



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**CARACTERIZACIÓN DE ALGUNOS ASPECTOS
FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DEL MUSGO
Pleurozium schreberi RELACIONADOS CON SU
CAPACIDAD DE TOLERANCIA A LA
DESHIDRATACIÓN**

LUIS CARLOS MONTENEGRO RUIZ

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Agronomía, Escuela de Posgrados
Bogotá, Colombia

2011

**CARACTERIZACIÓN DE ALGUNOS ASPECTOS
FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DEL MUSGO *Pleurozium
schreberi* RELACIONADOS CON SU CAPACIDAD DE
TOLERANCIA A LA DESHIDRATACIÓN**

LUIS CARLOS MONTENEGRO RUIZ

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Ciencias Agropecuarias

Directora:

Doctora Luz Marina Melgarejo Muñoz
Profesora Departamento de Biología

Línea de Investigación:

Fisiología de Cultivos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Agronomía, Escuela de Posgrados
Bogotá, Colombia

2011

A mis padres Antonio y María
Mis hermanos Rommel y Camila
Mis sobrinos Laura, Gabriel y María Belén

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, por la oportunidad de aprendizaje y formación.

A mis padres Antonio y María por su apoyo incondicional.

A la Dra. Luz Marina Melgarejo Muñoz, por la dirección de este trabajo, su apoyo y enseñanzas.

A la Dirección de Investigación Sede Bogotá, por la financiación.

Al Sistema de Parques Naturales Nacionales; Parque Nacional Natural Chingaza por permitir el acceso para realizar la investigación.

A los doctores Javier Martínez Abaigar, Encarnación Núñez y Rafael Tomás, Laboratorio de Fisiología Vegetal, Universidad de La Rioja – España

A la profesora Martha Chaparro de Valencia

Al Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia.

Al Laboratorio de Cultivo de Algas, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia.

Al Dr. Enrique Peña, Laboratorio de Biología Vegetal, Universidad del Valle.

Al Dr. Mario Velásquez, Laboratorio de Procesos Bioquímicos, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia.

A la Facultad de Ciencias y al Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia.

A Andrés Barón, Nubia Orjuela, Hugo Martínez y Giovanni García, y todos los auxiliares de campo.

A mis amigos, compañeros y estudiantes.

Resumen

Los musgos pueden sobrevivir períodos prolongados de tiempo con contenidos hídricos internos muy bajos. Se estudiaron algunas adaptaciones de tolerancia a la deshidratación del musgo *Pleurozium schreberi* en la época seca del Páramo de Chingaza – Colombia, y bajo condiciones de déficit hídrico en laboratorio. Se encontró que durante el déficit hídrico se detiene la fotosíntesis y disminuye la respiración a valores cercanos a cero; aumenta el contenido de proteínas totales solubles y la actividad específica catalasa; aumenta la concentración de ABA cuando el CHR es de 50 % ps o menos, como señal de estrés; a su vez aumenta el contenido de azúcares totales solubles y sacarosa. En el momento de la rehidratación restaura los procesos de fotosíntesis y respiración inmediatamente y retorna a valores de tasas normales a las dos horas de iniciada la rehidratación; adicionalmente, aumenta la actividad enzimática específica peroxidasa; y el contenido de prolina. Se encontró que los azúcares reductores y entre ellos la fructosa no presentan modificación.

Palabras clave: Ácido abscísico ABA, azúcares, catalasa, ecofisiología, fotosíntesis, fluorescencia de la clorofila, fructosa, neotrópico, páramo, peroxidasa, *Pleurozium schreberi*, respiración, sacarosa, tolerancia a la deshidratación.

Abstract

Mosses can survive long periods of time with very low internal water content. We study the adaptations of desiccation tolerance in the moss *Pleurozium schreberi* in the dry season in Páramo de Chingaza - Colombia, and under drought conditions in the laboratory. It was found that during water deficit it stops the photosynthesis and the respiration decreases to near zero; increasing the total soluble protein content and specific enzymatic activity of catalase; increases the concentration of ABA when the CHR is 50% ps or less sign of stress; increases the total soluble sugars and sucrose. At the time of rehydration restores the processes of photosynthesis and respiration immediately and the rates returned to normal values two hours after starting rehydration and increase the specific enzymatic activity of peroxidase, and proline content increases. We found that reducing sugars including fructose no modification.

Keywords: ABA, catalase, ecofisiology, desecation tolerance, fluorescence of chlorophyll, fructose, neotropics, páramo, peroxidase, *Pleurozium schreberi*, photosynthesis, respiration, sucrose, sugar.

CONTENIDO

	Pág.
Resumen	V
Lista de figuras	X
Lista de tablas	XV
Introducción	1
1. Marco conceptual	5
1.1 LOS BRIÓFITOS	5
1.2 TOMA Y CONDUCCIÓN DEL AGUA EN BRIÓFITOS.....	7
1.3 LA ESTRATEGIA POIQUILOHÍDRICA	10
1.4 TOLERANCIA A LA DESHIDRATACIÓN EN BRIÓFITOS.....	11
2. Contenido hídrico de <i>Pleurozium schreberi</i> durante época seca en páramo y bajo condiciones controladas de déficit hídrico en laboratorio.	17
2.1 Introducción	17
2.2 Metodología.....	19
2.2.1 Zona de trabajo.....	19
2.2.2 Contenido hídrico de <i>P. schreberi</i> bajo condiciones de campo.....	23
2.2.3 Contenido hídrico bajo condiciones de laboratorio	24
2.2.4 Contenido hídrico relativo (CHR).....	25
2.2.5 Análisis estadístico.....	25
2.3 Resultados.....	26
2.3.1 Condiciones climáticas.....	26
2.3.2 Variación del contenido hídrico relativo	28
2.4 Discusión	32
2.5 CONCLUSIONES.....	35
3. Eficiencia fotosintética y respiración de <i>Pleurozium schreberi</i> durante la época seca en páramo y bajo condiciones controladas de déficit hídrico en laboratorio.. 36	36
3.1 Introducción	36
3.2 Metodología.....	38
3.2.1 Material vegetal.....	38
3.2.2 Eficiencia fotosintética, mediciones de fluorescencia de la clorofila a del PSII	38
3.2.3 Fotosíntesis y Respiración	38
3.2.4 Análisis estadístico.....	39
3.3 Resultados.....	39
3.3.1 Fluorescencia de la clorofila.....	39
3.3.2 Fotosíntesis.....	48
3.3.3 Respiración	50
3.4 Discusión	51
3.5 Conclusiones	57
4. CONTENIDO DE PROTEÍNAS TOTALES Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ESPECÍFICA DE PEROXIDASA Y CATALASA EN <i>Pleurozium schreberi</i> DURANTE	

LA ÉPOCA SECA EN PÁRAMO Y BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE DÉFICIT HÍDRICO EN LABORATORIO	58
4.1	Introducción.....58
4.2	Metodología62
4.2.1	Material vegetal62
4.2.2	Extracción de proteínas62
4.2.3	Determinación de proteínas totales.....62
4.2.4	Actividad enzimática específica de peroxidasa POD (EC: 1.11.1.7).....62
4.2.5	Actividad enzimática específica de catalasa CAT (EC: 1.11.1.6)63
4.2.6	Análisis estadístico63
4.3	Resultados63
4.3.1	Variación en el contenido de proteínas totales en páramo.63
4.3.2	Actividad enzimática específica de peroxidasa POD en páramo.....66
4.3.3	Actividad enzimática específica de catalasa CAT en páramo68
4.3.4	Contenido de proteínas totales y actividad enzimática específica de POD y CAT en condiciones controladas de laboratorio.....71
4.4	Discusión.....73
4.5	Conclusiones.....79
5. CONTENIDO DE AZÚCARES, PROLINA Y ABA EN <i>Pleurozium schreberi</i> DURANTE LA ÉPOCA SECA EN PÁRAMO Y BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE DEFICIT HÍDRICO EN LABORATORIO	81
5.1	Introducción.....81
5.2	Metodología83
5.2.1	Material vegetal83
5.2.2	Extracción de azúcares.....83
5.2.3	Determinación de azúcares totales solubles84
5.2.4	Determinación de azúcares reductores.....84
5.2.5	Determinación de Sacarosa y Fructosa por HPLC.....84
5.2.6	Determinación de prolina84
5.2.7	Determinación de ABA.....85
5.2.8	Análisis estadístico85
5.3	Resultados85
5.3.1	Variación en el contenido de azúcares totales solubles.85
5.3.2	Variación en el contenido de azúcares reductores.....89
5.3.3	Variación en el contenido de sacarosa92
5.3.4	Variación en el contenido de fructosa.95
5.3.5	Variación en el contenido de prolina97
5.3.6	Variación en el contenido de ABA.....100
5.4	Discusión de resultados102
5.5	Conclusiones.....107
6. Conclusiones y recomendaciones	109
6.1	Conclusiones.....109
6.2	Recomendaciones.....113
A. ANEXO: ANÁLISIS ESTADÍSTICO CAPÍTULO 2.....	115
B. ANEXO: ANÁLISIS ESTADÍSTICO CAPÍTULO 3.....	118
C. ANEXO: ANÁLISIS ESTADÍSTICO CAPÍTULO 4.....	125

D. ANEXO: ANÁLISIS ESTADÍSTICO CAPÍTULO 5	131
E. Anexo: Curva de calibración de proteínas	141
F. Anexo: Curva de calibración de azúcares totales.....	142
G. Anexo: Curva de calibración de azúcares reductores.....	143
Bibliografía	145

Lista de figuras

Figura 1-1 Ciclo de vida de un briofito

Figura 2-1 Mapa Parque Nacional Natural Chingaza. Las Lagunas de Buitrago

Figura 2-2 Fotografía satelital del Las Lagunas de Buitrago.

Figura 2-3 Las Lagunas de Buitrago, asociación Fraylejonal-Pajonal

Figura 2-4 Poblaciones de *Pleurozium schreberi* asociadas a las macollas de gramíneas.

Figura 2-5 *Pleurozium schreberi*. (a) sección de ápice utilizado en las mediciones.

Figura 2-6 Cámara para simular déficit hídrico con sílicagel bajo condiciones de laboratorio.

Figura 2-7 Contenido hídrico relativo en *Pleurozium schreberi* y variación de la humedad relativa y temperatura de la colonia durante el inicio de la época seca. Valores de medias, +- desviación estándar $\alpha= 5\%$

Figura 2-8 Contenido hídrico relativo en *Pleurozium schreberi* y variación de la humedad relativa y temperatura de la colonia a mediados de la época seca. Valores de medias, +- desviación estándar $\alpha= 5\%$

Figura 2-9 Contenido hídrico relativo en *Pleurozium schreberi* y variación de la humedad relativa y temperatura de la colonia durante la finalización de la época seca. Valores de medias, +- desviación estándar $\alpha= 5\%$

Figura 2-10 Contenido hídrico relativo en *Pleurozium schreberi* bajo condiciones de cámara de cultivo. Humedad relativa dentro de la cámara 0%. Valores de medias, +- desviación estándar $\alpha= 5\%$

Figura 3-1 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en la fluorescencia de la clorofila de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas en el Páramo de Chingaza, al inicio de la temporada de sequía. A. Fluorescencia mínima (F_o), B. Fluorescencia máxima (F_m) y C. rendimiento cuántico máximo potencial del PSII (F_v/F_m). Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha=5\%$.

Figura 3-2 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en la fluorescencia de la clorofila de *P. schreberi*, en un ciclo de 24 horas en el Páramo de Chingaza, a mediados de la temporada de sequía. A. Fluorescencia mínima (F_o), B. Fluorescencia máxima (F_m) y C. rendimiento cuántico máximo potencial del PSII (F_v/F_m). Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha=5\%$.

Figura 3-3 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en la fluorescencia de la clorofila de *P. schreberi*, en un ciclo de 26 horas en el Páramo de Chingaza, al final de la temporada de sequía. A. Fluorescencia mínima (F_o), B. Fluorescencia máxima (F_m) y C. rendimiento cuántico máximo potencial del PSII (F_v/F_m). Valores de medias,

Figura 3-4 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en la fluorescencia de la clorofila de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. A. Fluorescencia mínima (F_o), B. Fluorescencia máxima (F_m) y C. rendimiento cuántico máximo potencial del PSII (F_v/F_m). (r) Rehidratación. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha=5\%$.

Figura 3-5 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en (A) rendimiento cuántico fotoquímico (ϕ_{PSII}) y (B) la tasa de transporte de electrones (ETR) de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. (r) Rehidratación. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha=5\%$.

Figura 3-6 Curva de luz de *P. schreberi*. Ajuste al modelo de Mitscherlich. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha=5\%$. Seudo $R^2=0.9741$

Figura 3-7 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en la fotosíntesis neta (A) de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. (r) Rehidratación. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha=5\%$.

Figura 3-8 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en la respiración de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. (r) Rehidratación. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha= 5\%$.

Figura 4-1 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de proteínas totales de *P. schreberi*, en un ciclo de 24 horas en el Páramo de Chingaza, **A** inicio, **B** mediados y **C** finales de época de sequía. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha= 5\%$

Figura 4-2 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en la actividad enzimática específica de peroxidasa en *P. schreberi*, en un ciclo de 24 horas en el Páramo de Chingaza, **A** inicio, **B** mediados y **C** finales de época de sequía. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha= 5\%$

Figura 4-3 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en la actividad enzimática específica de catalasa en *P. schreberi*, en un ciclo de 24 horas en el Páramo de Chingaza, **A** inicio, **B** mediados y **C** finales de época de sequía. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha= 5\%$

Figura 4-4 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de proteínas totales de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha= 5\%$.

Figura 4-5 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en la actividad enzimática específica de peroxidasa de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha= 5\%$.

Figura 4-6 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en la actividad enzimática específica de catalasa de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha= 5\%$.

Figura 5-1 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de azúcares totales solubles de *P. schreberi*, en un ciclo de 24 horas en el Páramo de Chingaza, **A** inicio, **B** mediados y **C** finales de época de sequía. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha= 5\%$

Figura 5-2 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de azúcares totales solubles de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha= 5\%$.

Figura 5-3 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de azúcares reductores de *P. schreberi*, en un ciclo de 24 horas en el Páramo de Chingaza, **A** inicio, **B** mediados y **C** finales de época de sequía. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha= 5\%$

Figura 5-4 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de azúcares reductores de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha= 5\%$.

Figura 5-5 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de sacarosa de *P. schreberi*, en un ciclo de 24 horas en el Páramo de Chingaza, **A** inicio, **B** mediados y **C** finales de época de sequía. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha= 5\%$

Figura 5-6 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de sacarosa de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha= 5\%$.

Figura 5-7 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de fructosa de *P. schreberi*, en un ciclo de 24 horas en el Páramo de Chingaza, **A** inicio, **B** mediados y **C** finales de época de sequía. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha= 5\%$

Figura 5-8 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de fructosa de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha= 5\%$.

Figura 5-9 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de prolina de *P. schreberi*, en un ciclo de 24 horas en el Páramo de Chingaza, **A** inicio, **B** mediados y **C** finales de época de sequía. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha= 5\%$

Figura 5-10 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de prolina de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha= 5\%$.

Figura 5-11 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de ABA en *P. schreberi*, en un ciclo de 24 horas en el Páramo de Chingaza, **A** inicio, **B** mediados y **C** finales de época de sequía. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha= 5\%$

Figura 5-12 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de ABA de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha= 5\%$.

Lista de tablas

Tabla 1-1 Algunos registros de tiempo de supervivencia en briófitos.

Tabla 2-1 Temporadas de muestreo durante el la época seca de 2007.

Tabla 2-2 Condiciones climáticas durante el inicio de la época seca en Las Lagunas de Buitrago, Enero 30 y 31 de 2007.

Tabla 2-3 Condiciones climáticas a mediados de la época seca en Las Lagunas de Buitrago, Febrero 9 y 10 de 2007.

Tabla 2-4 Condiciones climáticas al finalizar la época seca en Las Lagunas de Buitrago, Febrero 24 y 25 de 2007.

Tabla 2-5 Modelos de regresión para el contenido hídrico relativo en función de la humedad relativa del ambiente. (p) probabilidad de la regresión.

Tabla 2-6 Modelos de regresión para el contenido hídrico relativo en función de la temperatura de la colonia. (p) probabilidad de la regresión.

Tabla 3-1 Modelos de regresión para F_o en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

Tabla 3-2 Modelos de regresión para F_m en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

Tabla 3-3 Modelos de regresión para F_v/F_m en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

Tabla 3-4 Modelos de regresión para ϕ_{PSII} y ETR en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

Tabla 3-5 Modelo de regresión para fotosíntesis neta en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

Tabla 3-6 Modelo de regresión para respiración en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

Tabla 4-1 Modelos de regresión para proteínas totales en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

Tabla 4-2 Modelos de regresión para peroxidasa en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

Tabla 4-3 Modelos de regresión para catalasa en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

Tabla 4-4 Modelos de regresión proteínas totales, peroxidasa y catalasa en función del CHR, bajo condiciones controladas de laboratorio. (p) probabilidad de la regresión.

Tabla 5-1 Modelos de regresión para azúcares totales en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

Tabla 5-2 Modelos de regresión para azúcares reductores en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

Tabla 5-3 Modelos de regresión para sacarosa en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

Tabla 5-4 Modelos de regresión para fructuosa en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

Tabla 5-5 Modelos de regresión para prolina en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

Tabla 5-6 Modelos de regresión para ABA en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

Introducción

Las plantas frecuentemente se ven enfrentadas a diferentes condiciones de estrés, lo que afecta el crecimiento y desarrollo, y en muchas ocasiones su supervivencia. El grado de resistencia o sensibilidad que ellas presentan depende de la especie, el genotipo y el estado de desarrollo en que se encuentran. Ante el fenómeno de estrés las plantas pueden presentar diferentes tipos de respuesta, desde alteraciones a nivel genético y celular hasta cambios en la tasa de crecimiento y producción. Identificar esta clase de respuestas es importante para entender los procesos de adaptación o daño por estrés.

Entre las plantas está el grupo de las briófitas comúnmente llamadas musgos, los cuales difieren de las plantas superiores. Entre estas diferencias se encuentran el nivel de escala de tamaño, ya que los musgos son pequeños y no poseen crecimiento secundario; segundo, no poseen tejidos de conducción interna como el floema y xilema; tercero, en su gran mayoría no tienen cutícula y son de carácter poiquilohídrico, por tal motivo no se diferencia una capa límite alrededor de las hojas y la planta en general, ya que toda la colonia de musgos se comporta como individuo rodeada por su capa límite haciendo que variaciones pequeñas del ambiente afecten fuertemente el contenido hídrico, siendo especies que se ven enfrentadas a déficit hídricos permanentemente.

Esto hace que el estudio de la fisiología de los briófitos sea específico a sus características, haciendo que las ideas preconcebidas y conocimientos de las plantas vasculares no siempre son transferibles e incluso pueden llevar a errores de interpretación.

Debido a que los briófitos entran rápidamente en déficit hídricos fuertes y pueden sobrevivir en ese estado por períodos prolongados de tiempo son objeto de estudio y las investigaciones en tolerancia a la deshidratación son abundantes, inicialmente fueron para establecer vías de transporte de agua, tiempos de supervivencia en estado deshidratado y comportamiento y tasas de recuperación de fotosíntesis y respiración

(Csintalan *et al.* 1999, Deltoro *et al.* 1999, Oliver y Bewley 1997, Tuba *et al.* 1996, Bewley y Krochko 1982, Proctor 1981, 1982, 1990, Bewley 1979). En décadas más recientes, se ha hecho énfasis en los mecanismos de tolerancia como osmoprotectores, proteínas, enzimas del sistema antioxidante y hormonas (Dazy *et al.* 2008, Choudhury y Kumar 2005, Proctor y Tuba 2002, (Mayaba *et al.* 2002, Minibayeva y Beckett 2001, Seel *et al.* 1992), para finalmente entender los aspectos moleculares y la búsqueda de genes que confieren la resistencia característica de los musgos (Strak *et al.* 2007, Nagao *et al.* 2005, Frank *et al.* 2005, Takezawa y Minami 2004, Minami *et al.* 2003, Oliver *et al.* 2000). Estos estudios se han realizado con musgos de las zonas templada y ártica, que habitan principalmente en desiertos, es así que se tienen dos especies modelo a las que se les han caracterizado gran parte de su genoma y sistema de tolerancia a la deshidratación *Tortula ruralis* y *Physcomitrella patens*, la primera especie exclusiva de los desiertos americanos y la segunda especie también de la zona templada del hemisferio norte (América y Europa) con grandes potenciales biotecnológicos (Quatrano *et al.* 2007, Hohe y Reski 2005).

