entra todo el tiempo al sistema), que funciona como de la manera siguiente (figura 2). Cada media hora, el sistema se abre durante 15 minutos para llenarse de aire fresco parcialmente disecado (gracias al filtro de aire). Durante los 15 minutos siguientes, el sistema se cierra, y los sensores miden la evolución de la presión de vapor y de CO₂ del aire circulante. Gracias al ventilador, el aire circula en permanencia entre la cámara transparente y los sensores. Cuando la hoja transpira y fija CO₂, la presión parcial de vapor en el sistema aumenta mientras que la del CO₂ disminuye. La transpiración y tasa de fotosíntesis se calculan a partir de la pendiente de las curvas de evolución obtenidas.

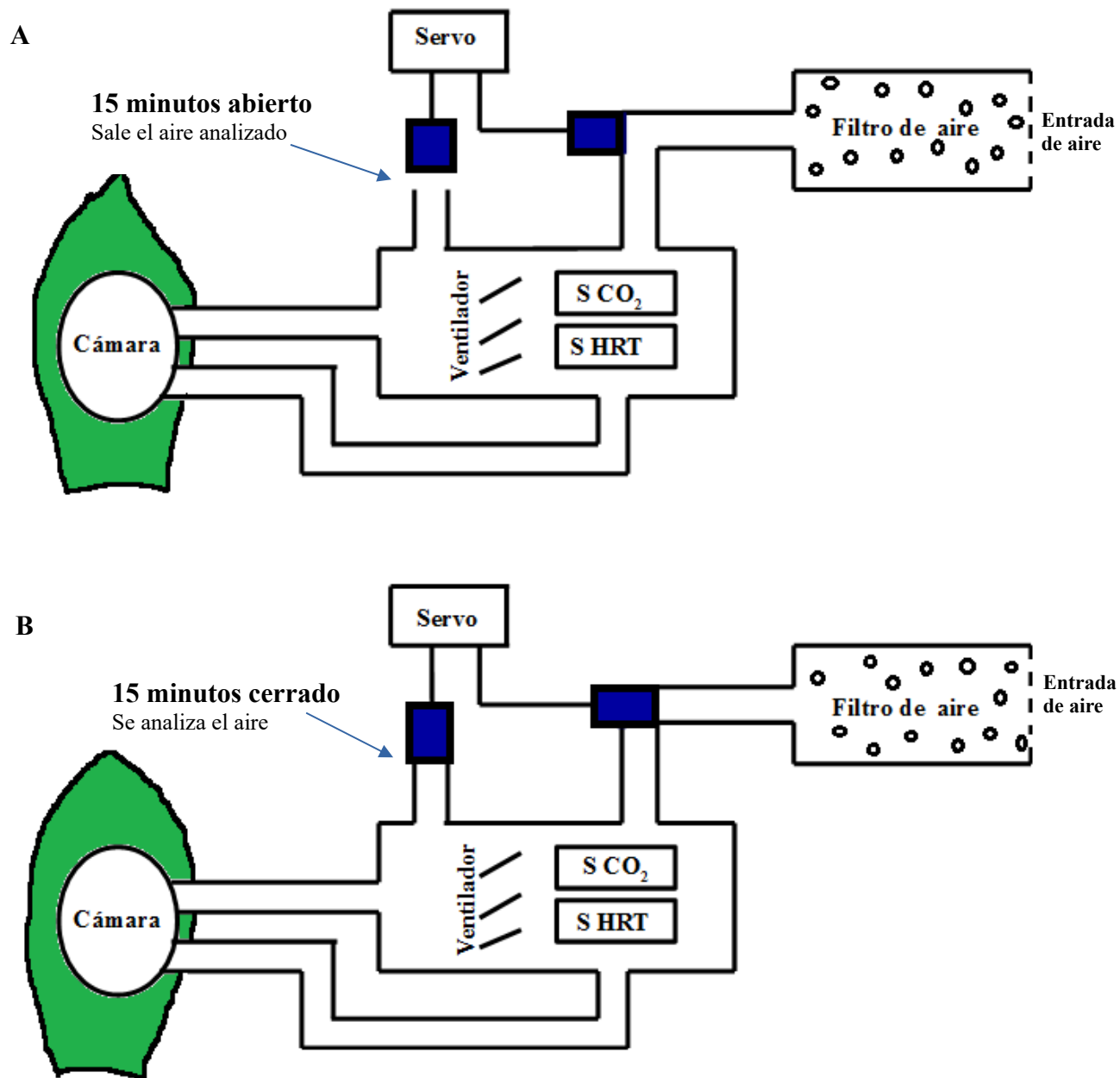


Figura 2. Principio de medición de los intercambios de gases en el MACsuino. En el esquema A se muestra el sistema abierto condición en la cual entra el aire nuevo al sistema y sale el aire analizado. En el esquema B el sistema está cerrado y en esta condición mide la evolución el aire nuevo que entró al sistema.

Análisis de los datos y cálculo de las variables de intercambio de gases

Al final de cada experimento de medición de intercambio de gases se obtiene un fichero con el registro de las mediciones de temperatura, humedad y CO₂ realizadas durante cada ciclo de cierre del sistema. Después de descargarlos a una computadora, estos datos son analizados utilizando el programa R (www.r-project.org) para calcular las variables de intercambio de gases. Los cálculos son los siguientes.

La transpiración (Tr , expresada en $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se define como el número de moles de agua que se liberan a través de la superficie de la hoja, por unidad de superficie y por unidad de tiempo. En nuestro sistema, esta agua se acumula en las cámaras de recolección y de medición, y tenemos:

$$Tr = \frac{dn_{H_2O}}{S dt}$$

donde n_{H_2O} es el número de moles de agua presente en el sistema, S la superficie de hoja estudiada (m^2) y t el tiempo (s).

n_{H_2O} se estima por la ley de los gases ideales:

$$n_{H_2O} = \frac{V}{RT} ea$$

