

Aclimatización y crecimiento en vivero de plantas de piña (Ananas comosus (L.) Merr.) MD-2 procedentes de la propagación in vitro y su introducción en el sector campesino para la producción de semillas agámicas y frutos

Autoría principal

DrC. Romelio Rodríguez Sánchez¹, DrC. Carlos E. Aragón Abreu¹, DrC. Justo González Olmedo¹.

Otros autores

DrC. Oscar Concepción Laffitte¹, DrC. Ramón Santos Bermúdez¹, DrC. Maritza Escalona Morgado¹, MC. Ariel Villalobos Olivera¹, MC. Iris Capote Betancourt¹, Ing. René Rodríguez Escriba¹, Lic. Dariel López Hernández¹, Ing. Yaima Pino Legrat¹, Téc. Danilo Pina Morgado¹.

Colaboradores

Ing. Rosa Bequer², Ing. Lupe López², José Palenzuela², Lázaro Rodríguez², Laudelim Guillarte²

Entidad ejecutora principal

¹Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila. Cuba. Carretera a Morón, km 9, CP 69450. Ciego de Ávila. Cuba.

Entidades participantes

²Asociación Nacional de Agricultores Pequeños (ANAP)

Autor para correspondencia

DrC. Romelio Rodríguez Sánchez
Carretera a Morón, km 9, CP 69450. Ciego de Ávila, Cuba.
Teléfono: 33 225968 Fax: 33 266340
romelio@bioplasmas.cu

Aporte científico de cada autor al resultado

- ✓ **DrC. Romelio Rodríguez Sánchez** (14%): Investigador principal quien coordinó y dirigió la investigación. Jefe del proyecto CITMA Nacional asociado al Proyecto de Desarrollo endógeno auspiciado por la República Bolivariana de Venezuela y Cuba. Participó activamente en el diseño de los experimentos. Coordinó el trabajo con los campesinos para la instrucción de las plantas a las condiciones de campo y de producción de frutas, así como la interacción con otras instituciones como la empresa AgroFAR.
- ✓ **DrC. Carlos E. Aragón Abreu** (14%): Participó activamente en el diseño de los experimentos que condujeron al procedimiento para establecer las novedosas técnicas experimentales y los análisis bioquímicos y fisiológicos de la respuesta de las plantas a las condiciones ambientales durante el proceso de aclimatización. Realizó además el análisis estadístico e interpretación de todos los resultados.
- ✓ **DrC. Justo González Olmedo** (14%): Uno de los gestores principales de la coordinación del trabajo dentro del colectivo como jefe de laboratorio. Coordinó todas las actividades generales de los estudios y participó en el diseño de los experimentos, así como en la evaluación e interpretación de los resultados.