Los escasos grupos de investigación dedicados a la fisiología y genética de los briófitos se encuentran en los países desarrollados y esto ha hecho que exista un vacío grande en el conocimiento de la fisiología de los briófitos del neotrópico y en especial en Colombia, que tiene ecosistemas únicos como son los páramos y selvas con características ambientales especiales y donde los briófitos sobreviven y hacen parte importante de la flora. En los páramos las plantas se encuentran generalmente en tensión por la dificultad de tomar agua del suelo debido a las bajas temperatura y la exposición a factores ambientales estresantes como son cambios drásticos de temperatura en el transcurso del día, alta radiación ultravioleta y fuerte vientos deshidratantes.

Estos factores hacen que la vegetación de páramo sea xerofítica; sin embargo, afectan de forma drástica a los briófitos. En época húmeda se exponen a déficit hídricos en varios momentos del día y se rehidratan inmediatamente con las lluvias, pero en época seca permanecen completamente deshidratados por períodos de días e incluso semanas. Cuáles son las adaptaciones que les permiten a las briófitas sobrevivir a las condiciones extremas y cambios permanentes en el páramo? Estas adaptaciones de los musgos del neotrópico serán diferentes a las presentadas por las especies de la zona templada y ártica?, estas son algunas preguntas que se pretenden responder con el desarrollo de estudios en Colombia sobre la ecofisiología de los musgos en los páramos.

Se seleccionó la especie de musgo *Pleurozium schreberi* (Brid) Mitt., porque es una de las más abundantes y características de los páramos, y en estudios exploratorios realizados con anterioridad se encontró su capacidad de tolerancia a la deshidratación (Montenegro *et al.* 2005). Adicionalmente, en la especie *P. schreberi* la mayoría de las investigaciones se enfocan en su uso para bioindicación de contaminación aérea por metales pesados (Bharali y Bates 2006, Salemaa *et al.* 2004, Couto *et al.* 2003, Ötvös *et al.* 2003, Szczepaniak y Biziuk 2003, Fernández y Carballeira 2001, Wappelhorst *et al.* 200, Reimann *et al.* 1997, Thöni *et al.* 1996), distribución ecológica (Huttunen 2003, Price 1997, Huttunena *et al.* 1997) y ciclo de nutrientes (Armitage *et al.* 2011, Migaszewski *et al.* 2009, Kosiora 2008, Krab *et al.* 2008, Galuszka 2007, Solgaa *et al.* 2005, Carter y Arocena 2000), sin embargo se han hecho escasos estudios sobre fisiología, se encuentran algunos sobre estrés por radiación UV (Tobias y Niinemets 2010, Lappalainen *et al.* 2007, Huttunen *et al.* 2005), y solo un artículo donde se reconoce a *P. schreberi* como una planta tolerante a la deshidratación en una revisión hecha por Wood (2007), sobre la distribución de briófitos tolerantes a la deshidratación., y un trabajo de ultraestructura asociada a la tolerancia a la deshidratación (Noailles 1978). Por tal razón la presente investigación es una de las primeras a nivel mundial sobre tolerancia a la deshidratación en esta especie, y es la primera investigación completa sobre tolerancia a la deshidratación en musgos del neotrópico, ya que previamente solo se había observado la variación de peroxidasa y catalasa en el musgo *Racomitrium crispipilum*, también por el autor (Barón *et al.* 2009), y un trabajo de luz y contenido hídrico hecho en los bosques de Venezuela (León *et al.* 2006).

Los objetivos del presente trabajo fueron:

Objetivo general

Determinar algunos aspectos fisiológicos y bioquímicos del musgo *Pleurozium schreberi* relacionados con su capacidad para tolerar deshidratación bajo déficit hídrico, en condiciones de campo y laboratorio.

Objetivos específicos

Caracterizar la actividad fotosintética de *P. schreberi* durante ciclos de deshidratación-rehidratación.

Caracterizar la tasa de respiración de *P. schreberi* durante ciclos de deshidratación-rehidratación.

Determinar la actividad de catalasa y peroxidasa en *P. schreberi* durante ciclos de deshidratación-rehidratación.

Determinar la capacidad osmorreguladora de sacarosa y prolina en *P. schreberi* durante ciclos de deshidratación-rehidratación.

Evaluar el contenido de ABA en *P. schreberi* durante ciclos de deshidratación-rehidratación.

NOTA:

ESTE DOCUMENTO COMPRENDE 5 CAPÍTULOS CUYO FORMATO INDIVIDUAL ES DE INTRODUCCIÓN, MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y BIBLIOGRAFÍA EN CADA UNO DE ELLOS. DEBIDO A ESTO ALGUNAS DEFINICIONES Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS PUEDEN ESTAR REPETIDAS. ESTE DOCUMENTO SE AJUSTA A LOS ARTÍCULOS 27 Y 30 DEL CAPÍTULO 5, ACUERDO NÚMERO 020 DE 2001, LOS CUALES REGLAMENTAN LOS TRABAJOS DE TESIS DENTRO DE LOS ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

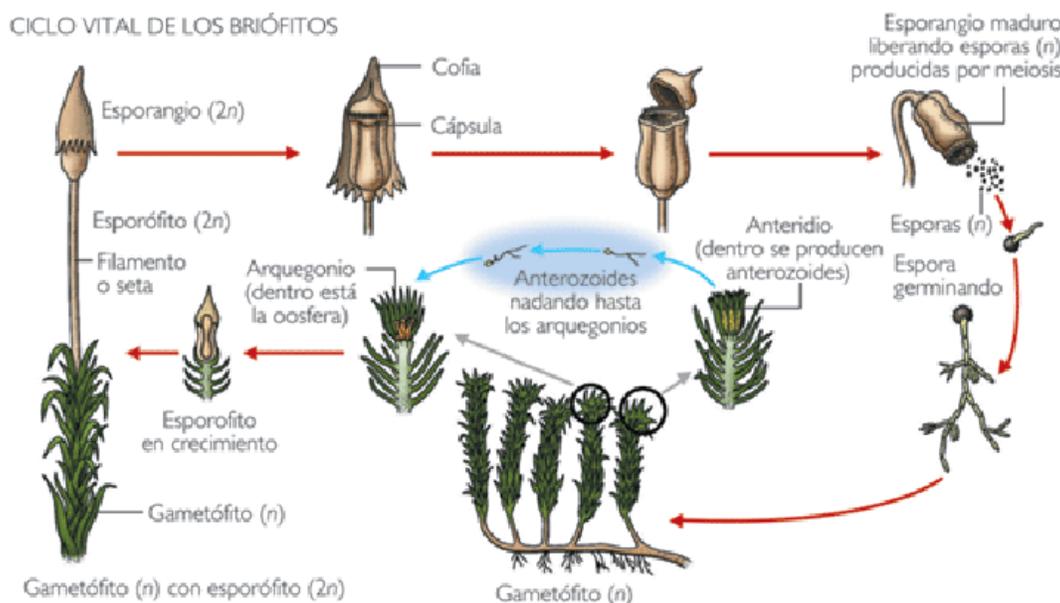
1.Marco conceptual

A continuación se presenta los conceptos básicos de briófitos, poiquilohidria y tolerancia a la deshidratación en musgos.

1.1 LOS BRIÓFITOS

Los musgos y plantas afines pertenecen a la división Bryophyta. Esta división comprende las plantas verdes terrestres más primitivas, estructuralmente los briófitos son sencillos. El organismo que generalmente se encuentra es el gametofito (n) y solo en estado reproductivo se encuentra el esporofito ($2n$), que crece parásito del gametofito. Tanto el gametofito como el esporofito son relativamente conspicuos y cada uno de ellos, por evolución, ha desarrollado un cierto número de características distintivas. El ciclo de vida de un musgo típico se muestra en la figura 1-1, y para realizar la fecundación es indispensable la presencia de agua.

Figura 1-1 Ciclo de vida de un musgo¹



¹ Imagen tomada de <http://co.kalipedia.com/>, 2011.

En general, los briófitos se dividen en tres clases conocidas comúnmente como hepáticas, antoceros y musgos. Todos los briófitos son pequeños, las especies erectas de mayor dimensión alcanzan 60 cm de altura; algunos musgos postrados o acuáticos alcanzan más de un metro de longitud. La mayor parte de los briófitos son de vida estrictamente terrestre y crecen en medios húmedos. Los briófitos no poseen estructuras especializadas para la absorción de iones minerales ni de agua y, en su mayoría, carecen también de sistema conductor interno para la circulación de las materias primas necesarias para la fotosíntesis (Goffinet y Shaw 2009, Scagel, 1980).

El gametofito dependiendo de la especie puede ser taloso o folioso, este último es propio de musgos y consta de un vástago principal (o caulidio) que lleva las hojitas (o filidios), normalmente formadas por una sola capa de células de grosor. El gametofito puede ser anual o perenne, en *P. schreberi* es perenne, y en general se fija a un sustrato a través de rizoides, que en la mayoría de los briófitos no poseen acción absorbente. En los briófitos el órgano sexual femenino es microscópico, tienen forma de botella y pluricelular denominado arquegonio, en cuyo interior se encuentra la ovocélula. El órgano sexual masculino, llamado anteridio, es siempre pluricelular y presenta una forma alargada y esférica; cuando el anteridio está maduro y cuenta con humedad suficiente, la cubierta estalla por acción de la presión de turgencia, liberando centenares de espermatozoides espiralados y provistos de flagelos, uno de ellos llega a unirse con el óvulo y forma el cigoto. El esporofito ($2n$) se produce por división mitótica del cigoto, es morfológica y funcionalmente diferente del gametofito, depende de él para su nutrición ya que carece de clorofila. El esporofito carece de órgano de fijación y su cuerpo está dividido en pie, seta y cápsula; el primero forma con el gametofito un tipo de unión que se puede considerar unhaustorio, de modo que los alimentos sintetizados por el gametofito son absorbidos por el esporofito en desarrollo (Goffinet y Shaw 2009, Scagel, 1980).

Los briófitos han conquistado la mayoría de los ecosistemas y tienen facilidad para crecer en ambientes extremos, donde no llegan las plantas vasculares. Los briófitos con una morfología lo suficientemente plástica presentan diferentes tipos de crecimiento según los diferentes medios en que viven, de tal manera que las formas de crecimiento de los briófitos pueden emplearse, hasta cierto punto, para determinar la naturaleza del microclima. Por ejemplo, los cojines (*Pleurozium schreberi*) son especialmente frecuentes en los medios en donde el agua llega a ser limitante, los musgos de aspecto afieltrado que están constituidos por gametofitos entretrejidos, íntimamente aplicados al sustrato,

tienden a ser más frecuentes en zonas húmedas y sombreadas (Goffinet y Shaw 2009, Scagel, 1980).

1.2 TOMA Y CONDUCCIÓN DEL AGUA EN BRIÓFITOS

Las plantas vasculares toman y conducen el agua a través de órganos y tejidos especializados como el xilema, bajo un esquema de tensión, cohesión y adhesión, que ha sido muy bien caracterizado. Sin embargo los briófitos tienen problemas diferentes para toma y conducción del agua asociados a su escala (plántulas pequeñas) y carencia de órganos o tejidos especializados. Es así que para estas plantas las condiciones de microhábitat establecen las relaciones hídricas y son más importancia que las condiciones del hábitat en general. Por eso las analogías superficiales que se puedan hacer entre briófitos y plantas vasculares son a menudo inválidas por las diferencia en escala o estrategias adaptativas (Proctor 2000, Proctor, 1982).

Los briófitos presentan un mayor número de adaptaciones para la toma de agua que las plantas vasculares, y están clasificados en tres grandes grupos de acuerdo a su capacidad de absorber agua del medio:

Especies endohídricas (ej: *Polytrichaceae*, *Mniaceae*, *Funaria hygrometrica*, *Marchantiaceae*), el agua se tomada del sustrato y es conducida internamente a las hojas y otras zonas de evaporación, presentan una superficie impermeable en la mayoría de las ocasiones (Buch, 1947), y por lo general, estos briófitos se encuentran en sustratos húmedos, porosos y ricos en nutrientes.

Especies ectohídricas (ej: *Pleurozium schreberi*, *Grimmiaceae*, *Orthotrichaceae*, algunas *Hypnaceae* y epífilas) el agua se absorbe y se pierde fácilmente a través de toda la superficie de la planta, el transporte del agua es principalmente por difusión. Estas plantas crecen principalmente en sustratos como rocas, cortezas y suelos, su principal fuente de agua es la humedad presente en el aire, el rocío de la mañana y la lluvia. Naturalmente estas son las especies que a lo largo del día presentan mayor contraste en el contenido interno de agua.

Un tercer grupo está constituido por las especies mixohídricas, que generalmente están presentes en sustratos que combinan una superficie húmeda con sectores secos, o que pueden encontrarse en un amplio gradiente de hábitats, razón por la cual presentan características en común de los dos grupos anteriores.

En los briófitos se conocen cuatro vías por las cuales el agua puede desplazarse de un lugar a otro:

- A través de células especializadas denominadas *hidroides* que forman un cordón central en el tallo, como rudimentos evolutivos de un sistema conductor. Son característicos de briófitos endohídricos (ej: *Polytrichum*, *Haplomitrium*, y pocas hepáticas) donde se presenta una rápida conducción interna de agua (Héban, 1977).
- A través del simplasto, que involucra las células vivas conectadas por plasmodesmos.
- A través del apoplasto, que es el espacio libre entre las células incluyendo la pared. Parece que la conducción de agua vía apoplasto en los briófitos es más eficiente o rápida que en las plantas vasculares, debido a la estructura misma de la pared, además las plantas vasculares cuando las condiciones son extremas pueden aproximarse al límite de tolerancia fisiológica mientras que en los briófitos no. En el córtex de los caulidios, la lámina de hojas de briófitos foliosos y el talo de hepáticas, gran parte del movimiento del agua puede presentarse a lo largo de las paredes celulares o bien de célula a célula. Si se tiene en cuenta que la resistencia hidráulica de la membrana celular puede ser 100 veces mayor que la de una pared celular de 1 micra de espesor, en células de 10 micras de largo la conductividad de la ruta vía apoplasto sería casi 11 veces mayor que la vía simplasto. Estimaciones de éstos parámetros indican que para briófitos con células pequeñas de pared gruesa, la vía apoplasto sería abrumadoramente la más importante, mientras que el movimiento de agua vía simplasto podría ser una mejor opción en células largas de pared delgada (como, por ejemplo, en el tejido parenquimatoso de algunas hepáticas talosas).
- Los espacios capilares que se forman externamente por la cercanía entre hojas y de éstas con los tallos. Este sistema es de gran importancia para los briófitos ectohídricos y puede alcanzar velocidades considerables en el transporte de agua. Es en este aspecto que se presenta la mayoría de adaptaciones morfológicas y anatómicas que permiten formar estos espacios capilares. Los sistemas de conducción capilar son diversos y a menudo complejos; están formados principalmente por los espacios entre hojas sobrepuestas, entre caulidios y la vaina

envolvente de la base de las hojas, y entre el tomento de rizoides y parafilos². Estos canales pueden ser largos en el rango de 10-100 μm de longitud. Los intersticios entre las papilas³ que cubren las superficies foliares de algunas *Pottiaceae* y los surcos entre pliegue y cima sobre filidios y caulidios típicamente proveen espacios capilares de unas pocas micras de longitud. Unos pocos géneros tienen sistemas de capilaridad formados por células que pierden su contenido y desarrollan poros de una a otra y al exterior, los hialocistes de *Sphagnum* son el mejor ejemplo conocido. Las hojas de *Leucobryaceae* proveen un ejemplo paralelo aunque organizado diferentemente, y las células elongadas de las vainas envolventes de la base de los filidios de especies de *Tortula*, *Encalyota* y *Calymperaceae* característicamente desarrollan adentro poros interconectando hialocistes, los que forman una parte del sistema de capilaridad circundante del caulidio. Están también las células alares en la base de hojas que pierden su contenido citoplasmático y almacenan agua en su interior (ej: *Pleurozium schreberi*). En la mayoría de los musgos los rizoides proveen un contacto íntimo entre la base del caulidio y la superficie del suelo y su principal función en la toma de agua es probablemente formar un fieltro inerte, como una capa de papel absorbente entre la planta y el sustrato, y lo mismo puede ser sustancialmente cierto para hepáticas (Montenegro *et al.* 2005, Proctor 2000, 1982).

Las formas de vida de los briófitos, que dependen del hábitat, determina la capacidad de almacenamiento de agua. Las plantas que forman densas redes y turberas con frecuencia retienen de 5 a 10 veces su peso seco, siendo sorprendente el género *Sphagnum* quien puede superar estos valores considerablemente, pero así mismo tienen bajos valores de retención de agua; mientras que especies epífitas presentan una alta capacidad de absorber agua del medio y retenerla. Por otra parte los briófitos que crecen en sitios abiertos y secos poseen una alta capacidad de retención de agua y una elevada tolerancia a la deshidratación, en contraste no son buenos para absorber agua como *P. schreberi* (Proctor, 1985).

Una colonia relativamente densa de ápices (cojines, céspedes) tiene dos ventajas sobre los individuos extensamente distribuidos: puede guardar agua en los espacios capilares

² Parafilos: filamentos uniseriados sobre el caulidio de los musgos.

³ Papilas: Engrosamientos puntuales sobre la superficie de la pared celular, a forma de granos.

creados entre los componentes y su forma relativamente sólida se comporta como dentro de una sola capa laminar límite. Los retoños individuales generan turbulencia en un flujo aéreo móvil que induce a una rápida pérdida de agua en forma de vapor (ej: *P. schreberi*). En contraste, la capa laminar que rodea una colonia aerodinámica uniforme se satura con vapor de agua, esto reduce el gradiente de concentración para la difusión molecular y así se resiste al traslado de humedad desde el filidio hacia el aire libre (Proctor 2000, Bates, 1998, Proctor, 1985).

Los arreglos contrastantes de los ápices radiales en cojines (ej: *P. schreberi*) y verticales en céspedes, pueden tener una importancia funcional. Una posible interpretación es que el arreglo vertical que caracteriza a los céspedes en tierra produce las distancias más cortas para la conducción de humedad desde la tierra hacia los crecientes ápices. Muchos pequeños céspedes de briófitos son endohídricos o mixohídricos, lo cual apoya este punto de vista. Alternativamente, la expansión radial del protonema puede inhibirse más temprano en superficies duras por sequedad, así que el aumento en densidad está dado principalmente por los desplazamientos de los pocos individuos colonizantes. También es posible que el arreglo radial del ápice en cojines pequeños tenga ventajas en cuanto al almacenamiento de agua por parte de la colonia y proporcionan un cojín aerodinámico y liso. Sin embargo, los datos disponibles no permiten una conclusión firme (Proctor 2000, Bates, 1998, Proctor, 1985).

1.3 LA ESTRATEGIA POIQUILOHÍDRICA

Las plantas poiquilohídricas entran en un rápido equilibrio de su contenido de agua interna con el agua potencial del medio ambiente. En general, los briófitos pueden ganar o perder agua rápidamente y no hay control sobre la pérdida de agua por la sencillez de su estructura, carencia de cutícula en la mayoría y falta de tejidos especializados. Cuando el medio circundante está seco, los briófitos pierden rápidamente su contenido hídrico y pueden llegar hasta un 5-10% ps y pueden sobrevivir secas en un punto donde no permanece fase líquida en las células, equivalente a un equilibrio de potencial hídrico de -100 MPa o menos, la mayoría de las plantas vasculares cuando los tejidos vegetativos pierden el 30% de su contenido hídrico llegan al punto de marchitamiento (Oliver 1991).

Es importante señalar que la capacidad poiquilohídrica de los musgos los hace altamente susceptibles al no poder retener el agua celular cuando ésta escasea a su alrededor. De ahí que los musgos sean conocidos por su gran capacidad de sobrevivir altos niveles de deshidratación, por eso los musgos han sido utilizados como modelos de estudios para entender diferentes aspectos de la tolerancia a la deshidratación (Christov, 1998; Oliver *et al.*, 2000; Proctor, 2000; Proctor y Tuba, 2002). Sin embargo, a diferencia de las plantas vasculares, la información de cómo los briófitos hacen frente a las tensiones ambientales aún es muy escasa (Lunde *et al.*, 2006).

Según los trabajos de Proctor y Tuba (2002), existen tres postulados en relación con la poiquilohidria: primero la poiquilohidria no es simplemente el punto de inicio primitivo de plantas que fallaron para conseguir la homohidria, sino una estrategia altamente evolutiva de adaptación en su propio nicho, óptimo en algunas situaciones y al menos una alternativa viable en otras. Segundo, estas dos estrategias no están tan agudamente relacionadas como aparecen a primera vista; y tercero, ambas estrategias están fuertemente relacionadas con aspectos físicos ambientales para su funcionamiento.