donde ea es la presión parcial de vapor, V es el volumen (m^3). R es la constante de los gases ideales ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) y T es la temperatura en $^{\circ}\text{K}$.

La presión de vapor ea es el producto de la humedad relativa medida por la presión de vapor saturante:

$$ea = (RH/100) es(T)$$

$$\text{con } es(T) = 0.6108 \exp^{(17.27 T)/(T+237.3)} \quad (\text{Allen, 1998})$$

Asumiendo que el volumen y la temperatura permanecen constantes durante el ciclo de medición:

$$\frac{dn_{H_2O}}{dt} = \left(\frac{V}{RT} \right) \frac{d ea}{dt}$$

De tal manera que:

$$Tr = \left(\frac{V}{SRT} \right) \frac{d ea}{dt}$$

La asimilación (A, expresada también en mol m⁻² s⁻¹), de igual manera que para el vapor de agua, se define como el número de moles de CO₂ que se absorben a través de la superficie de la hoja y desaparecen de las cámaras de recolección y medición, por unidad de superficie y por unidad de tiempo:

$$A = \frac{d n_{CO_2}}{S dt}, \text{ y } \frac{d n_{CO_2}}{dt} = \left(\frac{V}{RT} \right) \frac{d P_{CO_2}}{dt}$$

La presión parcial del CO₂ se obtiene a partir de las lecturas del sensor, que expresa los datos como la concentración (en ppm) que tendría el CO₂ a la presión atmosférica al nivel del mar (101325 Pa). Por lo que, expresada en Pa:

$$P_{CO_2} = \left(\frac{101325}{1000000} \right) CO_{2l(ppm)}$$

La conductancia estomática al vapor de agua se define como la relación entre transpiración y déficit de presión de vapor, donde el déficit de presión de vapor (VPD) es la diferencia entre es y ea. Por razones históricas, y para poder expresar la conductancia estomática en unidades de flujo (mol m⁻² s⁻¹), esta relación se multiplica por la presión atmosférica Pa:

$$C_s = \frac{Tr Pa}{(es(T) - ea)}$$

Conociendo la tasa de asimilación y la conductancia estomática, se puede calcular además estimar la presión parcial de CO₂ en la hoja, y su concentración (ppm). El factor 1.6 presente en la siguiente ecuación corresponde al hecho que como la molécula de CO₂ es más pesada que la de agua, su difusión es más lenta, de tal manera que a apertura estomática igual la conductancia para el CO₂ se obtiene dividiendo la para el agua por el factor de difusión 1.6:

$$P_l^{CO_2} = P_i^{CO_2} - \frac{1.6 A Pa}{C_s}$$

Una serie típica de mediciones tiene el aspecto mostrado en la figura 3 y detallado más abajo. El problema práctico consiste en determinar la tasa de variación de ea y P_{CO_2} al inicio de la fase cerrada de cada ciclo. Para esto, se admite que la evolución de estas variables se

puede aproximar por una recta durante por lo menos la primera parte del ciclo de mediciones, y que la pendiente de esta recta es igual a la observada en las mediciones. El procedimiento utilizado para obtener esta pendiente consiste en ajustar una curva alisada a los datos medidos (utilizando la función "smooth.spline" en R, interpolar esta curva alisada con la función "splinefun", y utilizar la función para calcular la pendiente en todos los puntos de la curva medida. Se considera que la pendiente inicial es igual al valor máximo observado en el ajuste realizado.

Mediciones de intercambio de gases

Se presentan dos series de mediciones de intercambio de gases realizadas con el MACsuino: una con el objetivo de validar el sistema contra un equipo comercial, y otra para verificar la capacidad de realizar mediciones continuas por tiempos largos.

Para evaluar la capacidad del sistema de funcionar por periodos largos, se presentan datos de intercambio de gases obtenidos en dos plantas durante un período de 15 días, entre el 3 y 19 de marzo. Ambas plantas fueron cultivadas en macetas de 2L llenas de tierra en un invernadero de malla sombra, y regularmente fertilizadas y regadas hasta alcanzar un diámetro de alrededor de 25 cm. Durante los tres meses anteriores al experimento, fueron sacadas al aire libre: una quedó expuesta al sol mientras que la otra fue colocada debajo de una malla sombra. No se aplicó ningún riego durante este período, por lo que al inicio del experimento ambas plantas estaban muy deshidratadas y presentaban un color rojizo (más marcado en la planta de sol). El 3 de marzo, dos MACsuinos fueron colocados en una hoja de cada planta (cuarta hoja bien desarrollada) y programados con ciclos de medición de 30 minutos (15 minutos abiertos y 15 minutos cerrados). El 8 de marzo, al sexto día experimento, iniciaron dos días de lluvias continuas asociadas con el paso de un ciclón y rehidrataron las plantas. Las mediciones siguieron hasta el 19 de marzo, cuando se terminó el experimento.

Para validar el funcionamiento del MACsuino, se realizaron mediciones simultáneas con el MACsuino y con un equipo de fotosíntesis comercial, el IRGA LI-COR 6400. Estas mediciones se realizaron por un lado en una de las dos plantas del experimento anterior (la expuesta al sol, a la que se había instalado el MACsuino el 3 de marzo, por otro lado en una planta nueva (similar a la anterior y también expuesta al sol). Esta planta se colocó en una

mesa de cristal, y se instaló la pinza del IRGA LI-COR 6400 en la parte media de una hoja de características similares (edad, tamaño y exposición). Para hacer mediciones con el IRGA LI-COR 6400 se tuvo que equipar la cámara de mediciones con un doble empaque y colocar la planta con la maceta inclinada. Las mediciones fueron programadas cada 2 minutos con el autoprograma "AutoLog". Se tomaron mediciones al mismo tiempo con ambos equipos durante un período de 36 horas (dos noches y un día), hasta la mañana 17 de marzo.