- ✓ DrC. **Oscar Concepción** (9%): Uno de los gestores principales de la coordinación del trabajo dentro del colectivo como director general del Centro de Bioplantas. Coordinó todas las actividades generales de los estudios y participó en el diseño de los experimentos, así como en la evaluación e interpretación de los resultados.
- ✓ DrC. **Ramón Santos** (9%): Uno de los gestores principales de la coordinación del trabajo dentro del colectivo como iniciador y principal gestor del Proyecto de Desarrollo endógeno auspiciado por la República Bolivariana de Venezuela y Cuba.. Coordinó todas las actividades generales de los estudios y participó en el diseño de los experimentos, así como en la evaluación e interpretación de los resultados.
- ✓ DrC. **Maritza Escalona** (8%): Participó en la coordinación del trabajo dentro del colectivo. Coordinó todas las actividades generales de los estudios y participó en el diseño de los experimentos, así como en la evaluación e interpretación de los resultados.
- ✓ MC. **Ariel Villalobos** (7%). Participó activamente en el diseño de los experimentos y los análisis bioquímicos y fisiológicos de la respuesta de las plantas a las condiciones ambientales durante el proceso de aclimatización y vivero. Realizó además el análisis estadístico e interpretación de todos los resultados relacionados con el estudio en fase de vivero y campo.
- ✓ MC. **Iris Capote** (5%): Especialista técnico en el Cultivo de Células y Tejidos, participó en el diseño y ejecución de los experimentos relacionados con el cultivo *in vitro*. De igual forma, intervino en la evaluación de los resultados y en su interpretación.
- ✓ Ing. **René Rodríguez** (5%): Especialista técnico en los análisis bioquímicos, participó en el diseño y ejecución de los experimentos relacionados con la fisiología y bioquímica de las plantas. De igual forma, intervino en la evaluación de los resultados y en su interpretación.
- ✓ Lic. **Dariel López** (5%): Especialista técnico en los análisis bioquímicos, participó en el diseño y ejecución de los experimentos relacionados con la fisiología y bioquímica de las plantas. De igual forma, intervino en la evaluación de los resultados y en su interpretación.
- ✓ Ing. **Yaima Pino** (5%): Estuvo responsabilizada del trabajo en el área de adaptación y cuidado de las plantas en condiciones *ex vitro*. Participó activamente en la aclimatización de las 5 especies y en el desarrollo de los ensayos relacionados con el rejuvenecimiento de material vegetal adulto.
- ✓ Téc. **Danilo Pina Morgado** (5%): Estuvo responsabilizado de la búsqueda de material vegetal para la realización de los experimentos *in vitro*. Participó activamente en la aclimatización de las especies y en el desarrollo de los ensayos relacionados con el rejuvenecimiento de material vegetal adulto.

Resumen

La piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) es uno de los principales frutales del mundo, es cultivada con el fin de satisfacer necesidades alimenticias de la población y constituye un importante renglón para la producción de conservas y venta de fruta fresca. La provincia de Ciego de Ávila es líder en la producción de piña y más de la variedad MD-2. Las vitroplantas de piñas crecidas en condiciones *in vitro*, en su tránsito por las condiciones de aclimatización y vivero, han demostrado la capacidad de adaptar su fenotipo a las condiciones de estas dos fases importantes para la producción de plantas. El presente trabajo se enmarcó en determinar los aspectos morfológicos y fisiológicos en vitroplantas de piñas MD-2 durante las etapas de aclimatización, vivero y campo. El manejo de las mismas en estas condiciones es importante para obtener plantas de calidad para su posterior siembra en campo. Además se validó la producción de los frutos en el sector campesino de áreas de la provincia. De manera

general los resultados que se presentan están avalados en cuanto a los aspectos de originalidad e impacto científico por tres publicaciones en revistas de alto impacto a nivel internacional. Los aspectos sociales y/o económicos que respaldan la investigación se aprecian claramente en la integración con los campesinos de la región, la asesoría técnica y la introducción de las semillas biotecnológicas para la producción de propágulos vegetativos y frutos, así como la interacción con instituciones de fuera de la provincia (AgroFAR) donde se han realizado transferencias de la tecnología y actualmente se encuentran en fase de producción de semillas de piña por vía biotecnológica. Las investigaciones se vincularon de forma efectiva en lograr aportes socio-económicos relevantes y acorde con los lineamientos del país (126, 195 y 200), fundamentalmente en la producción de semilla de alta calidad genética, sustitución de importaciones y producción de rublos exportables. Todos estos elementos respaldan la presente propuesta a Premio Nacional de la Academia de Ciencias de Cuba por su Impacto Científico.