1.4 TOLERANCIA A LA DESHIDRATACIÓN EN BRIÓFITOS

Según Proctor y Pance (2002) y Oliver *et al.* (2005), la tolerancia a la deshidratación es la capacidad que tiene un organismo de perder el contenido hídrico interno en equilibrio con el ambiente y luego recuperar su metabolismo normal cuando se rehidrata.

Los briófitos (musgos, hepáticas y antoceros) han desarrollado una capacidad extraordinaria de tolerar la deshidratación, a pesar de ser plantas estructuralmente menos complejas que las plantas vasculares: por ejemplo, el musgo *Tortula ruralis*, que se conoce como altamente tolerante, puede ser almacenado con un contenido de agua del 5% y potenciales hídricos inferiores a -150 MPa, y después de ser rehidratado recupera rápidamente sus funciones metabólicas. Además, hay varios registros en herbarios mundiales de especies que han sobrevivido prolongados períodos de tiempo sin agua (Tabla 1-1), por ejemplo, *Grimmia pulvinata* alcanzó 80 años (Seel *et al.*, 1992; Alpert, 2000; Proctor, 2000).

Tabla 1-1 Algunos registros de tiempo de supervivencia en briófitos ⁴

Especie	Tiempo
Musgos	
<i>Anoetangium compactum</i>	19 años
<i>Fissidens minutifolius</i>	6 años
<i>Grimmia laevigata</i>	10 años
<i>Grimmia pulvinata</i>	22 semanas
<i>Tortula ruralis</i>	14 años
Hepáticas	
<i>Riccia macrocarpa</i>	23 años

Aunque la mayoría de los briófitos resisten al menos niveles modestos de deshidratación (potenciales hídricos de -20 a -30 MPa) por unos pocos días, algunos musgos y hepáticas son mucho más tolerantes. Se ha observado la activación del crecimiento del gametofito después de la rehidratación, en especímenes de la hepática *Riccia macrocarpa* mantenidos secos en el laboratorio por más de 23 años, y regeneración de protonemas de *Tortula ruralis* que han estado secos por 14 años. También se ha encontrado que muchos especímenes de *Grimmia laevigata* fueron viables después de tres años de almacenamiento en seco, pero únicamente 20% permaneció viable después de 10 años (Proctor y Pence 2002).

El mínimo de requerimientos para la tolerancia a la deshidratación debe incluir preservación intacta de: el material genético, el mecanismo de síntesis proteica, y alguna relación espacial de estructura dentro de la célula. También se sugiere la conservación de la mayoría de la estructura de proteínas y sistemas enzimáticos. Las adaptaciones involucradas en la tolerancia a la deshidratación son de dos tipos, las esenciales a la

⁴ Tabla de Alpert, 2000

tolerancia (sin las cuales no se podría concebir) y las que son consecuencia o corolarios a la tolerancia. En el primer grupo están los factores que preservan la integridad de membranas y macromoléculas en estado seco, y mantienen relaciones espaciales esenciales dentro de la célula. El segundo grupo incluye una larga escala de adaptaciones estructurales y por ejemplo protección metabólica contra daño oxidativo (Proctor and Tuba 2002). Entre las principales adaptaciones se tiene:

Acumulación de compuestos carbohidratos: Altas concentraciones de disacáridos son comunes en especies tolerantes a la deshidratación, siendo la trehalosa el carbohidrato más común desde bacterias hasta nemátodos. En plantas tolerantes al déficit hídrico la sacarosa es el disacárido que más se acumula comúnmente. En briófitos, la evidencia disponible indica que concentraciones de sacarosa permanecen altas constantemente, sin incremento considerable durante la sequía, pero azúcares reductores permanecen o declinan a niveles muy bajos cuando la planta se seca. (Proctor y Tuba 2002, Smirnov 1992). En todas las plantas de resurrección la sacarosa es el principal carbohidrato que se acumula durante la deshidratación, un mínimo de $72 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$ ps. de sacarosa parece ser suficiente para proteger la planta de la deshidratación (Scott 2000), pero la literatura muestra reportes diferentes para las mismas especies, lo que denota que no se pueden hacer afirmaciones aun sobre la necesidad de la sacarosa y su función. Se ha propuesto que la acumulación de sacarosa en plantas poiquilohídricas es para proteger la célula. Hay dos hipótesis concernientes al rol del azúcar acumulado: la primera, podría actuar estabilizando membranas y proteínas en el estado seco manteniendo los puentes de hidrógeno químicamente entre macromoléculas. La segunda, el azúcar podría vitrificar el contenido celular y estabilizar la estructura celular interna. Las últimas investigaciones evidencian fuertemente una combinación de estos dos procesos permitiendo el mantenimiento de la integridad celular durante la deshidratación (Crowe *et al.* 1998). Uno de los intereses en el entendimiento de la función de la sacarosa es determinar las posibles fuentes de carbono para lo cual se han propuesto: 2-octulosa, almidón, fotosíntesis, glucosa y fructosa.

Cambios en la expresión proteica en respuesta al estrés por sequía: Las proteínas de embriogénesis tardía (LEA) desempeñan un papel en la protección de proteínas y membranas paralelo al de los disacáridos. Ellas son importantes junto con los azúcares en el mantenimiento de la vitrificación de los contenidos celulares. Algunas plantas vasculares requieren de todo un complejo sistema de síntesis proteica para restablecerse

e iniciar la fotosíntesis de nuevo, mientras que los briófitos solo requieren de pocas horas para recuperarse completamente durante la rehidratación. Cambios característicos en la expresión genética han sido reportados en diferentes plantas vasculares. Se ha encontrado que durante los ciclos de deshidratación – rehidratación existe un aumento en proteínas donde se destacan las LEA que están asociadas con los estados tardíos del desarrollo embrionario en semillas, pero la dificultad con estas proteínas es la carencia de un entendimiento de su papel en la deshidratación, de sus secuencias se presupone que no tengan un papel funcional como enzimas, pero se cree que colaboran en estabilizar la estructura interna de las células, apoyando la protección proporcionada por la acumulación de azúcar (Scott 2000). Como en el fenómeno de daño por deshidratación se liberan muchas especies reactivas de oxígeno (ROS) es esencial que sistemas antioxidantes hagan parte de las adaptaciones de las plantas tolerantes a la deshidratación. Dhindsa y Matowe (1981), encontraron alta actividad de catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) en el musgo *Tortula ruraliformis*. Seel *et al.* (1992 a, b, c) encontró que la actividad de CAT y SOD es sustancialmente más alta en *T. ruraliformis*, pero que la actividad de peroxidasa (POD) y ascorbato peroxidasa (AP) fueron un poco mayores en musgos sensibles que en el tolerante a la deshidratación, sugiriendo que el papel de enzimas degradando el oxígeno activo pueden ser menos importantes que los antioxidantes tocoferol y glutatión en determinada tolerancia a la deshidratación. La evidencia muestra que las plantas tolerantes a la deshidratación están preparadas desde el principio para impedir el daño por oxidación más que por producción exagerada de antioxidantes después del evento. El nivel intracelular de H_2O_2 es regulado por un amplio rango de enzimas, siendo las más importantes catalasa y peroxidasas. La catalasa funciona a través de un intermediario complejo catalasa- H_2O_2 (Compuesto I) y produce agua e ión superóxido (acción catalasa) o puede decaer al inactivo Compuesto II, en la presencia de un sustrato apropiado el Compuesto I conduce a la reacción peroxidativa. El Compuesto I es un oxidante mucho más efectivo que el mismo H_2O_2 , así la reacción del Compuesto I con otra molécula de H_2O_2 (acción catalasa) representa una transferencia de un electrón, que rompe peróxido y produce otro fuerte oxidante, el radical hidroxilo (OH^\cdot). El OH^\cdot es un oxidante muy fuerte y puede iniciar una cadena de reacciones con moléculas orgánicas, particularmente con ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los lípidos de la membrana (Blokhina *et al.* 2003, Dhindsa y Matowe 1981). En los organismos aeróbicos el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es producido principalmente por la catálisis del radical superóxido por intermedio de la superóxido dismutasa. La

degradación eficiente del H_2O_2 es esencial para disminuir el daño oxidativo, dentro de las enzimas encargadas está la peroxidasa, la cual usa diferentes donadores de hidrógeno (Blokhina *et al.* 2002, Christov *et al.* 2000). La actividad de POD se estudia ampliamente en relación a señales externas y cambios ambientales extremos, en especial el efecto de iones tóxicos (Christov, 1998).

Fitohormonas: Una característica común de las proteínas que han sido aisladas e identificadas que incrementan en términos de expresión durante la deshidratación de tejidos vegetales, han sido inducidas por el ácido abscísico (Bartels *et al.* 2002). Se propone la hipótesis que el ABA forma la señal inicial para desencadenar los eventos metabólicos necesarios para la tolerancia a la deshidratación. Un incremento en la concentración de ABA en hojas de *Craterostigma* ocurre durante el estrés por déficit hídrico (Scott 2000). Además, en cultivo de tejidos vegetales se ha inducido resistencia al déficit hídrico con ABA (Bartels *et al.* 1990). Aumento en la concentración de ABA foliar han sido notados también en *Myrothamnus fabellifolia*, *Xerophyta humilis* y un amplio rango de otras plantas de resurrección (Scott, 2000). En ciclos de deshidratación-rehidratación se observó que ABA induce la formación de una serie de proteínas en la hepática xerofítica *Exormotheca holstii*, estas proteínas son del tipo de las dehidrinas propias de plantas vasculares tolerantes a la deshidratación como *Craterostigma plantagineum*. La fluctuación de ABA endógeno durante los ciclos fue lo suficientemente alta para indicar su papel como una hormona del estrés y como un inductor endógeno de proteínas relacionadas con la tolerancia al estrés (Hellwege *et al.* 1996, 1994, 1992). Beckett *et al.* (2000), encontraron que tratamientos con ABA hacían tolerante a la deshidratación al musgo *Atrichum undulatum*, manteniendo la fotosíntesis por protección del PSII evitando la producción de ROS cerca de él. Iguales resultados se encontraron para el musgo *Atrichum androgynum* (Mayaba *et al.* 2001).

Cambios a nivel de ARN: En relación con los cambios metabólicos que presentan las plantas tolerantes a la deshidratación se han descrito también varios cambios a nivel de alteraciones en ARNm que codifica enzimas vitales para catálisis de estos flujos. Sin embargo, cada medida real no dice mucho acerca de la bioquímica de estas plantas. En este campo se destacan los trabajos realizados con el briofito *Tortula ruralis* el cual ha servido como modelo para el entendimiento del metabolismo en plantas poiquilohídricas, así se ha encontrado durante la deshidratación en el aparato de traducción la retención polisomal de transcritores que codifican proteínas ribosomales como RPS14, RPS16 y RPL23 (Wood *et al.* 2000). También se ha encontrado cambios en la expresión génica

como respuesta a la deshidratación regulada por alternaciones en el patrón de selección de ARNs mensajeros, de un pool de ARNm constante cualitativo por la maquinaria de traducción, la cual genera nuevas partículas ribonucleoproteicas (mRNPs) (Wood and Oliver 1999).

2. Contenido hídrico de *Pleurozium schreberi* durante época seca en páramo y bajo condiciones controladas de déficit hídrico en laboratorio.

2.1 Introducción

En los briófitos el agua está asociada a tres principales componentes: simplasto, apoplasto y el agua capilar externa, siendo este último el que almacena y mueve el mayor volumen de agua en especies ectohídricas como es el caso de *Pleurozium schreberi* (Proctor 2000).

Los briófitos tolerantes a deshidratación (TD) son capaces de crecer y realizar procesos como la fotosíntesis cuando el agua está disponible y detener su metabolismo cuando la pierden, sin llegar a morir en períodos prolongados de déficit hídrico; una vez rehidratados recuperan en minutos u horas sus funciones normales. La mayoría de los briófitos son poiquilohídricos, como *P. schreberi*, pueden ganar y perder agua rápidamente y no hay control sobre la pérdida de agua debido a la falta de cutícula y sistemas internos de transporte. Se considera la poiquilohídria como una característica primitiva de las plantas que empezaron a conquistar la tierra, facilitando la toma de agua cuando se encuentra disponible. Además, son plantas pequeñas y morfoanatómicamente sencillas; sin embargo, esto obliga a los musgos a tener un sistema de tolerancia a la deshidratación que les permita sobrevivir en períodos de escasez de agua (Anicic *et al.* 2009, Oliver *et al.* 2000, Proctor 2000, Proctor y Tuba 2000, Robinson *et al.* 2000, Csintalan *et al.* 1999).

En los páramos húmedos del trópico colombiano se presentan prolongados períodos de lluvia que hacen que los musgos en la mayor parte del año no tengan que enfrentarse a problemas de estrés hídrico, sin embargo durante la época seca los briófitos son los más afectados porque se enfrentan a escasez total de agua, cambios de temperatura diarios que pueden ir de -1°C en horas de la noche hasta 30°C en horas del medio día, altas

radiaciones principalmente UV y vientos fuertes. Por la condición poiquilohídrica de estas especies alcanzan potenciales hídricos muy bajos (Montenegro *et al.* 2005).

Pleurozium es un género monotípico, los esporofitos no se han observado en material de Colombia. Es una especie ampliamente distribuida por el hemisferio Norte, México, Costa Rica y Andes tropicales. En Colombia se encuentra registrada en Antioquia, Boyacá, Cauca, Cundinamarca, Meta, Risaralda, Santander y Tolima; frecuente entre 2650 y 3800 m.s.n.m., en general se localiza desde bosques alto-andinos hasta el páramo, en sitios abiertos, sobre humus y suelo, comúnmente asociada a pantanos y charcos (Newton y Tangney 2007, Churchill y Linares 1995).

En las Lagunas de Buitrago ubicadas en el Páramo de Chingaza, *P. schreberi* es el musgo más representativo en la asociación frailejunal-gramínea, creciendo sobre el suelo y alrededor de las macollas de pastos y *Chusquea*. Su crecimiento está afectado principalmente por la competencias de especies cercanas, ya que en época de lluvias cuando empieza a subir el nivel freático es desplazado por el musgo *Sphagnum magellanicum*, pero al inicio de la época seca, su cobertura aumenta considerablemente por su capacidad de TD y nuevamente disminuye con el máximo de sequía en la zona. El agua que almacena esta especie en los colchones que forma, es una fuente importante para las gramíneas (Montenegro *et al.* 2003).

P. schreberi presenta plantas amplias y extendidas, sin alcanzar una altura importante, a pesar de su gran cobertura en la zona. El hecho de no ser una población compacta sino entramada o manojos no la hace muy importante para la acumulación de agua. La posición de los filidios⁵ tanto en el tallo principal como en las ramas es formando filas en espiral, además gran parte de la lámina de los filidios está adpresa al caulidio⁶ (reflexas)⁷, lo que le permite formar importantes canales capilares a todo lo largo de la planta. El transporte del agua por estos capilares se ve facilitado por ser plantas pequeñas y en posición horizontal. Su crecimiento, como en la mayoría de los musgos, se realiza encima de las secciones que van muriendo, dejando en contacto con el suelo y la base de algunas macollas gran cantidad de materia orgánica en descomposición, la

⁵ Filidios: lamina fotosintética, presente en los briófitos, similar a las hojas.

⁶ Caulidio, eje central que carga los filidios presente en briófitos, similar al tallo.

⁷ Reflexo (a): encorvado hacia abajo (abaxialmente) y hacia adentro, refiriéndose, generalmente, a los márgenes de las hojas u hojas sobre el tallo.

cual favorece la retención de agua por parte del suelo sobre el que se encuentra. En general, a nivel morfológico solo la forma de las hojas son significativas en el transporte de agua, dejando lo demás al componente anatómico. Al igual que la mayoría de las Bryales, el caulidio de *P. schreberi* está compuesto de dos secciones de células, corteza y centro, fuertemente diferenciadas, ya que las células de la corteza son muy pequeñas y con paredes muy gruesas, en comparación con las células centrales (3 a 5 veces más grandes), adaptación para facilitar el transporte apoplástico en los caulidios; además, la carencia de cutícula en la corteza facilita la entrada y salida de agua a lo largo de todo el caulidio por esta misma vía. En la hoja de *P. schreberi* se presenta una textura plegada y cóncava, adaptaciones que permiten el almacenamiento de agua y el movimiento de la misma gracias a la formación de espacios capilares. Presencia de células alares, asociadas a la reserva de agua. Igualmente las células de la lámina con paredes gruesas para facilitar la entrada de agua del espacio capilar externo al espacio apoplástico (Montenegro *et al.* 2005).

P. schreberi varía su contenido hídrico en relación a la humedad relativa del ambiente, es la hipótesis que se quiere comprobar en este trabajo, para lo cual los objetivos de este capítulo son conocer el contenido hídrico relativo del *P. schreberi* a través del inicio, mediados y finales de la época seca en el Páramo de Chingaza, su variación en ciclos de 24 h en cada temporada y determinar los momentos del día y de la época seca donde se encuentra en déficit hídrico. Determinar la relación entre el contenido hídrico relativo de esta especie y la humedad relativa del ambiente. Conocer el contenido hídrico relativo bajo condiciones de déficit hídrico en laboratorio. Además se describe las condiciones geográficas y climáticas de los sitios de muestreo en el Páramo de Chingaza. La información y resultados de este capítulo serán la base para los análisis de los siguientes capítulos.

2.2 Metodología

2.2.1 Zona de trabajo

La fase de campo se desarrolló en los meses de Enero y Febrero de 2007 en el Páramo de Chingaza, sector de las Lagunas de Buitrago. El Parque Nacional Natural Chingaza está ubicado en la Cordillera Oriental de los Andes colombianos, se encuentra entre los departamentos de Cundinamarca y Meta, muy cerca a Bogotá. Cuenta con una extensión

páramo, presenta temperaturas anuales de 8 °C en promedio. En época seca, entre Enero y Marzo, la temperatura diaria puede oscilar entre 20 y -2 °C. Su régimen de lluvias es unimodal, muestra un solo período de lluvias intensas entre los meses de Mayo y Agosto, durante los cuales se presenta un poco más del 60% de las lluvias totales del año.

Los meses de Diciembre a Febrero son los de menores precipitaciones y aportan entre un 9 y 17% al total anual. En el cuerpo principal las precipitaciones son de baja intensidad y larga duración, con un promedio de 30 mm diarios durante el 75% de los días del año (Montenegro *et al.* 2005).

Dentro del parque se encuentran Las Lagunas de Buitrago (Figuras 2-2 y 2-3), ubicadas al norte a unos 3250 m de altura, localizadas a 73° 50'' W y 4° 46' N. La zona se encuentra conformada por rocas metamórficas paleozoicas y rocas sedimentarias cretácicas. Su origen es glacial (Donato 2001).

Figura 2-2 Fotografía satelital del Las Lagunas de Buitrago. Numeradas las poblaciones muestreas de *Pleurozium schreberi* (1: 4°45'18.95''N 73°49'52.51''O; 2: 4°45'19.16''N 73°49'52.08''O; 3: 4°45'19.27''N 73°49'52.72''O; 4: 4°45'19.36''N 73°49'52.25''O; 5: 4°45'19.73''N 73°49'52.22''O; 3592 msnm)



Figura 2-3 Las Lagunas de Buitrago, asociación Fraylejonal-Pajonal

Figura 2-4 Poblaciones de *Pleurozium schreberi* asociadas a las macollas de gramíneas.

2.2.2 Contenido hídrico de *P. schreberi* bajo condiciones de campo

Fechas de muestreo: Los muestreos se realizaron a comienzos del año 2007, que coincidió con el fenómeno “el Niño”. El año fue considerado como uno de los períodos de mayor sequía para Colombia. Se tomaron muestras en tres temporadas durante la época seca (Tabla 2-1)

Tabla 2-1 Temporadas de muestreo durante el la época seca de 2007

Temporada	Fecha	Características
Inicio	Enero 30 y 31 de 2007	Presencia de niebla en las madrugadas, única fuente de agua de <i>P. schreberi</i>
Mediados	Febrero 9 y 10 de 2007	Ausencia de niebla y lluvia, los musgos están expuestos a déficit hídrico permanente.
Finales	Febrero 24 y 25 de 2007	Inicio de lluvias esporádicas. Rehidratación de las poblaciones de musgos

Material vegetal: se seleccionaron cinco poblaciones de *P. schreberi* dentro de la asociación frailejonal-pajonal, bajo las mismas condiciones microclimáticas, se tomaron muestras de ápices (Figura 2-5) cada 2 horas durante 24 horas iniciando a las 5 a.m., para cada una de las tres temporadas. El material vegetal utilizado para determinar contenido hídrico se guardó en tubos de ensayo con cierre hermético para evitar pérdida o ganancia de agua y se procesaron en el laboratorio. Los ápices para análisis bioquímicos se guardaron en envases herméticos, se congelaron inmediatamente y fueron transportados en hielo seco al laboratorio donde permanecieron a -70 °C hasta su utilización.