Resultados

Ejemplo de ciclo de medición

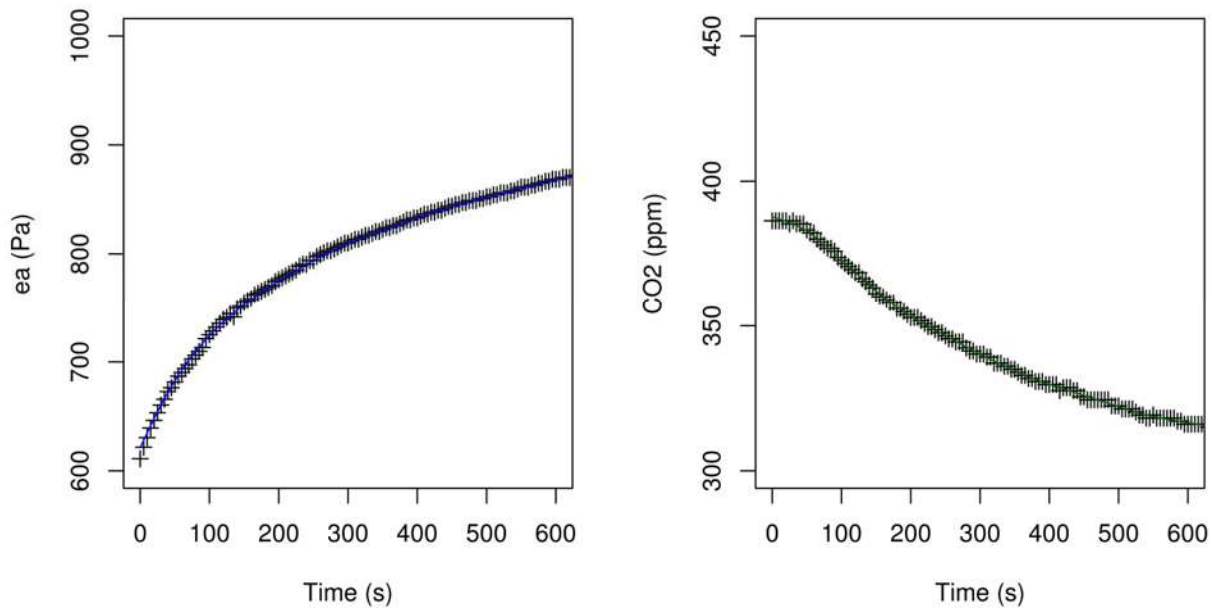


Figura 3: Ejemplo de evoluciones de presión parcial de vapor y concentración de CO_2 n un ciclo típico de medición (ejemplo proveniente del experimento de validación, el 19 de marzo, con un ciclo empezando a las 3:00)

Durante la fase de cierre de un ciclo de medición, la presión de vapor de agua y la concentración de CO_2 presentan las evoluciones mostradas en la figura 3. Para la presión de vapor de agua, se observó un incremento desde el inicio del ciclo de mediciones, y durante el transcurso del ciclo la tasa de incremento disminuye progresivamente, hasta estabilizarse (al final del ciclo ea aumenta de manera lineal). La razón de esta disminución podría ser que durante el ciclo ea se acerca a la saturación, reduciendo el gradiente de presión parcial entre

la hoja y la cámara y limitando la transpiración. La explicación más probable, sin embargo, es que el tiempo de respuesta del sensor de humedad aumenta considerablemente cuando el nivel de humedad se acerca a la saturación, haciendo que la pendiente de la curva sea limitada por la respuesta del sensor y no por la humedad del aire. Por otro lado, el hecho que la pendiente más alta sea registrada al inicio del ciclo de medición confirma que el tiempo de respuestas del sensor (5 a 15 segundos según el fabricante) es despreciable. Por lo tanto, la tasa de transpiración puede ser calculada a partir de la pendiente inicial (o del valor máximo de la pendiente). Para el CO₂, existe al inicio de las mediciones un periodo durante el cual los valores medidos de CO₂ fluctúan poco. Este periodo dura alrededor de 90 segundos para el CO₂, y se explica por el tiempo de respuesta del sensores: según los datos del fabricante, el sensor tiene un tiempo de respuesta (definido tiempo que tarda el sensor en detectar el 90% de un cambio instantáneo de concentración) de 120 segundos. Durante los minutos siguientes, la concentración de CO₂ disminuye a una tasa inicialmente constante, y que disminuye posteriormente. Esta disminución se debe probablemente a que, mientras disminuye la concentración de CO₂ en el aire en la cámara de medición también disminuye el gradiente de concentración que permite su absorción. Debido al tiempo de respuesta del sensor, la pendiente tiene que ser estimada una vez terminada la fase inicial transitoria, es decir alrededor de 90 segundos después del inicio del ciclo. Sin embargo, este tiempo puede fluctuar en función de la tasa de absorción, por lo que se decidió estimar la mayor pendiente observada durante el ciclo.

Validación

La evolución de temperaturas durante el ciclo día/noche fue muy diferente entre el MACsuino y el LI-COR 6400 (figura 4). Alrededor el medio día, la temperatura alcanzó 50 °C en el MACsuino contra menos de 40 °C en el IRGA LI- COR 6400. Al contrario, durante la noche fue inferior en el porómetro, con una diferencia de alrededor de 5 °C durante la primera noche y de 2.5 durante la segunda. Es probable que durante el día el IRGA LI- COR 6400 mantuvo la hoja a una temperatura inferior a la que hubiera tenido si hubiera sido expuesta directamente a la radiación solar.