Comunicación Corta

La provincia de Ciego de Ávila es líder en la producción de piña y más de la variedad MD-2. Esta variedad posee características de gran importancia económica, como son los altos rendimientos y la calidad de la fruta. El cultivo de la piña se caracteriza por presentar un incremento en los últimos 5 años, reportándose como el país más productos Brasil seguido por Filipina y Costa Rica (FAOStat, 2013). La piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) es uno de los principales frutales del mundo, es cultivada con el fin de satisfacer necesidades alimenticias de la población y constituye un importante renglón para la producción de conservas y venta de fruta fresca. La reproducción asexual de la piña en condiciones convencionales no soporta la demanda exigida para la producción y por ello se hace necesaria la introducción de las técnicas de Biotecnología Vegetal. Dentro de las técnicas con mayor auge en los últimos tiempos se encuentra el uso de los Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) con buenos resultados en lo que respecta a calidad de las plantas obtenidas (Read 2007; Arencibia et al., 2008; Shu-Han y Der-Ming 2008; Aragón et al., 2012; Watt 2012; Aragón et al., 2013; Aragón et al., 2014). Es por ello que se tuvo como objetivo lograr una producción a ciclo cerrado de las plantas de piña obtenidas por técnicas biotecnológicas hasta completar la fase de producción de hijos y frutos en campo. Para lograr estos objetivos se tuvo en cuenta desarrollar una interacción efectiva entre varias instituciones del territorio, empresas y campesinos productores de piña.

Posterior al cultivo in vitro en los BIT, las plantas de piña entraron en la fase de aclimatización en dos condiciones ambientales (C3/CAM) para demostrar los cambios en las características morfológicas y fisiológicas que les permiten transitar por esta fase altamente estresante. La aclimatización como fase final del protocolo de propagación y fase anterior a la salida de las plantas para las condiciones de vivero y posteriormente campo, requiere de una atención particular y experimentación para evitar grandes pérdidas de plantas y con ello un desbalance negativo en el balance económico de todo el proceso. El conjunto de resultados (Figura 1) en esta fase permitió obtener dos publicaciones seriadas en la revista *Plant Cell Reports* (31: 757-769, 2012; DOI: 10.1007/s00299-013-1493-3; 2013) y la presentación en los Congresos Internacionales Botanikertagun (Alemania, 2011) y BioVeg (Cuba, 2011), lo cual avala la calidad

científica de los resultados y el impacto y aporte al conocimiento respaldado por el criterio de especialistas nacionales e internacionales. Se logró establecer las condiciones para cambiar el metabolismo C3 a CAM, todo esto relacionado los balances de la eficiencia del uso del agua en las plantas y de favorecer procesos como el crecimiento y enraizamiento de las mismas. Para el caso de las vitroplantas de piña MD-2 obtenidas por técnicas de cultivo in vitro, las condiciones de cultivo de tipo C3 pueden favorecer el desarrollo vegetativo con la correcta emisión de las raíces de las mismas y alcanzar su estado adulto de forma temprana y así lograr obtener los frutos en un menor periodo de tiempo en comparación con el cultivo tradicional.

De carácter más básico se obtuvieron resultados en cuanto a la caracterización del proteoma (Figura 1), donde se observó que bajo similares condiciones de trabajo en el laboratorio el tratamiento de plantas expuesto a condiciones más estresantes (CAM) presentó mayor diversidad y contenido de proteínas. Varias de las proteínas diferenciales fueron seleccionadas y cortadas del gel para su análisis e identificación. Dentro de ellas se identificaron dos correspondientes al fotosistema II (PSII), la OEE1 y la OEE2 en diferentes iso-formas. Estas proteínas son las responsables por la protección y disipación de la energía en el PSII por su capacidad de interactuar con las diferentes formas que puede presentar el oxígeno y que gran parte de ellas pueden ser nocivas para las reacciones metabólicas a nivel de los cloroplastos y en otros compartimentos celulares (Murakami *et al.*, 2002). Además las variaciones en la composición e integridad de la subunidad mayor de la RubisCO es un elemento clave cuando se quiere estudiar los niveles de estrés a los que puede estar sometido una planta y las reacciones de fijación de CO₂. Para las plantas de piña se observó que las plantas en condiciones CAM presentaron mayor degradación de esta subunidad con mayor cantidad de péptidos de diferentes puntos isoeléctricos y pesos moleculares identificados en reacción de Western-Blot en geles de dos dimensiones.