Figura 2-5 *Pleurozium schreberi*. (a) sección de ápice utilizado en las mediciones.



Datos climáticos: para cada una de las tres temporadas se registraron durante las 24 horas los datos de temperatura, humedad relativa y presencia de lluvia, nubes y niebla.

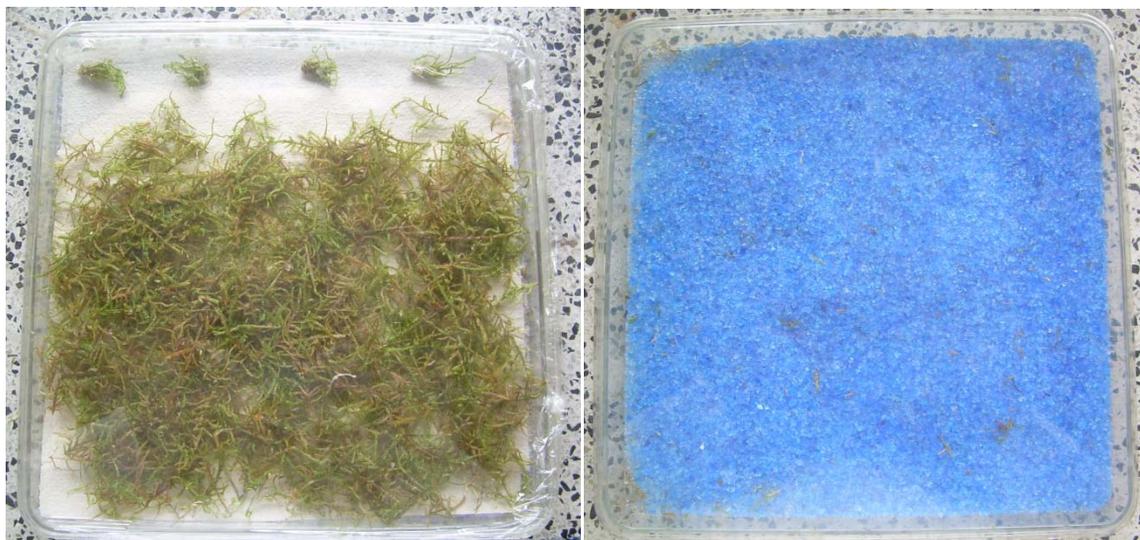
2.2.3 Contenido hídrico bajo condiciones de laboratorio

Material vegetal: Se colectaron cinco poblaciones de *P. schreberi* en el mismo sector donde se hizo el muestreo de campo y se transportaron al laboratorio en Bogotá, donde se colocaron bajo condiciones controladas en cuarto de cultivo: fotoperíodo 12 horas luz/12 horas oscuridad, temperatura de 18°C, irradiación de $27.75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, humedad relativa de 90% y tuvieron agua permanentemente durante 2 meses para mantener las plantas a condiciones óptimas. Es bajo estas condiciones óptimas que se determinaron los valores fisiológicos y bioquímicos para comparar con las plantas estresadas en campo y laboratorio.

Exposición a déficit hídrico: Bajo las condiciones del cuarto de cultivo se colocaron las poblaciones de musgos, previamente retirado el exceso de agua con papel absorbente en bandejas con tapa y cierre hermético (Figura 2-6), con una base de sílicagel, para simular condiciones de déficit hídrico, se dejaron deshidratar los musgos por 24 horas y se rehidrataron al finalizar este período. Se tomaron muestras para contenido hídrico y

pruebas bioquímicas cada 2 horas, iniciando a las 5:00 am con el musgo hidratado y durante el tiempo de deshidratación. Posteriormente la rehidratación se hizo con agua en exceso a las 5 am del día siguiente, y se tomaron medidas en el momento de la rehidratación y adicionales 2 y 12 horas después de la rehidratación. Las mediciones se hicieron a partir de las 5 am para simular condiciones de campo.

Figura 2-6 Cámara para déficit hídrico con sílicagel bajo condiciones de laboratorio.



2.2.4 Contenido hídrico relativo (CHR)

Para el contenido hídrico relativo (Hernández-García *et al.* 1999), se determinó el peso fresco (pf), el peso en turgencia (pt) y el peso seco (ps) de cada muestra, y se expresó como porcentaje de peso seco según la siguiente fórmula:

$$\text{CHR} = \frac{\text{pt} - \text{ps}}{\text{ps}} \times 100\%$$

2.2.5 Análisis estadístico

Los datos se analizaron bajo un diseño experimental completamente al azar, con 5 replicas (cada una de las poblaciones) tanto para las muestras colectadas en campo como para las de laboratorio. Se realizó análisis de varianza para comparar las tres temporadas en páramo (inicio, mediados y final de la época seca), análisis de regresión lineal y regresión polinomial para CHR en función de la HR y temperatura para determinar la relación y el modelo. El nivel de significancia fue del 95% y se utilizó el programa estadístico "Statistix 9".

2.3 Resultados

2.3.1 Condiciones climáticas

Durante el inicio de la época seca (Tabla 2-2) la presencia de niebla en horas de la madrugada sirve como fuente de agua para la hidratación de los musgos. La temperatura varió de 1°C en horas de la noche (21:00) a 23°C en horas de la tarde (13:00) en el aire, sin embargo la colonia de musgos alcanzó valores más bajos en horas de la madrugada 0°C. El factor de cielo despejado durante las horas de luz incidió con altas radiaciones a los que se enfrenta el musgo y probablemente favorecen la evaporación del agua de los mismos. Los valores altos de humedad relativa (% HR) (90 – 100%) se presentaron cuando llegó la niebla en horas de la noche, mientras que los valores más bajos (20 a 50%) están asociados a la presencia de altas temperaturas y alta radiación solar.

Tabla 2-2 Condiciones climáticas durante el inicio de la época seca en Las Lagunas de Buitrago, Enero 30 y 31 de 2007.

Hora	% H.R.	Temperatura Ambiente (°C)	Temperatura colonia (°C)	Condiciones
5:00	100	4	3	Niebla
7:00	88	9	9	Nubosidad 60%
9:00	52	12	20	Nubosidad 40%
11:00	48	16	23	Nubosidad 40%
13:00	40	21	13	Nubosidad 40%
15:00	55	12	15	Cielo despejado
17:00	86	16	10	Cielo despejado
19:00	100	4	6	
21:00	100	1	1	
23:00	100	4	3	
1:00	98	4	3	
3:00	95	4	0	Niebla
5:00	94	5	0	Niebla
7:00	46	2	1	Cielo despejado
9:00	34	15	6	Cielo despejado
11:00	30	20	12	Cielo despejado
13:00	26	23	14	Cielo despejado
15:00	21	18	20	Cielo despejado
17:00	24	20	12	Cielo despejado

A mediados de la época seca (Tabla 2-3) durante el día y la noche, la HR permaneció en general baja, entre el 51 y 25% durante el día y la noche, al igual que se alcanzaron

extremos muy bajos de temperatura del aire de 0°C a las 3:00 h, incluso presentándose formación de escarcha a las 5:00 h. Las colonias durante la noche y madrugada mantuvieron una temperatura de uno a tres grados por encima de del aire; pero durante las horas de luz su temperatura subió considerablemente en relación con la temperatura del ambiente, variando de 12 °C hasta 36°C en el día. El cielo despejado durante todo el día favoreció el efecto de alta radiación sobre las colonias.

Tabla 2-3 Condiciones climáticas a mediados de la época seca en Las Lagunas de Buitrago, Febrero 9 y 10 de 2007

Hora	% H.R.	Temperatura Ambiente (°C)	Temperatura colonia (°C)	Condiciones
5:00	100	1	4	Escarcha, No niebla
7:00	99	7	8	Escarcha, No niebla
9:00	45	13	21	Cielo despejado
11:00	40	15	31	Cielo despejado
13:00	38	16	36	Cielo despejado
15:00	33	15	31	Cielo despejado
17:00	46	11	12	Cielo despejado
19:00	49	4	7	
21:00	51	4	5	
23:00	33	2	5	
1:00	30	1	3	
3:00	25	0	1	No niebla
5:00	25	3	1	No niebla

A finales de la época seca (Tabla 2-4) la característica principal fue la presencia de nubes durante todo el día y la llegada de las lluvias. Durante la noche y en horas de la madrugada la HR se mantuvo al 100%: en tanto que durante el día disminuyó, registrándose un mínimo entre las 11:00 y 13:00 h. La temperatura del aire vario en un rango de 13 grados registrándose 2 °C a las 5:00 h hasta 15 °C a las 15:00 h. Se observó que la temperatura de la colonia varía de 7 °C a las 5:00 h a 18°C hacia medio día; sin embargo, se mantuvo muy constante en un promedio de 10.5°C cuando hay presencia de lluvia, sin disminuir a pesar de ser horas de la madrugada. La temperatura de la colonia en general se registró mayor a la temperatura del aire.

Tabla 2-4 Condiciones climáticas al finalizar la época seca en Las Lagunas de Buitrago, Febrero 24 y 25 de 2007

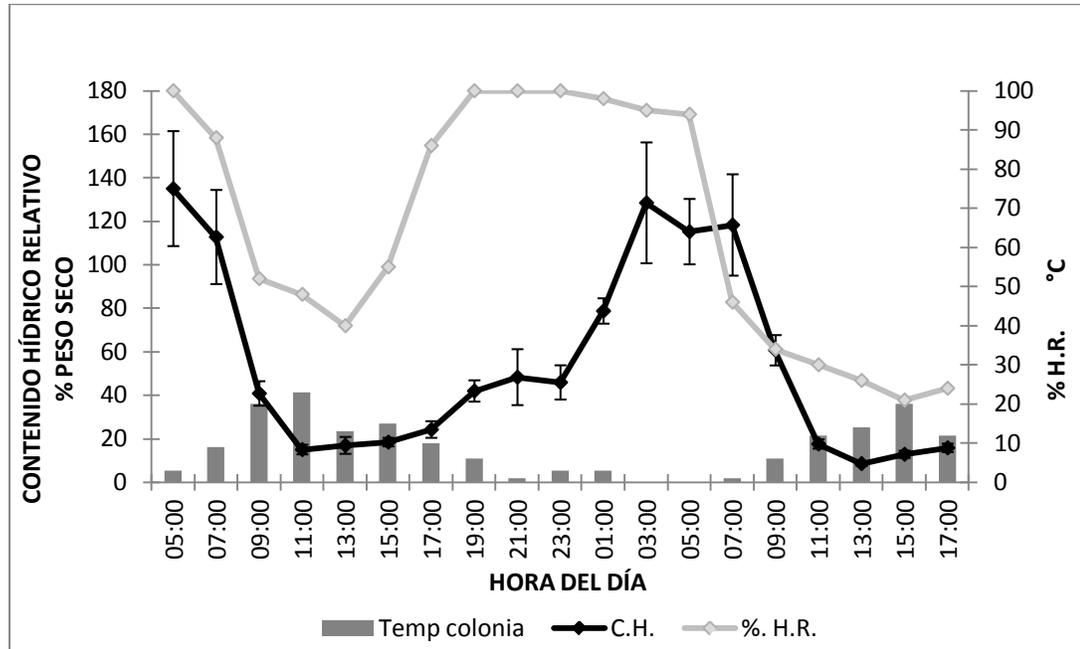
Hora	% H.R.	Temperatura Ambiente (°C)	Temperatura colonia (°C)	Condiciones
5:00	98	2	7	No niebla
7:00	90	9	9	Nubosidad 90%
9:00	68	13	13	Nubosidad 90%
11:00	64	15	18	Nubosidad 100%
13:00	65	13	18	Nubosidad 100%
15:00	78	12	15	Nubosidad 100%
17:00	90	11	15	Nubosidad 100%
19:00	100	9	13	Nubosidad 100%
21:00	100	8	12	Nubosidad 100%
23:00	100	7	11	Nubosidad 100%, llluvia
1:00	100	9	10	Nubosidad 100%, llluvia
3:00	100	10	10	Nubosidad 100%, llluvia
5:00	100	10	10	Nubosidad 100%, llluvia
7:00	100	10	11	Nubosidad 100%, llluvia

2.3.2 Variación del contenido hídrico relativo

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre las tres temporadas (Anexo A), ya que *Pleurozium schreberi* tuvo diferentes contenidos hídricos relativos máximos en cada una de ellas, aun con humedades relativas del 100%.

En la figura 2-7 se observa al inicio de la época seca el CHR de *P. schreberi* varía entre 8,5% en las horas de la tarde, cuando se presenta una baja humedad relativa y altas temperaturas en la colonia, hasta 135%, en horas de la madrugada en presencia de niebla y humedad relativa del 100%. Se observa que el CHR presenta cercanamente la misma tendencia de la HR.

Figura 2-7 Variación del contenido hídrico relativo en *Pleurozium schreberi* y variación de la humedad relativa y temperatura de la colonia durante el inicio de la época seca. Valores de medias, +- desviación estándar $\alpha = 5\%$



A mediados de la época seca (Figura 2-8) el CHR varía en función de la HR (Tabla 2-5) presentando la misma tendencia. El CHR se mantiene en 8% ps durante la mayor parte del día independiente de la hora o la temperatura del ambiente o de la colonia asociada a HR bajas. Durante el día de muestreo se observó un CHR de 85% a las 5:00 h debido a la presencia de escarcha.

A finales de la época seca (Figura 2-9) el CHR de *P. schreberi* varía entre 11.5% en horas de la tarde, con HR de 65%, hasta 900% cuando llegan las lluvias y las colonias de musgos alcanzan el máximo de absorción de agua.

Figura 2-8 Variación del contenido hídrico relativo en *Pleurozium schreberi* y variación de la humedad relativa y temperatura de la colonia a mediados de la época seca. Valores de medias, +- desviación estándar $\alpha=5\%$

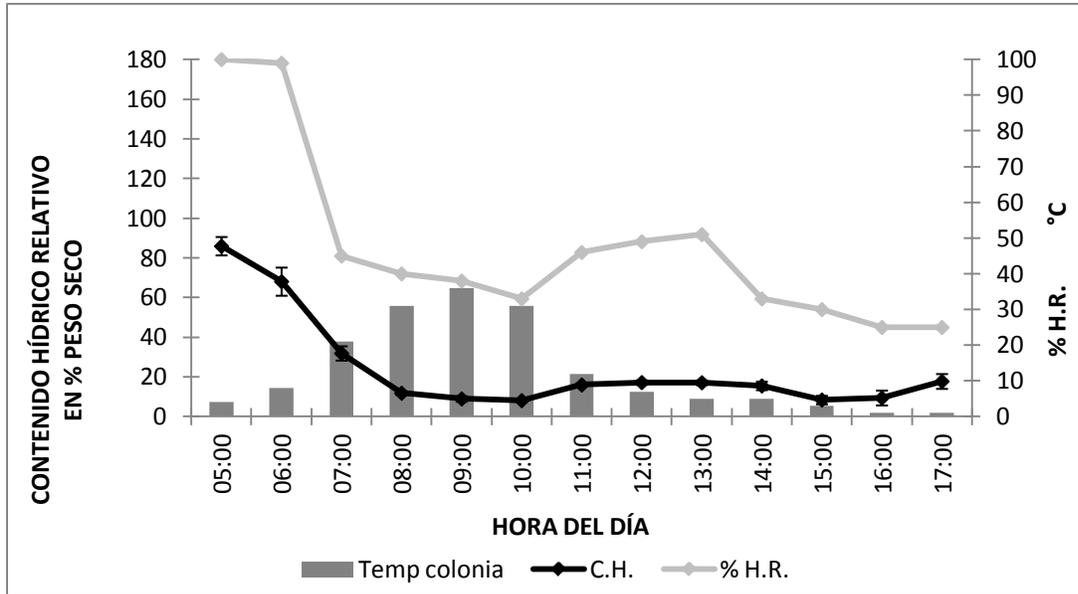
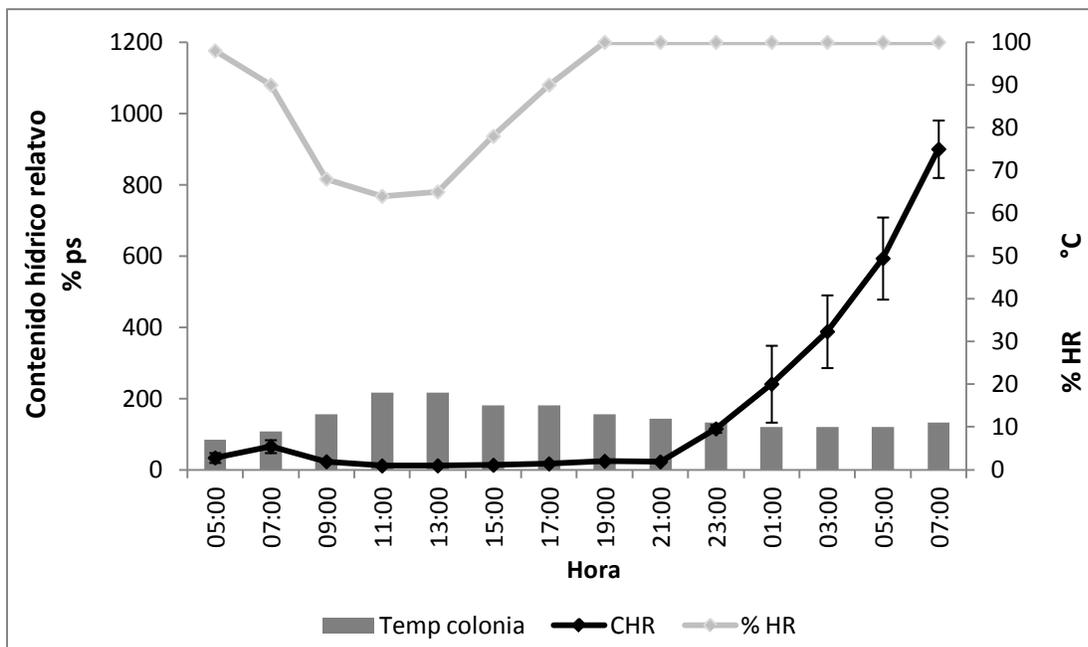


Figura 2-9 Variación del contenido hídrico relativo en *Pleurozium schreberi* y variación de la humedad relativa y temperatura de la colonia durante la finalización de la época seca. Valores de medias, +- desviación estándar $\alpha=5\%$



Los análisis de regresión lineal (Tabla 2-5) dieron altamente significativos para CHR en función de la HR, sin embargo los R^2 son bajos, ya que no hubo un igual comportamiento de los briófitos con condiciones de 100% HR, el musgo no absorbió agua en el caso de la escarcha de la madrugada (temporada dos), y cuando llega la lluvia el musgo sigue absorbiendo agua hasta alcanzar un máximo promedio de 9 veces su peso seco.

Tabla 2-5 Modelos de regresión para el contenido hídrico relativo en función de la humedad relativa del ambiente. (p) probabilidad de la regresión.

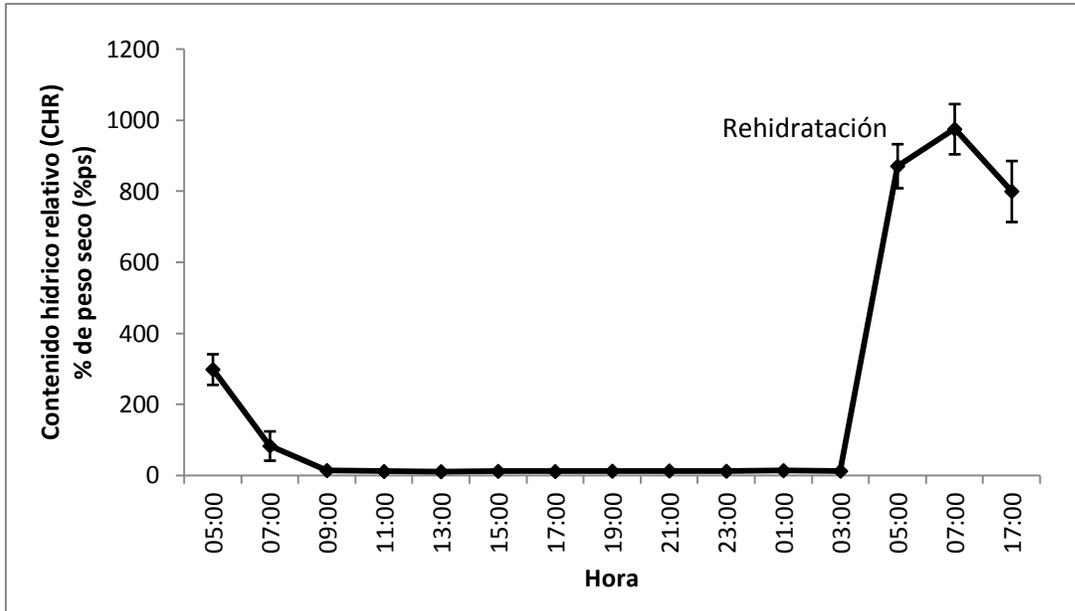
		R^2	p Regresión
Inicio de la época seca	$CHR = -34.603 + 1.2132 * HR$	0.3800	0.0000
Mediados de la época seca	$CHR = -18.271 + 0.9159 * HR$	0.9016	0.0000
Final de la época seca	$CHR = -415.43 + 6.1427 * HR$	0.2379	0.0001
Laboratorio	$CHR = -39.259 + 1.2890 * HR$	0.3925	0.0000

Tabla 2-6 Modelos de regresión para el contenido hídrico relativo en función de la temperatura de la colonia. (p) probabilidad de la regresión.