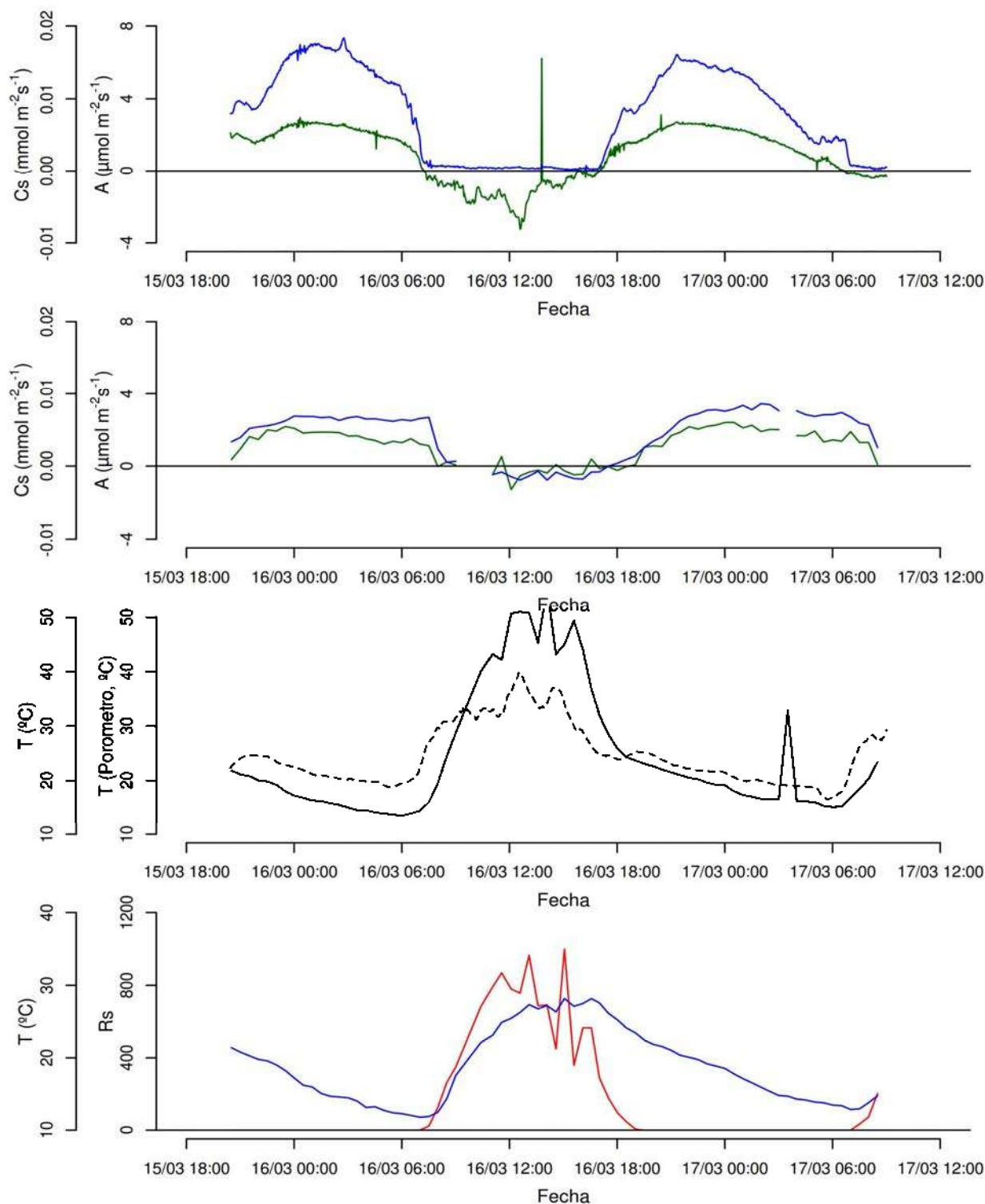


Figura 4. Dinámicas de conductancia estomática y asimilación observadas durante dos noches y un día, utilizando el IRGA LI-COR 6400 (A) o el MACsuino (B). Se muestran las temperaturas registradas en ambos sistemas (C) y la evolución de la temperatura y radiación solar (D) medidas por una estación meteorológica vecina durante el

tiempo del experimento.