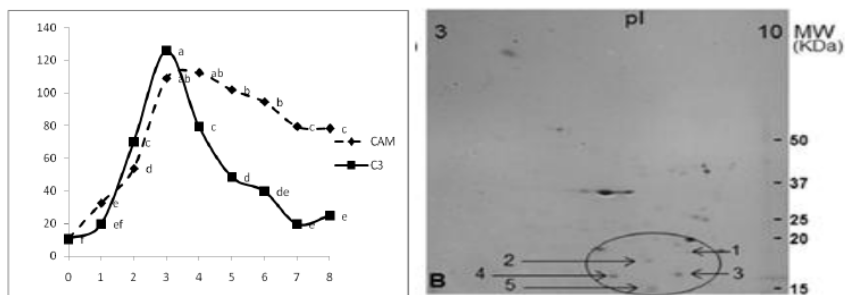


Figura 1. Concentración de almidón en las hojas de las plantas de piña crecidas en dos condiciones de aclimatización diferentes (C3; CAM) y Proteínas totales de plantas de piña en condiciones CAM representadas en geles bidimensionales y teñidos con reactivo de plata. Medias con letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba Tukey, $p \leq 0.05$). Cada dato representa la media para $n=9$.

Toda la identificación de proteínas y su posterior validación por los niveles de expresión de los respectivos genes (RT-qPCR) por técnicas de punta en biología molecular permitió establecer un patrón molecular del comportamiento para las plantas de piña que como especie con metabolismo facultativo C3-CAM puedan ser caracterizadas y enmarcadas en los respectivos metabolismos, según las condiciones ambientales anteriormente descritas y con los elementos fisiológicos distintivos de cada uno de los metabolismos anteriormente expuestos.

Los resultados correspondientes a la fase de vivero estuvieron enfocadas a realizar experimentos que aportaran un adecuado manejo agrotécnico para lograr altas tasas de supervivencia en esta fase y llevar un material vegetal adecuado a condiciones de campo, cuando la semilla que se emplea es a partir de técnicas biotecnológicas. Uno de los elementos abordados fue el manejo de los sustratos, su cantidad y calidad para el correcto crecimiento de las plantas (Figura 2). Desde el momento inicial de la fase se evaluaron diferentes variables morfo-fisiológicas como las características morfológicas propias de las plantas como la masa de la hoja "D" y otras fisiológicas como la actividad fotosintética. El porcentaje de supervivencia (%) es reconocido como una de las variables de mayor importancia cuando se evalúa el comportamiento de plantas en las diferentes fases del proceso, el mismo demuestra el grado de adaptación de las vitroplantas a los cambios al que se exponen durante esta etapa. Al parecer el incremento de sustrato no incide positivamente en aumentar la altura de las plantas, la emisión de un nuevo y autotrófico follaje y la longitud de la hoja "D", al menos durante los 45 días en que se evaluaron las plantas. Estos resultados están estrechamente relacionados con los valores de clorofilas, transpiración y fotosíntesis alcanzados en esta etapa.

El constante aumento del crecimiento de plantas de piña durante la etapa de viveros garantiza el éxito de la técnica de micropropagación, ya que se reconoce que es imprescindible asegurar una mejor calidad del material vegetal que se utilizará como semilla en las plantaciones piñeras. Elementos como la mejor actividad fotosintética, mejor transpiración y a los mayores valores alcanzados en las variables morfológicas evaluadas en el experimento respaldan estos resultados. El volumen de sustrato de 356.26 cm³ difirió significativamente de forma positiva en comparación con el volumen de 222.59 cm³ en varias de las variables morfológicas evaluadas. **[Publicado en revista Internacional de Alto Impacto Ciencia e Agrotecnología 36: 624-630 (2012) y presentado en los congresos Internacionales XIV Congreso Brasileiro de Fisiología Vegetal (Brasil, 2013) y el Congreso de Biotecnología Vegetal del IBP (Cuba, 2014)].**

Una vez entregadas a los productores las plantas de piña procedentes de la fase de vivero, se procedió a la experimentación en condiciones de campo bajo el régimen de cultivo de campesinos asiduos al trabajo con plantas de piña y procedentes de la formación universitaria en Ingenieros Agrónomos de la Universidad de Ciego de Ávila.