		R^2	p Regresión
Inicio de la época seca	$CHR = 89.276 - 3.3788 * temp$	0.3382	0.0000
Mediados de la época seca	$CHR = 36.707 - 0.6597 * temp$	0.0932	0.0177
Final de la época seca	$CHR = 2408.5 - 301.08 * temp + 9.2979 * temp^2$	0.5034	0.0000

Bajo las condiciones de laboratorio (Figura 2-10) con una HR baja por la utilización de sílicagel, el CHR se mantuvo constante en un promedio de 11%, posteriormente al rehidratarse el musgo registra 900% CHR. Al aplicar suficiente agua al medio se observa que la planta toma agua llegando a un máximo de absorción en 2 horas.

Figura 2-10 Variación del contenido hídrico relativo en *Pleurozium schreberi* bajo condiciones de laboratorio. Humedad relativa dentro de la cámara 0%. Valores de medias, +- desviación estándar $\alpha=5\%$



2.4 Discusión

En general los contenidos hídricos relativos de *P. schreberi* son bajos en las temporadas 1 y 2 en el páramo cuando la humedad relativa es del 100%, ya que solo alcanzan en promedio 1,5 veces su peso seco en agua, indicando que solo con la niebla o la escarcha no puede alcanzar los valores máximos registrados para esta especie (Montenegro *et al.* 2003) de 9 veces su peso seco, valores que si alcanzó después de varias horas de lluvia en la temporada 3 o con la rehidratación en laboratorio.

En el páramo los factores en la época seca que contribuyen principalmente como fuente de agua para los musgos son el vapor presente en el aire, la niebla común en las madrugadas y al finalizar este período la fuente más importante son las lluvias. Adicionalmente se registró un cuarto factor que probablemente contribuyó a aumentar el contenido de agua externa capilar, la escarcha, formada en horas de la madrugada durante el período más intenso de sequía. Sin embargo, no queda claro si este fenómeno contribuye a la deshidratación de las células del musgo, convirtiéndose en otro factor de estrés para la planta.

El estrés en briófitos por bajas temperaturas ha sido ampliamente estudiado en musgos del ártico y en especies bajo condiciones de la estación de invierno en los países del norte, donde se han encontrado adaptaciones desde el nivel genético, fisiológico y celular (Schlensog *et al.* 2004, Deltor *et al.* 1999, Malek y Bewley 1978)

Los factores que producen el estrés hídrico en *P. schreberi* durante la época seca son la falta de lluvias, la escasez de agua en el aire que se refleja en valores bajos de humedad relativa, y las temperatura altas del aire y de la colonia, que alcanzan en horas del medio día. En estudios realizados en *P. schreberi* para describir su morfoanatomía asociada a la toma de agua en el Páramo de Chingazá se describieron factores similares de deshidratación, al igual que en el musgo *Racomitrium crispipilum* (Montenegro *et al.* 2003, Barón *et al.* 2009).

Además se comprueba que *P. schreberi* es un musgo típicamente poiquilohídrico como se observa en las figuras. Presenta facilidad para absorber agua cuando ésta se encuentra presente y perderla por evaporación cuando el medio circundante se encuentra seco. Sin embargo, como muestran las figuras 2-7 y 2-9, una vez que *P. schreberi* alcanza los valores más bajos de contenido hídrico (8 a 11%) en condiciones de campo, la velocidad de rehidratación es lenta a pesar de que la humedad relativa aumente, tomándole aproximadamente de 1 a 2 horas alcanzar niveles óptimos de CHR.

Los estudios muestran que los briófitos pueden sobrevivir secos a un punto donde no permanece una fase líquida en las células y el contenido hídrico relativo puede ser del 5 al 10%, y puede llegar a observarse potenciales hídricos de -100 MPa o menos (Proctor y Tuba 2002).

P. schreberi ha sido reportada por su tolerancia a la deshidratación permitiéndole ser una especie que en tierras áridas y heladas tenga una ventaja significativa para crecer y ocupar grandes territorios (Scandrett y Gimingham 1989), similar a lo encontrado en el páramo (Montenegro *et al.* 2005).

La gran mayoría de los briófitos han desarrollado una capacidad extraordinaria de tolerar la deshidratación, a pesar de ser plantas estructuralmente menos complejas que las plantas vasculares. Por ejemplo, el musgo *Tortula ruralis*, que se conoce como altamente tolerante, puede ser almacenado con un contenido de agua del 5% y potenciales hídricos inferiores a -150 MPa, y después de ser rehidratado recupera rápidamente sus funciones

metabólicas. Además hay varios registros en herbarios mundiales de especies que han sobrevivido prolongados períodos de tiempo, *Grimmia pulvinata* alcanzó 80 años (Alpert 2000, Proctor 2000, Seel *et al.* 1992)

Los páramos son considerados ecosistemas xerófitos por la dificultad de toma de agua por las plantas vasculares; sin embargo, los musgos por su condición poiquilohídrica solo se enfrentan a estrés hídrico cuando llega la época seca, así debe esperarse que *P. schreberi* tenga una fisiología característica para época de lluvias (en el caso del Páramo de Chingaza 8-9 meses al año) y adaptaciones fisiológicas cuando inicia la época seca.

Se ha reportado una relación directa entre el nivel de humedad del hábitat y microhábitat con la distribución de especies de musgos tolerantes a la deshidratación, con características fisiológicas semejantes que les permite sobrevivir (Cleavitt 2002).

Bajo condiciones de laboratorio donde se controló la temperatura, el viento y la humedad relativa, se observó un comportamiento más homogéneo durante el período de deshidratación. Se alcanzaron valores de CHR similares a los de campo cuando el musgo estaba en el máximo de deshidratación (11% ps al inicio y final de la época seca), pero no se alcanzaron los valores más bajos encontrados en campo durante la fase más fuerte del fenómeno “el Niño” que fueron de 8%, el CHR que refleja el acumulo de varios días de sequía fuerte con humedades relativas bajas de hasta el 25%, consideradas como valores inferiores a los encontrados en los desiertos (Borghetti *et al.* 1993). Adicionalmente, se confirma que en el campo son varios los factores que afectan los procesos de deshidratación-rehidratación en esta planta.

Entre las adaptaciones citológicas que tiene *P. schreberi* está que presenta varias vacuolas en su citoplasma las cuales cuando entra en deshidratación se dividen en muchas vacuolas pequeñas las cuales se vuelven a unir al llegar la rehidratación, posteriormente recuperan el tamaño original; este fenómeno que también se presenta en el musgo *Tortula ruralis* es considerado una adaptación para las plantas tolerantes a la deshidratación (Chen *et al.* 2002, Noailles 1978).

Otro factor que cambia en relación al comportamiento con campo fue que a pesar de bajar el contenido hídrico a 11%, en condiciones de laboratorio logra una rápida

hidratación, sugiriendo un posible factor acumulativo en campo que afecta su capacidad de rehidratación rápida, posiblemente daño celular.

La diferencia de temperatura entre el medio y la colonia, siendo en esta última generalmente mayor en las horas más frías puede ser una adaptación de los briofitos para evitar una rápida deshidratación o facilitar el metabolismo en las pocas horas de condiciones favorables de CHR y luz. Proctor *et al.* (2007), describe que la temperatura de la colonia y el ambiente son factores que intervienen en el nivel de tolerancia a la deshidratación que puede llegar a desarrollar un musgo, por lo general altas temperaturas facilitan el endurecimiento de las plantas para desarrollar un mejor tolerancia a la deshidratación.

2.5 CONCLUSIONES

De acuerdo a lo encontrado en campo y bajo condiciones de laboratorio *Pleurozium schreberi* es un musgo ectohídrico y poiquilohídrico.

En época seca el contenido hídrico de *P. schreberi* varía de acuerdo a la variación de la humedad relativa del ambiente.

Los factores que afectan el CHR de *P. schreberi* en el páramo son HR, temperatura del medio y de la colonia y disponibilidad de agua (lluvia o niebla).

P. schreberi cuando disminuye su contenido hídrico por debajo de 11%, tarde en rehidratarse cuando el agua está disponible.

Cuando el agua líquida está disponible en abundancia *P. schreberi* alcanza CHR promedio de 900%.

3.Eficiencia fotosintética y respiración de *Pleurozium schreberi* durante la época seca en páramo y bajo condiciones controladas de déficit hídrico en laboratorio

3.1 Introducción

A diferencia de la mayoría de las plantas terrestres los musgos están expuestos a cambios drásticos de su contenido hídrico por su condición de organismos poiquilohídricos, teniendo que adaptar su fotosíntesis y respiración para aprovechar los momentos donde se presenten las condiciones de luz y humedad adecuadas; además, en páramos como Chingaza durante la época seca se ven expuestos a potenciales hídricos muy bajos durante períodos prolongados de tiempo que pueden durar semanas o incluso meses (Montenegro *et al.* 2005, Barón *et al.* 2009). La capacidad de aprovechar la luz en los momentos de humedad y utilizarla en procesos fotosintéticos, al igual que el metabolismo de la respiración es propio de cada especie, y su tolerancia tiene fuertes componentes de adaptación y dependen del hábitat y las condiciones previas a los déficit hídrico (Heber *et al.* 2006).

Se han realizado varios estudios sobre el funcionamiento de la fotosíntesis en briófitos tolerantes y no tolerantes a la deshidratación, estrés por congelamiento, estrés por alta radiación, y deficiencia de nutrientes. En los briófitos tolerantes a la deshidratación se ha encontrado todo un sistema de protección y reparación de los fotosistemas, para prevenir daño durante la deshidratación y así reiniciar el metabolismo fotosintético inmediatamente se rehidrate la planta (Proctor *et al.* 2007, Stark *et al.* 2007, Hamerlynck *et al.* 2002, Proctor y Smirnov 2000, Deltoro *et al.* 1999, Tuba *et al.* 1996). Por otra parte, los estudios sobre respiración en musgos no son tan comunes y en relación con tolerancia a la deshidratación muestran comportamientos similares a las plantas vasculares (Proctor *et al.* 2007, Stark *et al.* 2007, Schlenzog *et al.* 2004, Csintalan *et al.* 1999). La herramienta más utilizada es la fluorescencia de la clorofila a del PSII como un indicador de la tolerancia fisiológica a la deshidratación, ya que provee un mecanismo rápido y no invasivo para observar el comportamiento de la eficiencia fotosintética (Hamerlynck *et al.* 2002, Maxwell y Johnson 2000, Robinson *et al.* 2000, Csintalan *et al.* 1999).

Una fracción de la luz que incide en una planta es absorbida por los pigmentos, el estado que resulta de la absorción de un fotón es muy inestable, por lo que la molécula excitada tiene una marcada tendencia a ceder el exceso de energía y volver al estado fundamental. Existen varias formas de llevar a cabo esta relajación entre ellas está la fluorescencia donde algunos de los saltos puede ocurrir entre estados suficientemente separados, y la energía cedida puede entonces ser emitida como fotón visible, siempre de menor energía que el fotón que causo el estado excitado. Se puede observar dos máximos de fluorescencia uno a 685 nm que corresponde a la fluorescencia del PSII y otro más pequeño a los 730 nm del PSI. La emisión de fluorescencia del PSII ocurre en el rojo/rojo lejano, y para medirla esencialmente hay que separar la fluorescencia (685 nm) de la luz de excitación (650 nm) con un filtro de interferencia. La fluorescencia rojo a rojo lejano a temperatura ambiente proviene en más del 90% del complejo antena y el centro de reacción del PSII y muestra una cinética de inducción. Aunque la cantidad total de fluorescencia clorofílica es muy pequeña (únicamente 1 o 2% del total de luz absorbida), la medida es bastante fácil. El pico de emisión de fluorescencia es de una longitud de onda más larga que el de la luz absorbida, por lo tanto, la producción de fluorescencia puede ser cuantificada por exponer una hoja a una luz de longitud de onda definida y midiendo la cantidad de luz re-emitida a una longitud de onda más larga (Maxwell y Johnson 2000).

Los briófitos cuando se encuentran en déficit hídrico protegen los fotosistemas para cuando regresa el agua poder fotosintetizar en los pocos momentos cuando las condiciones de luz son adecuadas. Por eso, *P. schreberi* detiene su metabolismo (fotosíntesis y respiración) cuando se encuentra en déficit hídrico como una adaptación de tolerancia a la deshidratación, y recupera rápidamente estas funciones cuando se rehidrata son las hipótesis de esta investigación. Para lo cual los objetivos que se desarrollaron fueron determinar la eficiencia fotosintética en campo y bajo condiciones de laboratorio cuando la planta se encuentra deshidratada y rehidratada, utilizando algunos parámetros de la fluorescencia de la clorofila a del PSII; y determinar la tasa de respiración y fotosíntesis bajo condiciones de laboratorio.

3.2 Metodología

3.2.1 Material vegetal

Las mediciones de campo y laboratorio se realizaron con el material vegetal descrito en el capítulo dos.

3.2.2 Eficiencia fotosintética, mediciones de fluorescencia de la clorofila a del PSII

Las mediciones en campo se realizaron cada dos horas por 24 horas, durante las tres temporadas (capítulo 1), se utilizó un fluorómetro no modulado Hansatech Handy Pea, a $3000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por 0,5 seg. Previo a la medida se adaptaron a la oscuridad por 30 min los ápices de las colinas de musgos. Se determinó fluorescencia mínima (F_o), fluorescencia máxima (F_m) y rendimiento cuántico máximo potencial del PSII (F_v/F_m).

Bajo condiciones de laboratorio (capítulo 1) se realizaron mediciones cada 2 horas, se inicio a las 5:00 h con los musgos hidratados, después se expusieron a deshidratación con sílicagel durante 20 horas y en la hora 5:00 del día siguiente se rehidrataron con abundante agua. Se realizaron mediciones adicionales a las 2 y 12 horas de rehidratados los musgos. Se utilizó un fluorómetro modulado PAM, a $3000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por 0,5 seg. Se determinó fluorescencia mínima (F_o), fluorescencia máxima (F_m), rendimiento cuántico máximo potencial del PSII (F_v/F_m), para lo cual se adaptaron los ápices de las colonias a la oscuridad por 30 min; el rendimiento cuántico fotoquímico del PSII (ϕPSII) y la tasa de transporte de electrones (ETR).

3.2.3 Fotosíntesis y Respiración

La fotosíntesis neta (A) y la respiración fueron medidas para los musgos en condiciones de laboratorio a una temperatura de 18°C , se utilizó un Analizador de gas infra rojo (IRGA) TPS-2 Portable Photosynthesis System, utilizando una cubeta foliar sellada PLC. El flujo en la cámara fue de 300 ml min^{-1} , y a $297 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, parámetros que se tomaron al partir de la curva de luz para *Pleurozium schreberi*. La curva de luz se construyó de acuerdo a lo reportado por Solarte *et al.* (2010). Para la determinación de la tasa de respiración se mantuvieron los musgos en cuarto de cultivo bajo las mismas condiciones, pero en oscuridad durante todo el ciclo de deshidratación-rehidratación.

3.2.4 Análisis estadístico

Los datos se analizaron bajo un diseño experimental completamente al azar, con 5 réplicas (cada una de las colonias) para el páramo y el laboratorio. Para la curva de luz se utilizó el modelo de Mitscherlich (Solarte *et al.* 2010). Se elaboraron análisis de varianza para comparar las tres temporadas en páramo (inicio, mediados y final de la época seca), Se realizaron análisis de regresión lineal y regresión polinomial para todas las variables en función al contenido hídrico relativo, para determinar la relación y el modelo de la curva. El nivel de significancia fue del 95% y se utilizó el programa estadístico “Statistix 9”.

3.3 Resultados

3.3.1 Fluorescencia de la clorofila

Para hacer la comparación de los parámetros de fluorescencia de la clorofila cuando el musgo está estresado y en condiciones óptimas se tuvo en cuenta las mediciones realizadas a la hora 5:00 de laboratorio al principio del experimento cuando los musgos llevaban 2 meses en cuarto de crecimiento sin ningún factor de tención.

El valor de la fluorescencia mínima (F_o) cuando *P. schreberi* no estaba estresado fue en promedio de 149 (Figura 3-4 A). Durante el inicio de la época seca (Figura 3-1 A) los valores máximos de F_o , entre las 5:00 y 7:00 h, estaban entre 515 y 907, una hora después de que los musgos se hidrataron con la niebla y decayeron a valores cercanos a 200 en los momentos de menor CHR y mayor radiación solar, posteriormente, aumentaron alrededor de 300 cuando las plantas aun seguían deshidratadas en la noche (Tabla 3-2). Para mediados de la época seca (Figura 3-2 A) los valores más altos estaban entre 162 y 214 para los momentos de menor CHR, sin diferencia entre el día y la noche, mientras que los valores más bajos estaban alrededor de 63 para cuando las plantas aumentaban su CHR (Tabla 3-3). Hacia finales de la época seca (Figura 3-3 A) los valores máximos de F_o estaban en promedio en 300 cuando el CHR en el musgo era bajo y 600 cuando se registro un CHR muy alto, los valores más bajos de F_o en promedio fueron de 97 cuando *P. schreberi* empezó a hidratarse al alcanzar el medio una HR de 100% (Tabla 3-4).

Para las mediciones en condiciones controladas de laboratorio (Figura 3-4 A) Fo tuvo valores bajos de 149 cuando la planta estaba hidratada, luego cuando se inicio el tratamiento de deshidratación descendió levemente en las primeras dos horas, entre las 5:00 y 7:00 h, para después empezar a aumentar hasta llegar a valores en promedio cercanos a 300. En el momento de la rehidratación disminuyó a 161 y una hora después se encontró en valores similares al inicio cuando estaba en condiciones óptimas de hidratación.

El análisis de varianza para Fo en las tres temporadas de la época seca (Anexo B) presentó diferencias altamente significativas entre ellas, mostrando efectos diferentes a medida que aumentó el tiempo de exposición del musgo al déficit hídrico (en días) o cuando empezó a salir de ella por la llegada de las primeras lluvias. Sin embargo, las regresiones de Fo en función del CHR (Tabla 3-1) a pesar de dar significativas para la primera y tercera temporada tienen R^2 muy bajos, no presentando un comportamiento lineal ni polinomial.

Tabla 3-1 Modelos de regresión para Fo en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

		R^2	p
Inicio de la época seca	$Fo = 186.29 + 2.2588 * CHR$	0.1581	0.0009
Mediados de la época seca	No significativa	0.0029	0.6821
Final de la época seca	$Fo = 283.02 + 0.3489 * CHR$	0.1049	0.0123
Laboratorio	No significativa	0.0326	0.3765

P. schreberi sin influencia de ningún factor de estrés presentó un valor promedio de fluorescencia máxima (Fm) de 435 (Figura 3-4 B). Durante el inicio de la época seca (Figura 3-1 B) los valores de Fm aumentaron a medida que incrementó el CHR en los musgos hasta alcanzar valores entre 1200 y 1700, se observa que el aumento se da una hora después de que los musgos llegaron al máximo de CHR. El Fm desciende con el inicio de la deshidratación llegando a valores de Fm de 160 cuando el musgo alcanza el mínimo de CHR, durante el muestreo se observó alta radiación solar que corresponde a registro de CHR bajo (Tabla 3-2). A mediados de la época seca (Figura 3-2 B) la Fm alcanzó un valor máximo de 900, pero en general se mantuvo constante en un promedio

de 300 durante todo el período de deshidratación; el valor mínimo fue de 74 cuando el musgo aumentó levemente su CHR. Para finales de la época seca (Figura 3-3 B) los Fm máximos fueron de 490 cuando se presentaron los valores más bajos de CHR y 1110 cuando *P. schreberi* alcanza los CHR más altos (mayor a 800%), el valor inferior fue en promedio de 140 cuando el medio alcanzó una HR de 100% (19:00 h) y posteriormente empezó la rehidratación del musgo por la llegada de las lluvias (Tabla 1-4).