En un experimento preliminar en el que se comparó la temperatura de las hojas medida con un termómetro IR con la del aire y la radiación solar (datos no presentados), se encontró que la temperatura de la hoja podía ser predicha bastante bien por la relación linear siguiente: $T_{Hoja} = T_{Aire} + 0.02 R_s$, donde las temperaturas se expresan en °C y la radiación en W. En las condiciones del experimento, esta relación predice una temperatura del alrededor de 50 °C al mediodía, similar a la que se midió en el porómetro. Al contrario, el cuerpo de aluminio del IRGA LI-COR 6400 probablemente reflejó la radiación solar, resultando en un menor calentamiento. Durante la noche, es difícil explicar que la temperatura hay sido inferior en el porómetro: Por un lado, su cuerpo de plástico no disipa el calor con tanta eficiencia como el aluminio del IRGA LI-COR 6400 y por otro los diferentes componentes del porómetro generan calor (a partir de las corrientes en el ventilador, el sensor de CO₂ y el sensor de humedad, se estima la potencia disipada alrededor de $(80 + 30 + 10) A \times 5V = 0.6 W$). Es posible que la temperatura más alta en el IRGA LI-COR 6400 también se deba a su cuerpo de aluminio, con una emisividad más baja que limitaría su enfriamiento en la noche.

Al haber sido medidos en condiciones diferentes de temperatura y en plantas diferentes, los datos de intercambio de gases obtenidos por los dos equipos no son directamente comparables entre sí. Además, al IRGA LI-COR 6400 mide el intercambio de gases por los dos lados de la hoja, mientras que el MACsuino únicamente el haz. En un experimento preliminar se contaron los estomas presentes en ambos lados de una hoja de agave (datos no presentados) y se encontró aproximadamente la misma densidad en ambos lados, lo que sugiere que participan en la misma proporción en al intercambio de gases para tomar en cuenta esta diferencia, en los datos presentados, la asimilación y conductancia estomática del IRGA LI-COR 6400 han sido divididos por 2.

A pesar todas estas diferencias, se observó, de manera general, un ciclo CAM parecido en ambas plantas (figura 4), con un cierre estomática prácticamente completo en el día y horas similares de cierre estomático en la mañana y de apertura en la tarde. Asimismo, la evolución de la absorción de CO₂ fue casi paralela a la de la conductancia estomática en ambos casos. Sin embargo, se observó en al IRGA LI-COR 6400 un pérdida de CO₂ durante el día, con un pico después de las 12:00, al contrario del MACsuino donde esta pérdida no se manifestó.

Los valores de absorción de CO₂ fueron muy comparables entre los dos sistemas: el periodo de fijación nocturna fue similar en ambos casos y los valores de asimilación fueron de alrededor de 2 y 2.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en el MACsuino y el IRGA LI-COR 6400 respectivamente. Al contrario, la conductancia estomática fueron alrededor del doble en el IRGA LI-COR 6400 que en el MACsuino (contra 3.5 $\text{mmol m}^{-1} \text{s}^{-1}$). Durante este experimento, la temperatura disminuyó hasta 12 °C al final de la noche. Es probable que temperaturas inferiores a 15 o 20 °C limiten la conductancia estomática, por lo que la mayor conductancia estomática en el IRGA LI-COR 6400 se podría deber a la temperatura más alta observada en este sistema. Una observación a favor de esta hipótesis es que durante la segunda noche, en que la temperatura del MACsuino fue mayor a la de la primera noche, la conductancia estomática también fue mayor (lo que no se observó en el IRGA LI-COR 6400 en que las temperaturas fueron similares durante las dos noches).