La planta de piña MD-2 es de rápido crecimiento que resulta de un ciclo de producción más corto; además los rendimientos de producción y de tamaño de la fruta son mayores y es una fruta muy dulce y jugosa, aunque se reconoce que es más susceptible de daño mecánico y a la *Phytophthora* que la Champaka (Bartholomew, 2009; Loelliet *et al.*, 2011). En la evaluación de la mortalidad realizada a los 30 días posteriores a la fecha de la siembra se habían cuantificado apenas 242 plantas muertas (4,85%) por diversas causas (*Phytophthora*, suelo en el corazón de la planta y por daños en el momento de la siembra) lo que permite conjeturar que los tratamiento de protección fitosanitarias empleados en estos primeros momentos fueron eficientes demostrado por el 95,15 % de supervivencia alcanzado por las plantas en esos estresantes momentos. Cuando se evaluó esta variable a los 60 y 90 días de permanecer las plantas en condiciones de producción y ambiente natural, se pudo apreciar que los porcentajes de supervivencia aún se mantenían elevados (93,23 y 90,19 % respectivamente). Estos resultados indican la rápida y favorable adaptación que tienen las plantas de piña cuando son sometidas a nuevas y estresantes condiciones ambientales (Figura 2).

Desde el momento en que expusieron las plantas a las drásticas condiciones de ambiente natural (mayor intensidad de luz y temperatura) presentaron apariencia blanquecina

semejante a las quemaduras típicas de esta especie, aunque en este caso no provocaron la muerte. También se observó amarillez en las hojas de las plantas propia de la desnaturalización de las clorofilas, síntomas del proceso de fotoinhibición. Se pudo observar una pronta recuperación de estos síntomas ya en las evaluaciones realizadas posteriormente, lo que indica la pronta adaptación y rápida recuperación a los cambios ambientales característicos en las plantas CAM. En la evaluación que se realizó a los 90 días de permanecer las plantas en condiciones de campo, no se observaron diferencias significativas estadísticas en la mayoría de las variables con respecto a los 60 días, solo en el número de raíces se cuantificaron incrementos que marcan diferencias estadísticas. Es de destacar como ya a partir de la evaluación realizada a los 120 días se observa un incremento constante y significativa de la masa fresca luego que las plantas logran adaptarse a las nuevas condiciones ambientales, para ellos todas las variables relacionadas con la longitud (raíces, hoja "D" y de la planta) aportaron significativamente al incremento de esta variable (Figura 2). Los resultados muestran como las plantas de piña se recuperaron rápidamente del estrés que le impone el cambio de ambiente y de condiciones edafo-climáticas al ser trasplantadas a campo. Por lo que es preciso enfocar la atención en atenuar los efectos negativos de las condiciones estresantes en áreas a campo abierto para que las plantas mantengan un constante crecimiento y esto se logra con un adecuado manejo agrotécnico del cultivo. **[Publicado en revista Internacional de Pineapple News 19: 24-35 (2012) y expuesto de forma oral en el FORUM Provincial (2012) y en el Evento Internacional BioVeg (Cuba, 2013)].**



Figura 2. Volúmenes de sustrato y vitroplantas de piña MD-2 luego de 45 días de plantadas en condiciones de campo.