Para los ciclos de deshidratación-rehidratación bajo condiciones controladas de laboratorio (Figura 3-4 B) la Fm fue baja y constante durante las primeras 12 horas de deshidratación, a un promedio cercano a 200, para luego aumentar a valores promedio de 490; en el momento de la rehidratación descendió de nuevo a valores promedio de 300 donde se mantuvieron incluso 12 horas después.

El análisis de varianza para Fm en las tres temporadas de la época seca (Anexo B) mostró diferencias altamente significativas, presentando efectos diferentes a medida aumenta el tiempo de exposición del musgo al déficit hídrico (en días) o cuando empieza a salir de ella por la llegada de las primeras lluvias. Sin embargo, las regresiones de la Fm en función del CHR (Tabla 3-2) a pesar de dar significativas en la primera y tercera temporada, tienen R^2 muy bajos, no presentó un comportamiento lineal ni polinomial.

Tabla 3-2 Modelos de regresión para Fm en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

		R^2	p
Inicio de la época seca	$Fm = 107.94 + 6.1265 * CHR$	0.2525	0.0000
Mediados de la época seca	No significativo	0.0074	0.5142
Final de la época seca	$Fm = 279.18 + 0.9129 * CHR$	0.2851	0.0000
Laboratorio	No significativo	0.0367	0.1389

El valor del rendimiento cuántico máximo del PSII (Fv/Fm) cuando *P. schreberi* se encuentra en condiciones normales de hidratación fue de 0.68 (Figura 3-4 C). Para el inicio de la época seca (Figura 3-1 C) la Fv/Fm varió en función del CHR del musgo (Tabla 3-3). Llegó a valores inferiores a 0.1 cuando el musgo se encontraba deshidratado, y aumentó hasta valores promedio de 0.5 cuando se hidrató por efecto de la niebla en horas de la madrugada; sin embargo, el valor máximo se alcanzó dos horas

después de iniciada la rehidratación (Tabla 1-2). Para mediados de la época seca (Figura 3-2 C) cuando el musgo se vio enfrentado a escasez de agua por varios días seguidos, el valor de Fv/Fm mantuvo un valor promedio bajo de 0.1, a través del ciclo de 24 horas. En la temporada 3 finalizando la época seca (Figura 3-3 C) e inicio de lluvias de nuevo la Fv/Fm varió en función del CHR (Tabla 3-3). Obtuvo valores inferiores a 0.1 cuando el musgo se encontraba deshidratado y aumentó a partir de dos horas de iniciada la rehidratación por las lluvias, alcanzando valores máximos de 0.3 en promedio.

Bajo condiciones de laboratorio (Figura 3-4 C) el comportamiento de Fv/Fm es dependiente del CHR (Tabla 3-3). Con valores de 0.7 en promedio al inicio del experimento cuando estaba hidratado, entre 0.15 y 0.25 cuando el musgo se encontraba deshidratado, entre 0.60 y 0.64 cuando fue rehidratado, incluso 12 horas después de iniciar la rehidratación se mantuvo este rango. En estas condiciones el musgo aumentó Fv/Fm al tiempo que inició la rehidratación; sin embargo, no recuperó el valor que se registra cuando se encuentra en condiciones óptimas.

El análisis de varianza para Fv/Fm en las tres temporadas de la época seca dio diferencias altamente significativas (Anexo B), mostrando efectos diferentes a medida aumenta el tiempo de exposición del musgo al déficit hídrico (en días) o cuando empezaba a salir del mismo por la llegada de las primeras lluvias. Las regresiones de Fv/Fm en función del CHR (Tabla 3-3) dieron altamente significativas para las tres temporadas y el laboratorio.

Tabla 3-3 Modelos de regresión para Fv/Fm en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

		R ²	p
Inicio de la época seca	$F_{v/Fm} = -0.0549 + 3.57E - 3 * CHR$	0.6092	0.0000
Mediados de la época seca	$F_{v/Fm} = 0.0544 + 8.68E - 4 * CHR$	0.1173	0.0074
Final de la época seca	$F_{v/Fm} = 0.0431 + 4.38E-4 * CHR$	0.6544	0.0000
Laboratorio	$F_{v/Fm} = 0.2342 + 2.20E-3 * CHR - 2.03E-6 * CHR^2$	0.5375	0.0000

Figura 3-1 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en la fluorescencia de la clorofila de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas en el Páramo de Chingaza, al inicio de la época seca. A. Fluorescencia mínima (F_o), B. Fluorescencia máxima (F_m) y C. rendimiento cuántico máximo potencial del PSII (F_v/F_m). Valores de medias, \pm desviación estándar $\alpha = 5\%$.

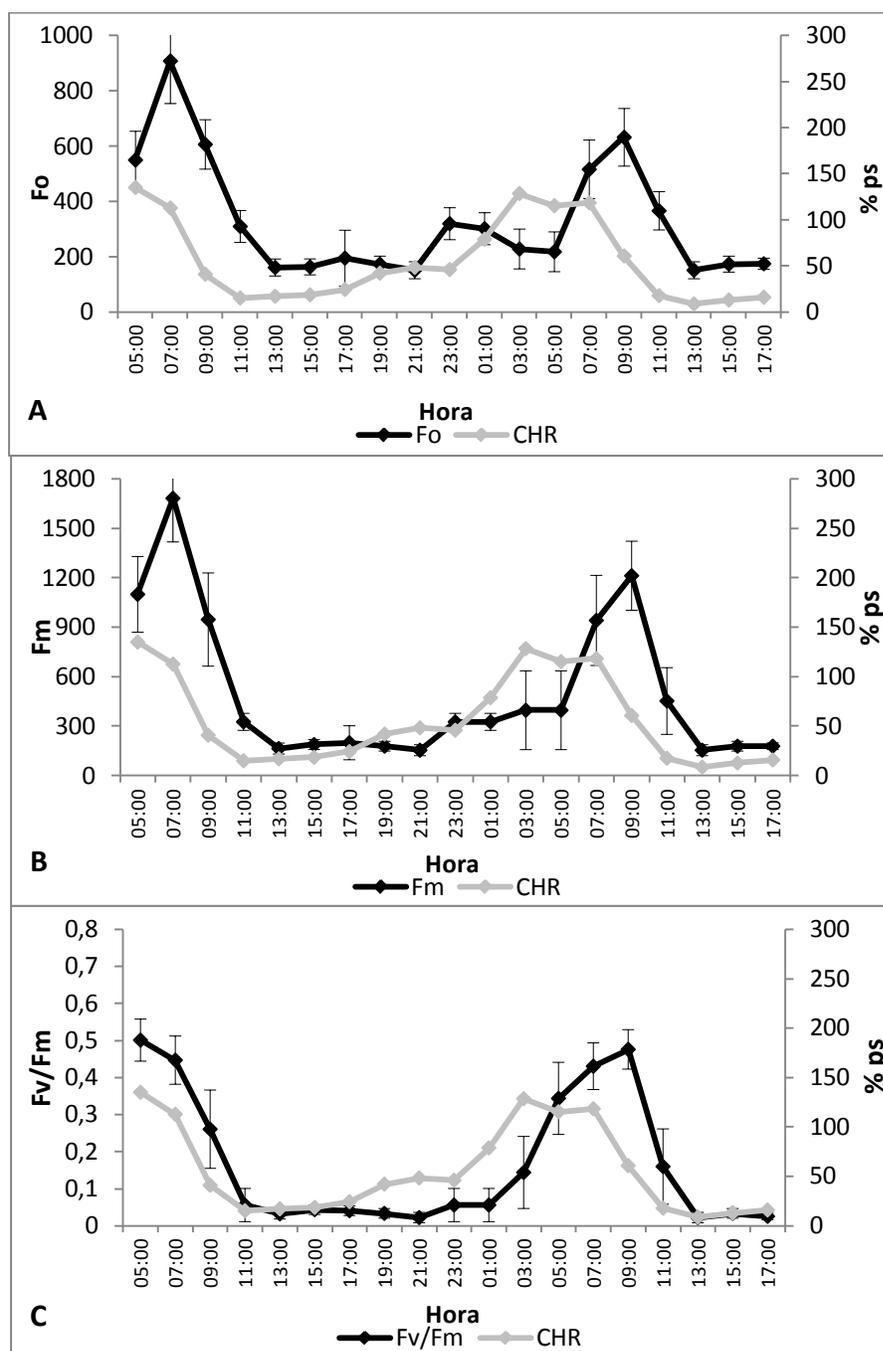


Figura 3-2 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en la fluorescencia de la clorofila de *P. schreberi*, en un ciclo de 24 horas en el Páramo de Chingaza, a mediados de la época seca. A. Fluorescencia mínima (F_o), B. Fluorescencia máxima (F_m) y C. rendimiento cuántico máximo potencial del PSII (F_v/F_m). Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha=5\%$.

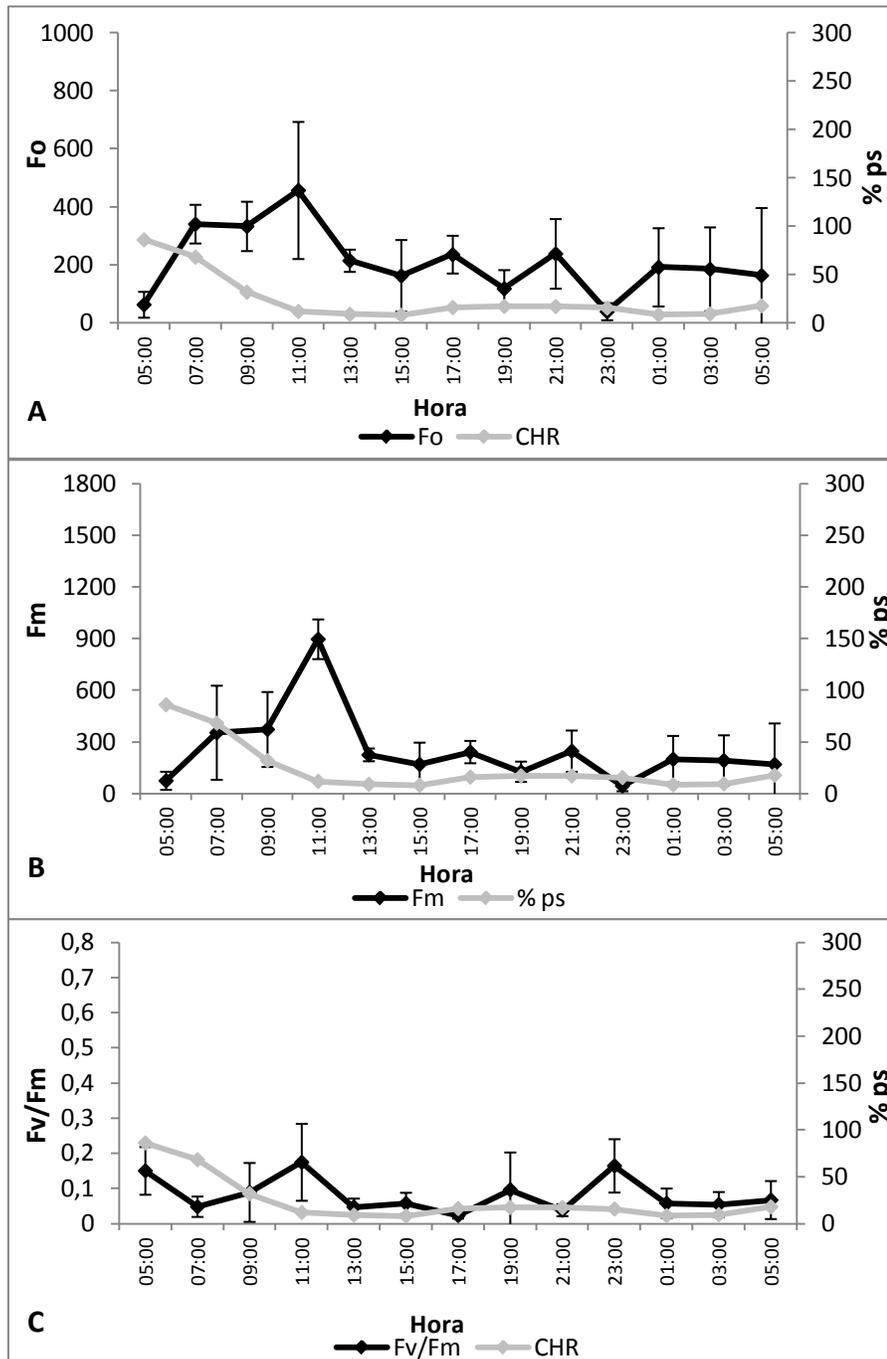


Figura 3-3 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en la fluorescencia de la clorofila de *P. schreberi*, en un ciclo de 26 horas en el Páramo de Chingaza, al final de la época seca. A. Fluorescencia mínima (F_o), B. Fluorescencia máxima (F_m) y C. rendimiento cuántico máximo potencial del PSII (F_v/F_m). Valores de medias, \pm desviación estándar $\alpha=5\%$.

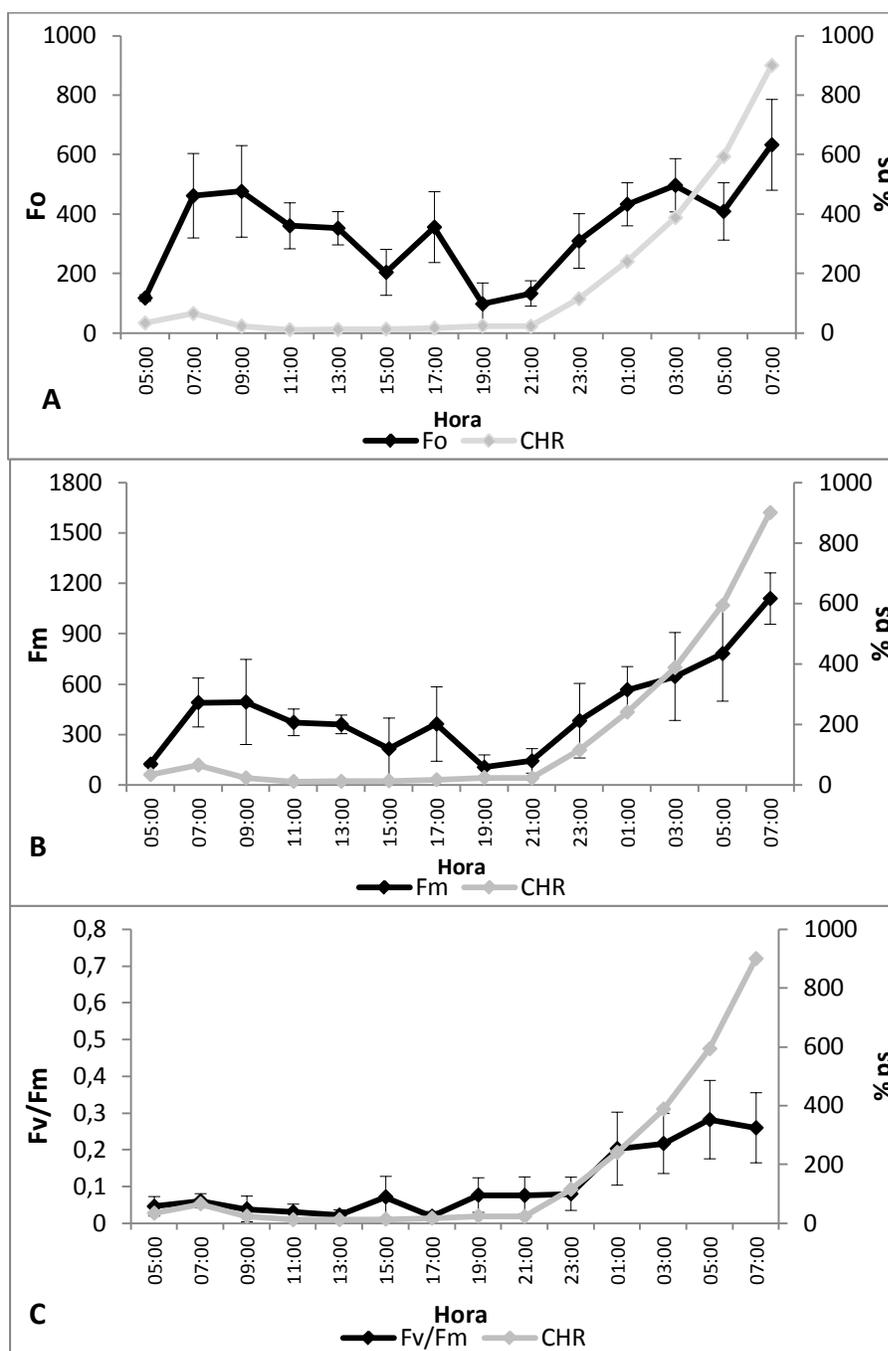
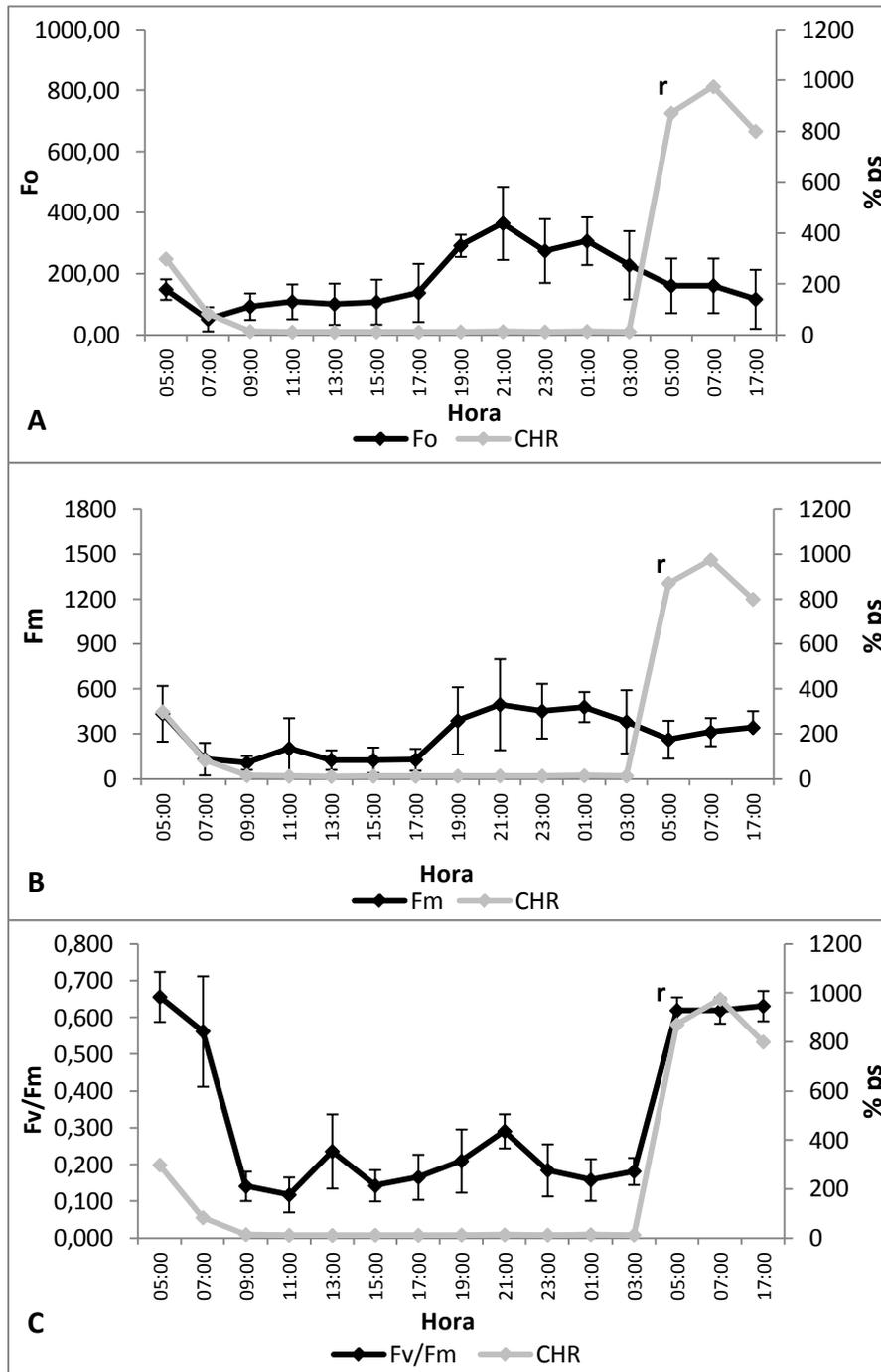


Figura 3-4 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en la fluorescencia de la clorofila de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. A. Fluorescencia mínima (F_o), B. Fluorescencia máxima (F_m) y C. rendimiento cuántico máximo potencial del PSII (F_v/F_m). (r) Rehidratación. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha=5\%$.