Ciclos de intercambio de gases durante el proceso de rehidratación

El MACsuino logro medir durante 15 días continuos, el intercambio de gases en las dos plantas aclimatadas al sol y a la sombra (figura 5). Al inicio de las mediciones las plantas mostraron poca actividad en su ciclo de intercambio de gases debido al estrés hídrico al que fueron sometidas antes del experimento (del 3 al 7 de marzo), posteriormente las plantas empezaron su proceso de rehidratación (a partir del 8 de marzo) por la lluvia continua durante dos días y riego asistido el día 8 y 15 de marzo. Desde el comienzo de la rehidratación las plantas tanto la de sol como la de sombra comienzan a recuperar su ciclo de intercambio de gases conforme pasan los días. En el caso de la conductancia estomática se observó una recuperación casi inmediata con la rehidratación e incluso en los días de lluvia (8 y 9 de marzo) mostró valores altos, probablemente el gel de sílice encargado de desecar un poco el aire que entra al sistema durante la lluvia absorbió mucha humedad. Y para la asimilación de CO₂ se observó una recuperación más lenta con forme las plantas se rehidataban contrario a la conductancia estomática, pero en general las dos plantas medidas exhibieron antes del riego escasa actividad (intercambio de gases) y al empezar la rehidratación mostraron una pronta recuperación en cuanto a su ciclo de intercambio de gases.