Además de los mencionados aportes al conocimiento y el impacto científico, las investigaciones se vincularon de forma efectiva en lograr aportes socio-económicos relevantes y acorde con los lineamientos del país (126, 195 y 200), fundamentalmente en la producción de semilla de alta calidad genética, sustitución de importaciones y producción de rublos exportables.

Los resultados de este trabajo han permitido elevar los niveles de conocimiento no solo en los campesinos y su familia, sino también que ha colaborado grandemente en la formación de capital humano con mayor calificación académica de instituciones en la provincia y fuera de la misma dentro de las que se encuentran la Empresa Agropecuaria de la FAR (AGROFAR) en la Biofábrica de Santo Domingo en Villa Clara. Los que se recogen en cinco tesis de maestría y una de doctorado. Estos resultados forman parte del Proyecto de Desarrollo endógeno auspiciado por la República Bolivariana de Venezuela y Cuba en el marco de la Cooperación del ALBA.

Referencias

- [1] Alvard, D.; Cote, F.; Teisson, C. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 32: 55-60.
- [2] Aragón, C.; Escalona, M.; Rodríguez, R.; Cañal, M.; Capote, I.; Pina, D.; González, O. 2009. Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors *In Vitro Cell.Dev.Biol.*—Plant DOI 10.1007/s11627-009-9246-2.
- [3] Aragón, C.; Carvalho, L.; González, J.; Escalona, M.; Amancio, S. 2009. Sugarcane (*Saccharum* sp. Hybrid) propagated in headspace renovating systems shows autotrophic characteristics and develops improved anti-oxidative response. *Tropical Plant Biology*. 2: 38-50.
- [4] Aragón, C.; Carvalho, L.; González, J.; Escalona, M.; Amancio, S. 2010. Ex vitro acclimatization of plantain plantlets micropropagated in temporary immersion bioreactor. *Biologia Plantarum*. 54 (2): 237-244.
- [5] Aragón, C.; Carvalho, L.; González, J.; Escalona, M.; Amancio, S. 2012 The physiology of ex vitro pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions. *Plant Cell Rep* 2012. 31:757–769.
- [6] Aragón, C.; Pascual, P.; González, J.; Escalona, M.; Carvalho, L.; Amancio, S. 2013. The physiology of ex vitro pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions: Proteomic and transcriptomic profiles. *Plant Cellular Report*. DOI: 10.1007/s00299-013-1493-3.
- [7] Aragón, C.; Sánchez, C.; González, O.; Escalona, M.; Carvalho, L.; Amancio, S. 2013. Reprogramming of carbohydrate metabolism during plantain (*Musa AAB*) ex vitro acclimatization is more efficient in plantlets propagated in Temporary Immersion Bioreactors (TIB). *Biologia Plantarum* (in press).
- [8] Arencibia, A.; Bernal, A.; Yang, L.; Cortegaza, L.; Carmona, E.; Pérez, A.; Hu, C.; Li, Y.; Zayas, C.; Santana, I. 2008. New role of phenolpropanoid compounds during sugarcane micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *Plant Science*. 175:487- 496.
- [9] Borland, A.; Maxwell, K.; Griffiths, H. 2000. Ecophysiology of plants with cassulacean acid metabolism. In "Photosynthesis: physiology and metabolism". (Eds R Leegood, T Sharkey, S von Caemmer). (Kluwer Academic Publishers: Dordrecht).583-600.
- [10] Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254 doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.