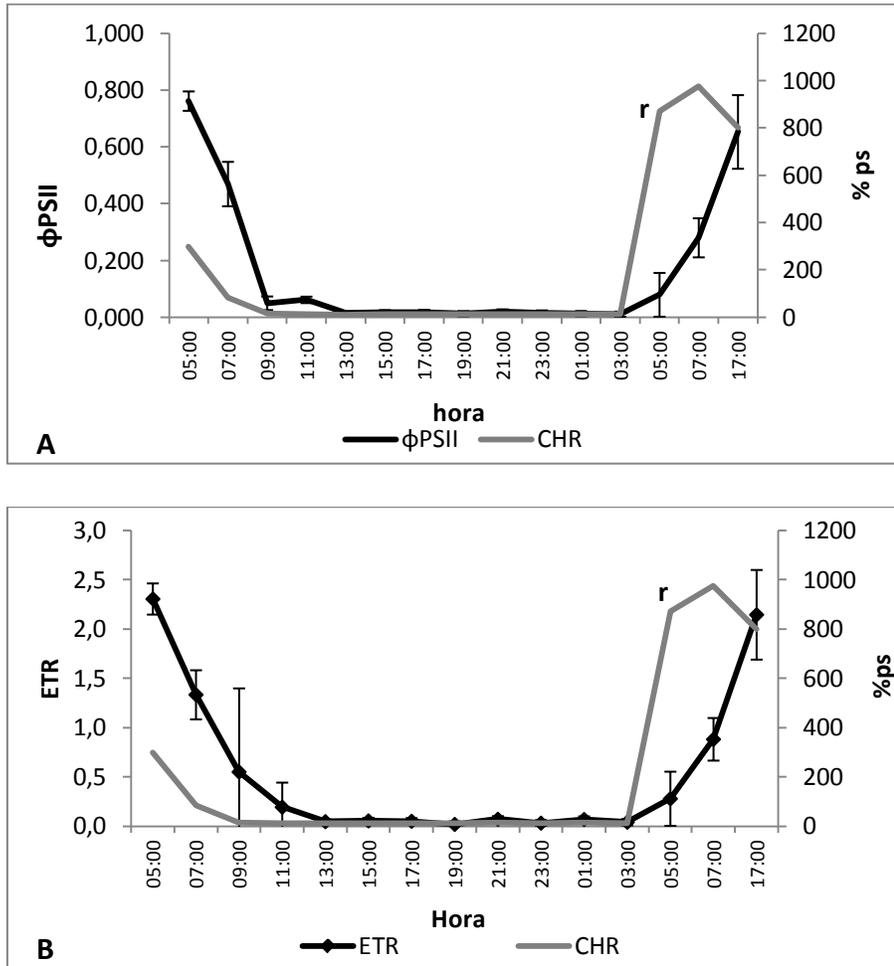
El rendimiento cuántico fotoquímico del fotosistema II (ϕ PSII) mostró una dependencia polinomial al CHR del musgo (Tabla 3-4). El ϕ PSII (Figura 3-5 A) presentó valores bajos de 0.01 a 0,06 cuando *P. schreberi* tenía CHR menores al 50%, los valores más altos fueron de 0,762 cuando el musgo se encontraba en estado normal de hidratación y de 0,08 en el momento de la rehidratación, hasta 0,65 12 horas después de la rehidratación, muy cercano al valor registrado en el estado de hidratación sin ningún tipo de estrés previo.

La tasa de transferencia de electrones (ETR) también determinada en condiciones de laboratorio presentó una dependencia del contenido hídrico relativo (Tabla 3-4). Los valores más bajos de ETR entre 0.2 y 0.04 se dieron cuando el contenido hídrico relativo de *P. schreberi* era inferior al 50%, mientras que cuando el musgo estaba en estado normal de hidratación sin ningún factor de estrés alcanzó valores de 2.3, y de 0.3 en el momento de la rehidratación y 2.1 después de 12 horas de rehidratado, similar al valor registrado en el estado de hidratación sin ningún tipo de estrés previo.

Tabla 3-4 Modelos de regresión para ϕ PSII y ETR en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

		R ²	p
ϕ PSII	$PSII = -2.97E-3 + 3.54E-3 *CHR - 3.54E-6 *CHR^2$	0.7875	0.0001
ETR	$ETR = 0.0231 + 0.0107 *CHR - 1.06E-5 *CHR^2$	0.7796	0.0001

Figura 3-5 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en (A) rendimiento cuántico fotoquímico (ϕ PSII) y (B) la tasa de transporte de electrones (ETR) de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. (r) Rehidratación. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha=5\%$.



3.3.2 Fotosíntesis

La curva de luz de *Pleurozium schreberi* (Figura 3-6) proveniente del Páramo de Chingaza y mantenido bajo condiciones óptimas (Numeral 1.2.3), dio los siguientes valores según el modelo de Mitscherlich:

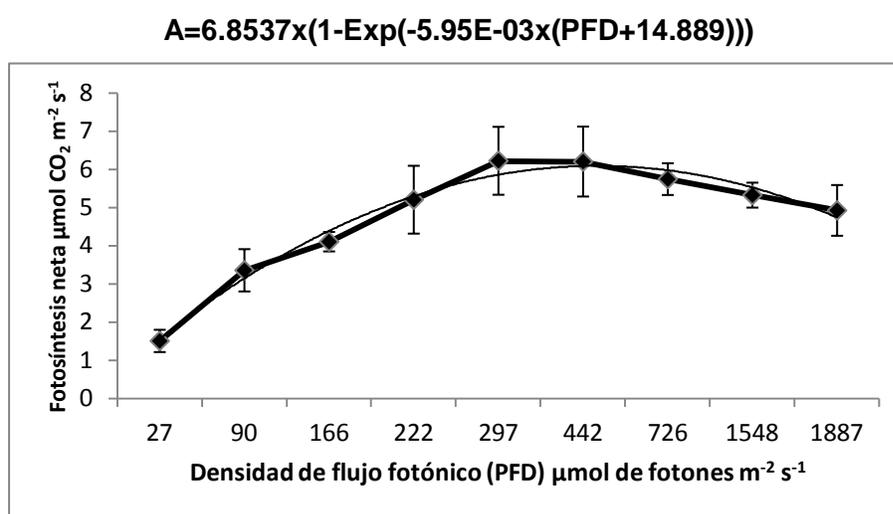
Fotosíntesis máxima: 6.8537

Eficiencia fotosintética: 5.95 E-03

Punto de compensación lumínico: 14.889

P. schreberi presentó un punto de saturación de luz promedio de $300 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, aunque no existen registros en literatura para esta especie, muestra una adaptación a sitios expuestos (páramo) ya que el promedio de briófitos de sitios sombríos es de $500 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, y musgos de hábitats expuestos presentan valores menores (Marschall y Proctor 2004).

Figura 3-6 Curva de luz de *P. schreberi*. Ajuste al modelo de Mitscherlich. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha = 5\%$. Seudo $R^2 = 0.9741$. Línea en negrilla datos observados, línea delgada datos calculados.

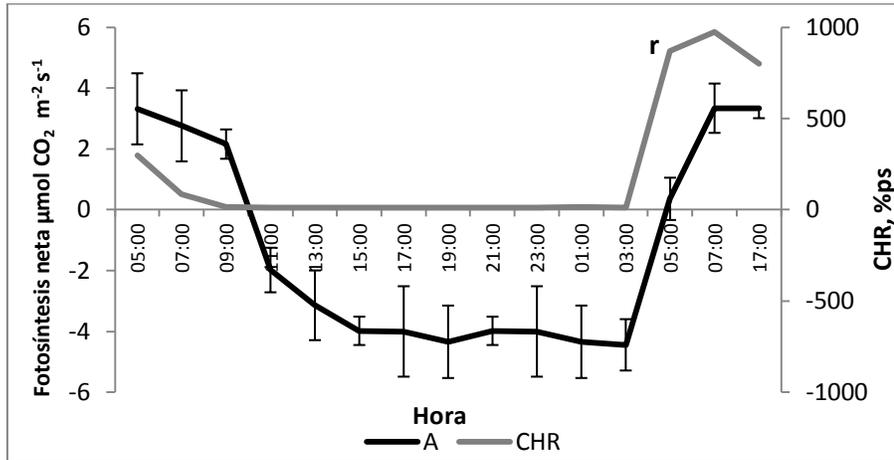


En la Figura 3-7 la fotosíntesis neta (A) de *P. schreberi* cuando se encontraba en condiciones óptimas de hidratación fue de $2,7 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, descendiendo a medida disminuye el CHR del musgo llegando a valores de 0 cuando el CHR es menor de 20%. En el momento de la rehidratación la fotosíntesis empezó a activarse registrando valores bajos de $0,3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, y una hora después presentó tasas de $3,34 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ manteniéndose incluso 12 horas después, muy cercano a lo registrado cuando el musgo está en condiciones de hidratación sin ningún tipo de estrés previo. La fotosíntesis neta presento una relación directa con el CHR (Tabla 3-5).

Tabla 3-5 Modelo de regresión para fotosíntesis neta en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

		R^2	p
A	$A = -3.2339 + 0.0286 * \text{CHR} - 2.48E-5 * \text{CHR}^2$	0.5541	0.0000

Figura 3-7 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en la fotosíntesis neta (A) de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. (r) Rehidratación. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha= 5\%$.



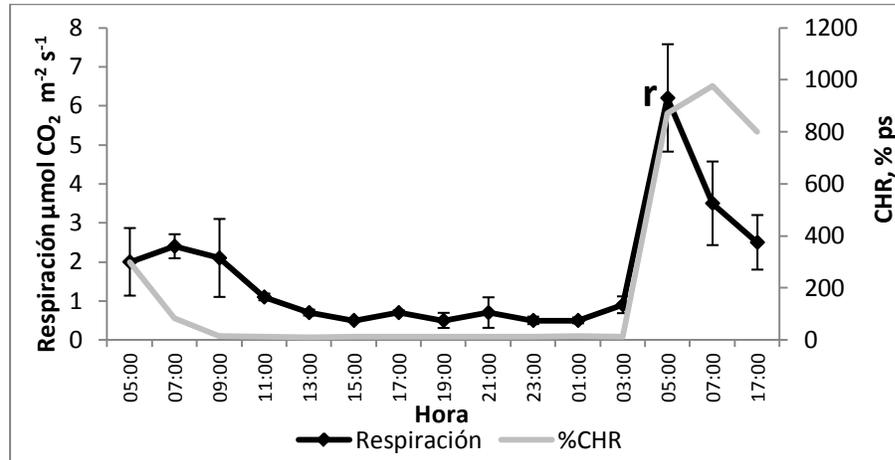
3.3.3 Respiración

La tasa de respiración de *P. schreberi* (Figura 3-8) cuando se encontraba bajo condiciones óptimas de hidratación en el laboratorio fue de $2.0 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Una vez iniciado el proceso de deshidratación, la tasa de respiración aumentó a 2.4 en las primeras 4 horas para luego disminuir drásticamente, a un valor promedio de $0.6 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. En el momento de la rehidratación la tasa aumentó a un valor de 6.2 rápidamente, para luego caer a valores promedio de 3.5 a las 2 horas y $2.5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a las 12 horas de haber empezado la rehidratación, siendo este dato muy cercano al registrado cuando el musgo está en condiciones de hidratación sin ningún tipo de estrés previo. La tasa de respiración tuvo un comportamiento lineal en función del CHR del musgo (Tabla 3-6):

Tabla 3-6 Modelo de regresión para respiración en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

		R ²	p
RESPIRACIÓN	Respiraci = $0.8868 + 3.64E - 3 * \text{CHR}$	0.6848	0.0001

Figura 3-8 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en la respiración de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. (r) Rehidratación. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha=5\%$.



3.4 Discusión

Este estudio muestra que la fluorescencia de la clorofila es altamente susceptible al contenido hídrico de *P. schreberi*, permitiendo utilizarse como herramienta para determinar la eficiencia fotosintética bajo condiciones de estrés, aspecto que ha sido mencionado en varios estudios realizados con musgos de zonas templadas o árticas (Robinson *et al.* 2000).

Las figuras de fluorescencia de la clorofila (F_o , F_m , F_v/F_m) en campo, muestran que ésta varía en relación al contenido hídrico a través del día y su comportamiento es diferente dependiendo la temporada en la época seca.

En el inicio de la época seca (temporada 1) cuando se presenta niebla en horas de la madrugada el musgo aprovecha los pocos momentos de humedad alta en el aire y su superficie para absorber el agua que utilizará en procesos metabólicos como la fotosíntesis, la cual se activa en todos los casos entre las 7 a las 9 de la mañana, lo que se muestra por el aumento de la eficiencia fotosintética, para luego detenerse por la deshidratación. En este lapso corto él tendría que producir y acumular los fotosintatos necesarios para sobrevivir el período seco de aproximadamente 16 horas hasta llegar a la niebla de la siguiente madrugada, y ese sería su comportamiento de supervivencia en

épocas secas normales (cuando no se presenta el fenómeno “el Niño”) en el páramo. En estudios realizados en el musgo *Tortula ruralis* se encontró que una característica de las plantas tolerantes a la deshidratación es su capacidad de aprovechar metabólicamente los pocos momentos de humedad por rocío o niebla (Tuba *et al.* 1996), Un aspecto a resaltar es que los valores registrados para F_o fueron en general mayores en comparación con las plantas en estado óptimo del laboratorio, indicando un posible desacoplamiento o reorganización de la clorofila en la base de la antena del fotosistema, fenómeno que se genera bajo condiciones de estrés para proteger los fotosistemas de altas radiaciones o estrés hídrico (Ritchie 2006), esto explicaría por qué los valores pico de F_v/F_m y F_m se presentan dos horas después de iniciada la rehidratación, posiblemente es el tiempo aproximado que tardaría los fotosistemas en retomar su configuración normal. Teniendo en cuenta que en época seca se presentan los registros más altos de radiación, especialmente durante las horas del medio día y tarde, el musgo puede desacoplar la base de las antenas de los fotosistemas como una forma de fotoprotección aunque también se puede presentar un efecto de fotooxidación, y esto explicaría por qué los valores de F_v/F_m no alcanzan durante la rehidratación los rangos normales de 0.7 en promedio, por otra parte los momentos de rehidratación en horas de la madrugada con temperaturas muy bajas lo que también disminuye la eficiencia fotosintética (Deltoro *et al.* 1999). En las horas de bajo contenido hídrico la eficiencia fotosintética decae fuertemente mostrando un cese de toda actividad fotosintética, en parte como consecuencia de los estados de deshidratación tan altos y como protección del fotosistema contra la alta radiación.

En la temporada 2, a mediados de la época seca, los musgos se ven expuestos a días totalmente secos debido a que no se presenta momentos de humedad relativa alta o niebla que permitan a los musgos tomar agua. En esta temporada los musgos se ven expuestos a varias condiciones de estrés a las cuales deben sobrevivir, como son: bajos potenciales hídricos, alta radiación solar en especial UV, fuertes vientos, altas temperaturas en horas de la tarde y temperaturas cercanas a cero en horas de la madrugada (Montenegro *et al.* 2005). En las mediciones de fluorescencia de la clorofila a se observa que la eficiencia fotosintética disminuye fuertemente, hasta el punto de considerar un cese de fotosíntesis durante las 24 horas del día. Los valores de F_o permanecen altos pero sin variaciones significativas mientras que los valores de F_m y F_v/F_m son mínimos e igual no presentan variaciones significativas a lo largo del día, lo

que muestra un estado de latencia por parte del musgo para sobrevivir esta temporada de estrés hídrico fuerte. Durante la temporada se observó formación de escarcha sobre la superficie de los musgos lo que se ve reflejado en los valores más bajos para F_o y F_m casi cercanos a cero, consecuencia por la inhabilitación del metabolismo por congelamiento; sin embargo, los musgos deben presentar algún tipo de protección para evitar daño a la integridad celular.

Los musgos en páramo están expuestos a niveles de radiación altos y en época seca la mayor parte de las horas luz no presentan nubes, y como anatómicamente no hay variaciones significativas en la sencillez de sus filidios, la mayoría de los briófitos tolerantes a la deshidratación lo son también a las altas radiaciones, como el caso del musgo *T. ruralis*. Un posible factor sería la formación de complejos estables de clorofila-xantofilas, para la disipación de la energía (Hamerlynck *et al.* 2002). Tobias y Niinemets (2010) investigando sobre adaptaciones de *P. schreberi* a diferentes gradientes de luz en bosques de estación, encontraron una amplia plasticidad de esta especie en relación al contenido de clorofila y la relación clorofila/nitrógeno, para mejorar la captación de luz en sitios sombríos y mayor capacidad de fotoprotección en sitios expuestos.

En la tercera temporada a finales de la época seca, llegan de nuevo las lluvias y los musgos se recuperan después de un prolongado período de déficit hídrico donde permanecieron en una forma de latencia para sobrevivir. La F_m y la F_v/F_m tienen valores bajos al inicio del ciclo por el estado deshidratado del musgo, manteniendo una eficiencia fotosintética baja y por lo tanto una fotosíntesis cercana a cero. En ambos parámetros al tiempo que el musgo absorbe el agua de la lluvia la eficiencia fotosintética aumenta. Sin embargo, una muestra del posible daño de los fotosistemas después de un prolongado período de déficit hídrico son los valores de F_o que son altos en comparación con un *P. schreberi* en condiciones normales, y que F_v/F_m no alcanza valores óptimos y se estabiliza en las primeras horas de rehidratación en 0,27 en promedio, muy bajo para una planta sin estrés. También se puede ver el efecto sobre los fotosistemas de la rehidratación, que en muchos casos en especial después de fuertes períodos de estrés hídrico, puede resultar en un daño mayor por la liberación explosiva de radicales de oxígeno (ROS) (Proctor y Smirnoff 2000).

Se ha encontrado en varios trabajos que los bajos valores de F_v/F_m que se registran en musgos cuando se encuentran deshidratados son característicos de plantas altamente

tolerantes a la deshidratación (Hamerlynck *et al.* 2002). Además en musgos tolerantes a la deshidratación como *Racomitrium lanuginosum*, *Anomodon viticulosus* y *Rhytidiadelphus loreus* se ha observado que el valor de Fv/Fm aumenta cuando inicia la rehidratación, pero llega a valores normales (promedio 0,7) horas después (Proctor y Smirnoff 2000), similares resultados en musgos de la zona antártica estresados por deshidratación, donde se observó que a pesar de que en pocos minutos se reactivaba la eficiencia fotosintética alcanzaba valores normales varias horas o días después (Schlensog *et al.* 2004).

El hecho de que *P. schreberi* recupere su eficiencia fotosintética en los primeros minutos de la rehidratación, incluso después de prolongadas períodos de déficit hídrico (días o semanas), muestra su capacidad de tolerancia a la deshidratación, si se tiene en cuenta que además tuvo períodos donde perdió más del 90% de su contenido hídrico. Esto le permite a *P. schreberi* ser una planta exitosa en páramos y aprovechar los momentos de poca de agua para conquistar nuevos espacios o sobrevivir cuando ésta escasea. Varios trabajos han mostrado esta estrategia como una forma de explicar una amplia distribución de las especies de briófitos (Tobias y Niinemets 2010, Cleavitt 2002, Robinson *et al.* 2000).

La oportunidad que tiene *P. schreberi* al inicio de la época seca de tener ciclos de deshidratación – rehidratación cada 24 horas (por la niebla en la madrugada) puede facilitar al musgo un endurecimiento que le permita sobrevivir y proteger los aparatos fotosintéticos para las temporadas más fuertes de la época seca. En varias investigaciones se ha encontrado una mayor supervivencia cuando los musgos tienen una período de endurecimiento por exposiciones cortas a factores de estrés como en *Leucodon sciuroides* bajo estrés por congelamiento (Deltoro *et al.* 1999) o *Tortula inermis* bajo estrés por deshidratación (Stark *et al.* 2007).

En laboratorio bajo condiciones controladas se midió el efecto de la deshidratación sin factores adicionales como estrés por radiación o estrés por extremos de temperatura. La ETR, la ϕ PSII y la fotosíntesis neta tuvieron un comportamiento similar, disminuyendo a medida el musgo perdía contenido hídrico, y deteniendo todo proceso de fijación de CO₂ o transporte de electrones cuando el contenido hídrico relativo era inferior al 20%. Los mismos parámetros empezaron a recuperarse en el momento que inició la rehidratación, alcanzando a las dos horas los valores normales y siguieron manteniéndose 12 horas

después. Sin embargo, hay una más lenta recuperación de la ETR en comparación con la Fv/Fm y la A. Comportamientos similares se han reportado para varios musgos incluido *Polytrichum formosum* que es endohídrico y evita la evaporación del agua interna (Proctor *et al.*, 2007).