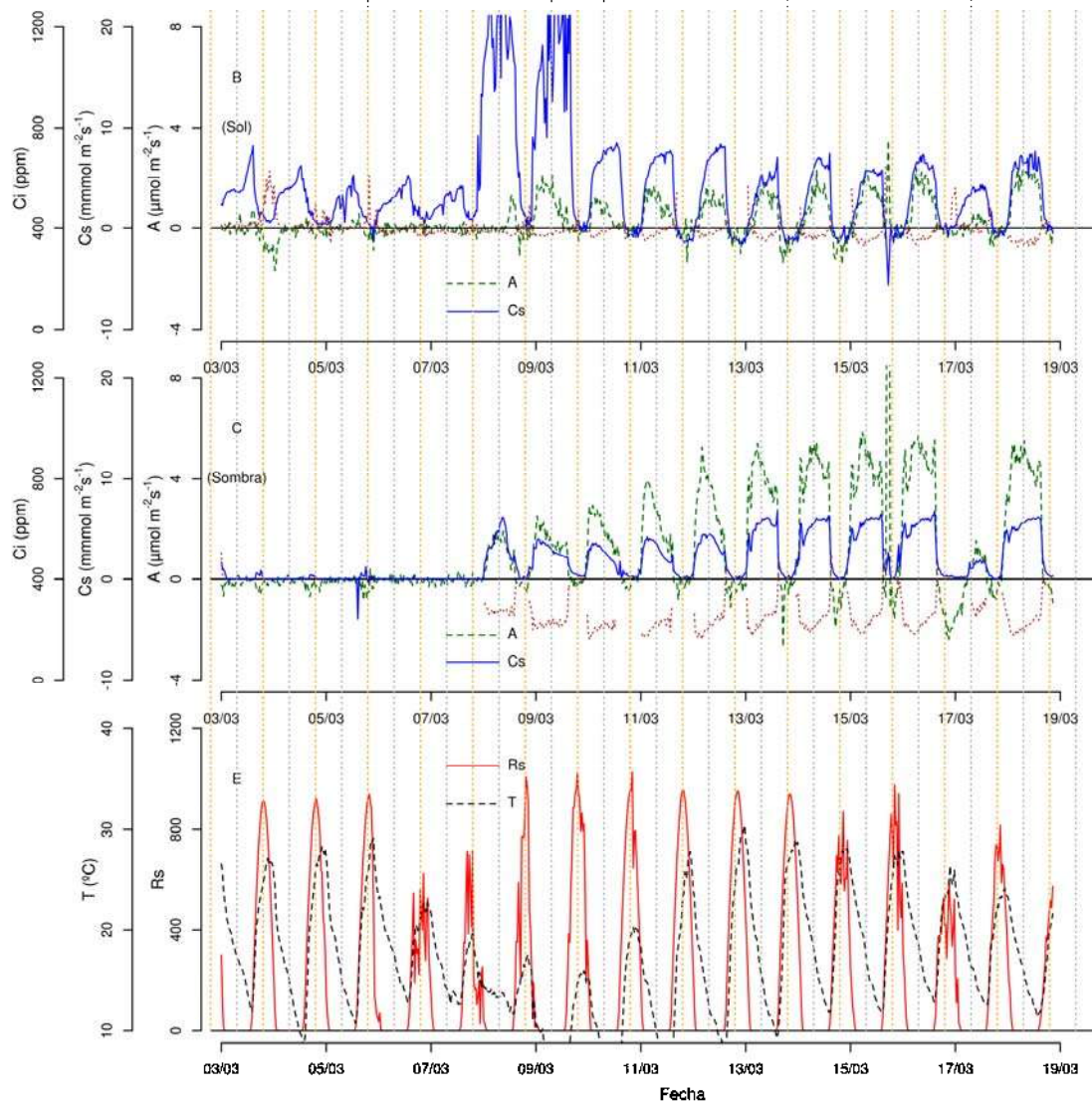


Figura 5: Conductancia estomática, absorción de CO₂ y concentración interna de CO₂ en la hoja medidos en dos plantas de *A. cupreata* (A: expuesta a la radiación solar, B: bajo malla sombra al 50%) durante 15 días. Al inicio del experimento las plantas estaban deshidratadas por no haber recibido riego ni lluvia durante 3 meses. Lluvias continuas durante 2 días, a partir de la noche del 8 de marzo, permitieron la rehidratación de las plantas.

Estas respuestas ya habían sido observadas en *A. fourcroydes* por Nobel (1985), en el que la planta en estrés hídrico redujó en un 99% la fijación de CO₂ y cierre estomático. Por otro lado la pronta recuperación también es una característica de las plantas con el metabolismo CAM.

En este mismo experimento el día 17 se colocó una doble malla sombra sobre las plantas en las que se continuaba midiendo con los MACsuinos, para ver la respuesta de las plantas ante condiciones de baja luminosidad y se observó la disminución de la asimilación

(alrededor del 90%) y conductancia estomática la noche posterior al sombreado. En este caso se sabe que la fijación nocturna de CO₂ depende en gran medida de la radiación recibida el día anterior, por lo que los resultados son coherentes.

Discusión y conclusiones

El sistema presentado en este artículo es, a nuestro conocimiento, el primer ejemplo de sistema de medición de fotosíntesis construido a partir de materiales económicos y fáciles de conseguir, y publicado bajo un esquema de diseño y código libre.

Aunque el experimento de validación no permitió corroborar una correspondencia exacta entre las mediciones del MACsuino y del equipo de referencia (IRGA LI-COR 6400), se obtuvieron valores comparables de absorción de CO₂. Hubo diferencias importantes en las mediciones de conductancia estomática, pero no se pueden atribuir con certeza a errores de mediciones o diferencias entre las plantas estudiadas. Un experimento en que se siguió el intercambio de gases durante 15 días mostró la confiabilidad del sistema y los datos obtenidos fueron coherentes con lo esperado.

Ventajas y limitaciones del MACsuino:

Limitación: sólo es utilizable en plantas de baja transpiración. En unos intentos de instalar el MACsuino sobre hojas de plantas C3, se observó rápidamente condensación en el sistema.

Ventajas: permite realizar mediciones de forma continua y automatizada durante varios días seguidos. Su bajo costo permite tener varios equipos y realizar mediciones al mismo tiempo en diferentes plantas. Y es fácil de usar.

Literatura citada

Long S. P, Farage P. K y Garcia R .L, 1996. Measurement of leaf and canopy photosynthetic CO₂, exchange in the field, Journal of Experimental Botany 304:1629- 1642.

Nobel P. S, 1985. PAR, water and temperature limitations on the productivity of cultivated Agave fourcroydes (henequen), Journal of Applied Ecology 22:157-173.

S.von Caemmer and G.D Farquhar, 1981. Some relations between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves, Planta 153:376-387.

R Development Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

Consultas de internet:

(<http://www.co2meter.com/collections/co2-sensors/products/s8-miniature-co2-sensor>), último acceso en junio del 2016.

(<http://www.geekfactory.mx/tienda/sensores/dht22-sensor-de-temperatura-y-humedad/>), último acceso en junio del 2016.

(<http://www.electronicaembajadores.com/datos/pdf1/mm/mmsv/mmsv001.pdf>) último acceso en junio del 2016.

(<http://www.arduino.cc/en/Main/ArduinoBoardMega2560>), último acceso en junio del 2016.

(<https://www.arduino.cc/en/Main/Software>), último acceso en junio del 2016.

(<https://www.r-project.org>), último acceso en junio del 2016.