- [11] Carvalho, L.; Osorio, M.; Chaves, M.; Amancio, S. 2001. Chlorophyll fluorescence as an indicator of photosynthetic functioning of in vitro grapevine and plantlets under ex vitro acclimatization. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 67: 271-280.
- [12] Chang, S.; Puryear, J.; Cairney, J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep* 11:113-116. doi:10.1007/BF02670468.
- [13] Desjardins, Y. 2007. How “Micropropagation-Omics” can contribute to a better understanding of phenomena taking place in plant tissue culture. *Acta Hort.* 748: 39-54.
- [14] Escalona, M.; Lorenzo, J.; González, B.; Daquinta, M.; Borroto, C.; González, J.; Desjardins, Y. 1999. Pineapple micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell. Rep.* 18: 743-748.
- [15] Esquivel, M.; Ferreira, R.; Teixeira, A. 1998. Protein degradation in C3 and C4 plants with particular reference to ribulose biphosphate carboxylase and glycolate oxidase. *J Exp Bot* 322:807-16.
- [16] Etienne, E.; Berthouly, M. 2002. Temporary Immersion Systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 69: 215-231.
- [17] FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2011. FAO statistic division. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> Accessed May 20, 2013.
- [18] Ferreira, R.; Franco, E.; Teixeira, A. 1996. Covalent dimerization of ribulose biphosphate carboxylase subunits by UV radiation. *Biochem J.* 318:227-234.
- [19] Fila, G.; Badeck, F.; Meyer, S.; Ceroviv, Z.; Ghashghaie, J. 2006. Relationships between leaf conductance to CO₂ diffusion and photosynthesis in micropropagate grapevine plants, before and after ex vitro acclimatization. *J. Exp. Bot.* 5711: 2687- 2695.
- [20] Kozai, T.; Kubota, C. 2001. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. *J. of Plant Res.* 1116: 525-537.
- [21] Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the heat of bacteriophage T4. *Nature* 227:680.685. doi:10.1038/227680a0.
- [22] Mota, C.; Alcaraz, C.; Iglesias, M.; Martínez, M.; Carvajal, M. 2011. Investigación sobre la absorción de CO₂ por los cultivos más representativos de la región de Murcia.CSIC. 6-927.
- [23] Murakami, R.; Ifuku, K.; Takabayashi, A.; Shikanai, T.; Endo, T.; Sato, F. 2002. Characterization of an *Arabidopsis thaliana* mutant with impaired psbO, one of two genes encoding extrinsic 33. kDa proteins in photosystem II. *FEBS Lett.* 523:138-142.
- [24] Nievola, C.; Kraus, J.; Freschi, L.; Souza, B.; Mercier, H. 2005. Temperature determines the occurrence of CAM or C3 photosynthesis in pineapple plantlets grown in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 41:832–837.

- [25] Pérez, C. 2005. Técnicas estadísticas con SPSS 12. Aplicaciones al análisis de datos. Pearson Educación S. A. España. (Ed.). 10-85.
- [26] Pospíšilová, J.; Catsky, J.; Sesták, Z. 1997. Photosynthesis in plant cultivated in vitro. In: Passaraki, M. (ed.). Handbook of photosynthesis. Kluwer Acad. Publ.. Netherland, ND. 525-540.
- [27] Pospisilova, J.; Synkova, D.; Haisel, D. 2009. Effect of abscisic acid on photosynthetic parameters during ex vitro transfer of micropropagated tobacco plantlets. Biol. Plantarum. 53: 11-20.
- [28] Pospisilova, J.; Synkova, D.; Haisel, D.; Semoradova, S. 2007. Acclimatization of plantlets to ex vitro conditions: Effect of air humidity, irradiance, CO₂ concentration and abscisic acid (a review). Acta Hort. 748: 29-38.
- [29] Ramagli, L. 1999. Quantifying protein in 2D PAGE solubilization buffers. In: Link AJ (ed) Methods in molecular biology: 2D proteome analysis protocols. Totowa, NJ: Humana Press.112.
- [30] Read, P. 2007. Micropropagation: Past, present and future. Acta Hort 748:17-28.
- [31] Shu-Han, Y.; Der-Ming, Y. 2008. In vitro leaf anatomy, ex vitro photosynthetic behaviours and growth of *Calathea orbifolia* (Linden) Kennedy plants obtained from semisolid medium and temporary immersion systems. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 93:201-207.
- [32] Simonton, W.; Robacker, C.; Krueger, S. 1991. A programmable micropropagation apparatus using cycled liquid medium. Plant Cell, Tiss. Org Cult. 27: 211-218.
- [33] Teisson, C.; Alvard, D. 1995. A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: temporary immersion. In: Terzi, M.; Celia, R.; Falavigna, A. . (eds.). Current issues in plant molecular and cellular biology. Netherland Kluwer Academic Publisher. Netherlandpp. 105-110.
- [34] Van Huylenbroeck, J.; Piqueras, A.; Debergh, P. 2000. The evolution of photosynthesis capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated *Calathea* plants. Plant Sci. 155: 59-66.
- [35] Watt, M. 2012. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. African Journal of Biotechnology 11:14025-14035.
- [36] Weise, S.; Van Wijk, K.; Sharkey, T. 2011. The role of transitory starch in C₃, CAM, and C₄ metabolism and opportunities for engineering leaf starch accumulation. J Exp Bot 62:3109.3118. doi:10.1093/jxb/err035.
- [37] Wilson, M.; Greenberg, B. 1999. Tryptophan photolysis leads to a UVB-induced 66 kDa photoproduct of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) in vitro and in vivo. Photochem. Photobiol 70:49-51.

- [38] Ziv, M. 1995. In vitro acclimatization. In: Aitken-Christie, J.; Kozai, T.; Smith, M. L. (eds.). Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 493-516.

Publicaciones

- ✓ Aragón, C.; Carvalho, L.; González, J.; Escalona, M.; Amâncio, S. **2012**. The physiology of *ex vitro* pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions. **Plant Cell Report** 31: 757-769.
- ✓ Aragón, C.; Pascual, P.; González, J.; Escalona, M.; Carvalho, L.; Amâncio, S. **2013**. The physiology of *ex vitro* pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions: Proteomic and transcriptomic profiles. **Plant Cell Report**. DOI: 10.1007/s00299-013-1493-3.
- ✓ Villalobo, A.; González, J.; Santos, R.; Rodríguez, R. **2012**. Morpho-physiological changes in pineapple plantlets (*Ananas comosus* (L.) Merr.) 'MD-2' during acclimatization. **Ciencia e Agrotecnología** 36: 624-630.
- ✓ Villalobo, A.; González, J.; Calderón, E.; Santos, R.; Rodríguez, R. **2012**. Effects of Substrate Volume and Foliar Fertilization on 'MD-2' Pineapple Plantlets. **Pineapple News** 19: 30.
- ✓ Villalobo, A.; González, J.; Santos, R.; Rodríguez, R. **2012**. Effects of Culture System on Morphological Changes in 'MD-2' Pineapple Plantlets. **Pineapple News** 19: 31-35.
- ✓ Rodríguez, R.; Villalobo, A.; Pino, Y.; Concepción, O.; Martínez, E.; González, J.; Santos, R. 2012. Rapid Introduction of 'MD-2' Pineapple Using Micropropagation. **Pineapple News** 19: 24-35.
- ✓ Rodríguez, R.; Becquer, R.; Pino, Y.; Rodríguez, R.; López, D.; González, J. 2014. Introduction of Pineapple Vitroplants to Field Conditions in Collaboration with Farmers. Preliminary Results. **Pineapple News** 20: 51-56.
- ✓ Pino, Y.; Concepción, O.; Santos, R.; González, J.; Rodríguez, R. 2014. Effect of Previcur® Energy Fungicide on MD-2 Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) Plantlets During the Acclimatization Phase. **Pineapple News** 21: 24-36.
- ✓ Rodríguez, R.; López, D.; Aragón, C.; Becquer, R.; Pino, Y.; Garza, Y.; Podesta, F.; González, J.; Rodríguez, R. 2014. CAM Metabolic Changes of "MD-2" Pineapple Grown Under High and Low Light. **Pineapple News** 21: 27-34.