Similares resultados a los obtenidos en esta investigación se han encontrado en otros musgos tolerantes a la deshidratación, donde ϕ PSII se recupera más lento que la Fv/Fm; sin embargo, en cuestión de horas está en valores normales (Proctor y Smirnov 2000). En investigaciones realizadas con el musgo tolerante a la deshidratación *Tortula ruralis* se encontró que el ϕ PSII en condiciones de estrés es protegido por aumento del quenching no fotoquímico NPQ, en especial cuando se exponen a altas radiaciones (Hamerlynck *et al.* 2002).

Tanto las ETR como la fotosíntesis después de la rehidratación en laboratorio toman tiempos similares para alcanzar los valores de recuperación y reactivación, lo que puede indicar que en los momentos de deshidratación se tiene una reserva de energía para activar la fijación de CO₂ mientras se activa el sistema de transporte de electrones. En investigaciones realizadas con musgos tolerantes a la deshidratación se ha encontrado lo opuesto, asociado a hábitats de sombra (Proctor y Smirnov 2000). La protección del aparato fotosintético a la deshidratación se puede alcanzar por lo menos parcialmente por el empleo de vías disipativas no radiactivas de la luz absorbida e involucra un incremento en el calor de desactivación de excitones en la antena, lo que disminuye la entrega de energía de excitación a los centros de reacción sensibles (Deltoro *et al.* 1999)

P. schreberi presentó una curva de luz característica de plantas C3, y de musgos adaptados a sitios abiertos con exposición directa a la luz, resultados similares se encontraron en briófitos de hábitats expuestos a altas radiaciones (Proctor y Smirnov 2000), lo cual muestra su adaptación a las fuertes condiciones de páramo porque en zonas templadas esta especie abunda en el suelo y dosel de bosques, incluso su cloroplasto es de especies de sombra ya que presenta grana gruesa, como la mayoría de los musgos (Tobias y Niinemets 2010, Marschall y Proctor 2004).

Hay indicios que la fijación de CO₂ es más sensible a la deshidratación que la fotoquímica primaria, por lo que la disipación de energía no radiactiva podría ser un importante factor de tolerancia a la deshidratación (Csintalan *et al.* 1999)

En varios musgos tolerantes a la deshidratación se muestra un sistema de protección del aparato fotosintético más que un sistema de reparación, ya que la reanudación de la fotosíntesis se da inmediatamente se inicia la rehidratación, a pesar de que llega a los valores normales puede tomar algunas horas, a estos musgos se llaman de “baja inercia” (Stark *et al.* 2007, Schlensog *et al.* 2004, Proctor 2000, Proctor y Smirnoff 2000, Tuba *et al.* 1996).

La recuperación rápida de los procesos fotosintéticos que se presentó en la primera temporada en el páramo y en las mediciones de laboratorio (ciclos de rehidratación cada 24 h), muestra de forma indirecta que durante la deshidratación los fotosistemas y los cloroplastos permanecen intactos, por lo menos para períodos cortos de déficit hídrico como el presentado en condiciones de laboratorio, al igual que los sistemas metabólicos. Resultados similares se han encontrado para briófitos tolerantes a la deshidratación donde se ha observado que se mantiene la integridad de la membrana de los cloroplastos y la estructura de los tilacoides. (Proctor *et al.* 2007, Proctor y Smirnoff 2000, Deltoro 1999). Sin embargo, para los valores obtenidos en la temporada tres de la época seca después de varios días de absoluta carencia de agua y contenidos hídricos relativos inferiores al 20% no sería igual y la planta cuando inicia la rehidratación también tendría que iniciar procesos de reparación. En este último caso se habla de un mecanismo de reparación basado en la tolerancia a la deshidratación en briófitos en el contexto de la recuperación de la función normal de las membranas celulares, las cuales presentan fugas de iones y metabolitos inmediatamente inicia la rehidratación (Proctor *et al.* 2007).

A las especies que pueden restaurar rápidamente las funciones fotosintéticas después de un período de estrés hídrico se les denomina “organismos fotosintéticos poiquilohídricos” y es una condición para ser tolerantes a la deshidratación (Nabe *et al.* 2007).

La tasa de respiración presenta un incremento fuerte inmediatamente después de la rehidratación, fenómeno conocido como “re-saturación de la respiración” y ha sido reportado para varios briófitos, pero sus mecanismos subyacentes no son muy conocidos, una posible explicación sería un aumento en la demanda de energía debido a los procesos de reparación y/o un gran aumento de los sustratos respirables seguido del daño de membrana causado por el déficit hídrico (Schlensog *et al.* 2004).

En las especies de musgos tolerantes a la deshidratación *Tortula ruralis*, *Grimmia pulvinata* y *Andreaea rothii*, análisis de gases infrarrojo han mostrado una activación inmediata de la respiración en el momento que inicia la rehidratación (Proctor *et al.* 2007, Csintalan *et al.* 1999), en muchos casos asociado a la reparación de los daños causados por el período de estrés (Stark *et al.* 2007).

3.5 Conclusiones

Pleurozium schreberi es una planta tolerante a la deshidratación, lo cual se comprueba por sobrevivir a pérdidas del contenido hídrico relativo mayores al 90% por períodos superiores a dos semanas, y la capacidad de reactivar la fotosíntesis inmediatamente se inicia la rehidratación, después de un período de deshidratación.

Cuando el período de deshidratación es corto menor a 24 horas, tanto en páramo como en laboratorio el sistema de protección del aparato fotosintético permite alcanzar valores normales en las horas subsiguientes a la rehidratación, pero si el período de deshidratación es prolongado como ocurre en páramo hacia finales de la época seca al momento de la rehidratación también es necesario la reparación de los fotosistemas.

En *P. schreberi* en todas las variables relacionadas con la eficiencia fotosintética le toma varias horas alcanzar los valores normales después de la rehidratación.

P. schreberi presenta un aumento grande en la tasa de respiración en el instante en que inicia la rehidratación asociado a procesos de reparación, en las horas siguientes retorna a sus valores normales.

P. schreberi bajo condiciones de deshidratación extrema detiene todo proceso fotosintético y disminuye su tasa de respiración a niveles cercanos a cero, entrando en un estado de dormancia mientras recupera el contenido hídrico.

Para entender mejor el funcionamiento de este musgo en el ecosistema páramo en época seca se necesita realizar mediciones de NPQ y tasas de fotosíntesis y respiración. Y bajo condiciones de laboratorio establecer las condiciones de recuperación bajo deshidratación lenta y rápida, complementada con estudios de ultraestructura de los cloroplastos y mitocondrias para establecer su estado durante la deshidratación. En ambos casos se requiere el estudio de los complejos de protección de clorofila y xantofilas u otros pigmentos.

4. CONTENIDO DE PROTEÍNAS TOTALES Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ESPECÍFICA DE PEROXIDASA Y CATALASA EN *Pleurozium schreberi* DURANTE LA ÉPOCA SECA EN PÁRAMO Y BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE DÉFICIT HÍDRICO EN LABORATORIO

4.1 Introducción

Los briófitos no poseen las características estructurales de las plantas vasculares para protegerse de condiciones ambientales desfavorables, sin embargo muestran una gran resistencia a condiciones de estrés con eficientes mecanismos fisiológicos y moleculares (Christov y Bakardjieva 1998).

La deshidratación en los musgos es un proceso rápido y su tolerancia se manifiesta en su capacidad de rehidratación y recuperación de los procesos metabólicos normales; esto es porque presentan un mecanismo eficiente basado en reparación (Christov, 1998; Proctor y Tuba, 2002). En las plantas, como un resultado del estrés se presenta una formación anormal de especies reactivas de oxígeno (ROS) provenientes de los electrones en los fotosistemas y otros desórdenes bioquímicos, los cuales son altamente tóxicos llegando incluso a matar las células (Christov, 1998; Blokhina *et al.*, 2002).

En los briófitos se ha estudiado la producción extracelular del ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), encontrándose amplia diferencia entre especies que se relacionan con la habilidad de tolerar el estrés por deshidratación. Las especies de hepáticas que crecen en sitios húmedos y sombreados (poco tolerantes a la deshidratación) producen altas tasas de $O_2^{\cdot-}$, aún estando bajo condiciones no estresantes; además muestran una gran explosión oxidativa ("burst oxidative") durante la rehidratación después de un período de deshidratación. También se ha encontrado en algunos musgos que cuando empieza la

rehidratación se produce más peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que O_2^- (Mayaba *et al.*, 2002).

Atrichum androgynum, un musgo medianamente tolerante a la deshidratación, presenta una explosión oxidativa de H_2O_2 durante la rehidratación después de un período de deshidratación. En este caso, la concentración de H_2O_2 es suficiente para resultar tóxica ante patógenos invasores. Este H_2O_2 es producido por enzimas extracelulares (peroxidasas de la pared celular) y por fuentes intracelulares teniendo en cuenta la capacidad del peróxido de atravesar las membranas (Mayaba *et al.*, 2002)

El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) no puede atravesar las membranas celulares y además tiene un vida media muy corta, esto hace que su producción a partir de una explosión oxidativa se deba a enzimas externas a la membrana o por las presentes en las paredes celulares (Minibayeva y Beckett, 2001). En un trabajo con 20 especies de musgos y líquenes, se encontró que la mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ después de la rehidratación se presentaba en las especies de ambientes húmedos (poco tolerantes), clasificando a los briófitos en cuatro grupos:

- Briófitos con una tasa basal de producción de superóxido baja (menor a $5 \mu\text{mol g}^{-1}$ de materia seca h^{-1}) y no presenta ninguna explosión oxidativa inducida por la deshidratación, por lo general están los musgos y la hepática foliosa *Plagiochila natalensis* (tolerante a la deshidratación).
- Briófitos con una tasa basal de producción de $O_2^{\cdot-}$ de intermedia a alta ($36\text{-}126 \mu\text{mol g}^{-1}$ ps h^{-1}) pero no presenta una explosión oxidativa, incluye especies medianamente tolerantes a la deshidratación.
- Briófitos con tasas basales de producción de $O_2^{\cdot-}$ moderadas a altas ($32\text{-}377 \mu\text{mol g}^{-1}$ ps h^{-1}) y una fuerte explosión oxidativa incrementando de 174 a 562% en comparación con individuos no estresados, en este grupo se encuentra especies de antoceros (*Anthoceros natalensis*) y hepáticas talosas (*Dumortiera hirsuta*)
- Por último un grupo pequeño que tiene una tasa basal de producción de superóxido baja a intermedia ($28 \mu\text{mol g}^{-1}$ ps h^{-1}), pero la tasa de producción de superóxido incrementa durante 20 min después de la hidratación, ahí se encuentra la hepática talosa *Pellia epiphylla* (Minibayeva y Beckett, 2001).

La deshidratación en presencia de luz puede ocasionar un incremento en la producción de oxígeno singlete, que es altamente destructivo, por transferencia de energía de excitación de la clorofila al oxígeno. Este efecto ha sido encontrado para el musgo *Dicranella palustris* que es no tolerante a la deshidratación y sugiere que una razón para que no se presente daño en el musgo tolerante *Tortura ruralis* puede ser que está protegido contra este tipo de fotodaño por una alta concentración de carotenoides que de clorofila (Seel *et al.* 1992, Oliver *et al.* 2000). Entre los principales daños causados por especies reactivas de oxígeno (ROS) en musgos son:

- Oxidación de los grupos sulfidril en las proteínas que conducen a la desnaturalización. En *T. ruralis* la pérdida de la capacidad de síntesis de proteínas durante la deshidratación se manifiesta en una pérdida de polisomas y de la maquinaria de síntesis proteica activa (Oliver *et al.*, 2000). La pérdida de polisomas resulta de la salida de ribosomas de mRNA acoplado con una interrupción en la habilidad para formar nuevos complejos de iniciación.
- Pérdida de pigmentos y daño al fotosistema.
- Peroxidación de lípidos y acumulación de ácidos grasos libres en las membranas. Se detecta por medición del malondialdehído. Se ha encontrado una disminución en la actividad lipoxigenasa durante la deshidratación de *T. ruralis*, indicando un mecanismo protector inherente en especies tolerantes (Oliver *et al.* 2000, Blokhina *et al.* 2003; Choudhury y Kumar 2005).

Los mecanismos de protección son de dos tipos y su acción es sinérgica:

- Enzimas responsables de disminuir la cantidad de radicales libres durante la deshidratación, tales como peroxidasa (POD), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD); junto con compuestos antioxidantes como ácido ascórbico, tocoferol, carotenoides y glutatión (GSH).
- Mecanismos que regeneran estos antioxidantes, glutatión reductasa, ascorbato peroxidasa, monoreductasas y dehidroreductasa (Takács *et al.* 1999; Oliver *et al.* 2000; Blokhina *et al.* 2002; Choudhury y Kumar 2005).

Los musgos tolerantes a la deshidratación no están exentos de los daños estructurales a nivel celular causados por la deshidratación y posterior rehidratación, lo que los diferencia de los musgos no tolerantes es su capacidad de reparación una vez retorna el

agua por la activación en la síntesis de proteínas y la protección otorgada por la presencia de proteínas protectoras como las del sistema antioxidante (Barón *et al.* 2009, Oliver 1991).

Entre estas enzimas se encuentra las peroxidasas vegetales (EC 1.11.1.7) generalmente llamadas como peroxidasas de la clase III, son proteínas que contienen un grupo heme codificadas por un gran número de genes parálogos y cataliza la reducción del H_2O_2 al tomar electrones de distintas moléculas donantes. Las peroxidasas también pueden oxidar otros sustratos para producir H_2O_2 y radicales OH^\cdot para producir una explosión oxidativa en el apoplasto, común en estados de rehidratación. Las peroxidasas también están implicadas en diversos procesos fisiológicos como control del metabolismo de auxinas, lignina, pared celular, defensa contra agentes patógenos y elongación celular (Passardi *et al.* 2004). Las peroxidasas vegetales son clasificadas en dos grupos: las peroxidasa que oxidan el sustrato con una función fisiológica como la lignificación y aquellas cuya función principal es degradar el H_2O_2 (Smirnov 1993). La POD ha sido utilizada en varias investigaciones para realizar monitoreo del estado de estrés de los musgos (Dey y Nath De 2012, Barón *et al.* 2009, Rau *et al.* 2007).

La catalasa convierte el H_2O_2 en H_2O y O_2 , se encuentra en los peroxisomas y glioxisomas donde remueve el H_2O_2 que es producido principalmente por fotorrespiración y β -oxidación de ácidos grasos. Recientes investigaciones han dividido las CAT en diferentes grupos: catalasas clase I, expresadas en tejidos fotosintéticos y reguladas por la luz; catalasas clase II, expresadas en altos niveles en plantas vasculares; y catalasas clase III, asociadas a semillas y plántulas. Igualmente se reporta que los genes para las isoformas de catalasa son inducidos por estrés abiótico y por ABA (Smirnov 2005, Palma *et al.* 2002, Del Rio *et al.* 2002, Xiong y Zhu 2002, Racchi *et al.* 2001).

La hipótesis que enmarca el presente capítulo es: *P. schreberi* cuando entra en déficit hídrico y posteriormente en rehidratación, tanto en campo como en condiciones controladas de laboratorio, utiliza la peroxidasa y la catalasa para protegerse contra el daño oxidativo causado por el H_2O_2 . Para lo cual el objetivo que se desarrollo fue determinar la actividad enzimática específica de las enzimas peroxidasa y catalasa durante ciclos de deshidratación-rehidratación, en el Páramo de Chingaza (Colombia) y bajo condiciones controladas de laboratorio.

4.2 Metodología

4.2.1 Material vegetal

Las mediciones de campo y laboratorio se realizaron con el material vegetal descrito en el capítulo dos.

4.2.2 Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se determinó con base en la metodología de Mayaba y Beckett (2003) adecuada por Barón *et al.* (2009). El material vegetal fue liofilizado, se tomaron 0.02 g por cada muestra y se maceraron en nitrógeno líquido, se adicionó como solución de extracción 2 ml de buffer Tris/HCl 0.2M (pH 7,8) conteniendo NaEDTA 2 mM, β -marcaptoetanol 1 mM y PVP-40 2%. Se centrifugó a 8.000 rpm durante 20 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se utilizó para la determinación de proteínas totales y actividad enzimática de peroxidasa y catalasa.

4.2.3 Determinación de proteínas totales

El contenido de proteínas totales se determinó utilizando el método de Bradford (1976) modificado por Zor y Selinger (1996), utilizando BSA como patrón (1.45 mg/mL) y leyendo absorbancia a 590 nm y 450 nm (Anexo E). Para las lecturas de las muestras de páramo se utilizó un espectrofotómetro LAMDA35 Perkin Elmer de doble haz de luz y para el experimento en laboratorio un espectrofotómetro BIO-RAD Smartspec 3000.

4.2.4 Actividad enzimática específica de peroxidasa POD (EC: 1.11.1.7)

La actividad de POD fue medida espectrofotométricamente siguiendo la oxidación de guaiacol a tetraguaiacol (coeficiente de extinción $26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 470 nm durante 30 seg. La mezcla de reacción contenía buffer fosfato 20 mM (pH 7), H_2O_2 20 mM, guaiacol 20 mM y extracto enzimático (Chance y Maehly 1955, Barón *et al.* 2009). Para las muestras de páramo se utilizó un espectrofotómetro LAMDA35 Perkin Elmer de doble

haz de luz y para el experimento en laboratorio un espectrofotómetro BIO-RAD Smartspec 3000. Se determinó la actividad específica enzimática⁸.

4.2.5 Actividad enzimática específica de catalasa CAT (EC: 1.11.1.6)

La actividad de CAT se determinó por espectrofotometría a 240 nm mediante el consumo de H₂O₂ (coeficiente de extinción 39.4 mM⁻¹ cm⁻¹) durante 30 segundos. La mezcla de reacción contenía buffer fosfato 20 mM (pH 7), H₂O₂ 20 mM y extracto enzimático (Chance y Maehly 1955, Aebi 1984, Barón *et al.* 2009). Para las muestras de páramo se utilizó un espectrofotómetro LAMDA35 Perkin Elmer de doble haz de luz y para el experimento en laboratorio un espectrofotómetro BIO-RAD Smartspec 3000. Se determinó la actividad específica enzimática.

4.2.6 Análisis estadístico

Los datos se analizaron bajo un diseño experimental completamente al azar, con 5 replicas (cada una de las colonias) tanto para páramo como para laboratorio. Se elaboraron análisis de varianza para comparar las tres temporadas en páramo (inicio, mediados y final de la época seca), análisis de regresión lineal y regresión polinomial para todas las variables en función al contenido hídrico relativo, para determinar la relación y el modelo. El nivel de significancia fue del 95% y se utilizó el programa estadístico “Statistix 9”.

4.3 Resultados

4.3.1 Variación en el contenido de proteínas totales en páramo.

El contenido de proteína varió entre 5 y 6.5 mg proteína/g peso seco, durante el inicio de la época seca (Figura 4-1) cuando el musgo se encontraba hidratado por presencia de la niebla. Se observó que durante el día con el inicio de la deshidratación el contenido de

⁸ Se define la **unidad de actividad enzimática** (U) como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato en un minuto a 25°C bajo condiciones óptimas de medición. El término actividad se refiere al total de unidades enzimáticas en una solución. La **actividad específica** es el número de unidades de enzima por miligramo de proteínas totales (U/mg prot) o por mililitro de disolución (U/ml). Nelson y Cox (2005).

proteína aumentó hasta alcanzar valores promedio de 8 a 8.4 mg proteína/g peso seco en horas de la tarde, para luego empezar a disminuir en horas de la noche. En general se observa una tendencia inversa con respecto al CHR.

Para mediados de la época seca (Figura 4-1 B) el contenido de proteína disminuyó en general en comparación con la temporada anterior. Cuando el musgo alcanzó el máximo de CHR (86% ps) en horas de la madrugada presentó valores promedio de 3.3 mg de proteína/g peso y empezó a aumentar al tiempo que la planta se iba deshidratando durante el día, llegando a un promedio de 6.4 mg proteína/g peso seco hacia medio día y volvió a disminuir en horas de la noche. El CHR en esta temporada fue muy bajo a través de todo el día lo que implica un cambio en el contenido de proteínas asociado también a la radiación solar y demás factores ambientales. Con CHR igualmente bajos disminuyó el contenido de proteínas de noche y aumento cuando la radiación es más alta en el día (Tabla 1-3).

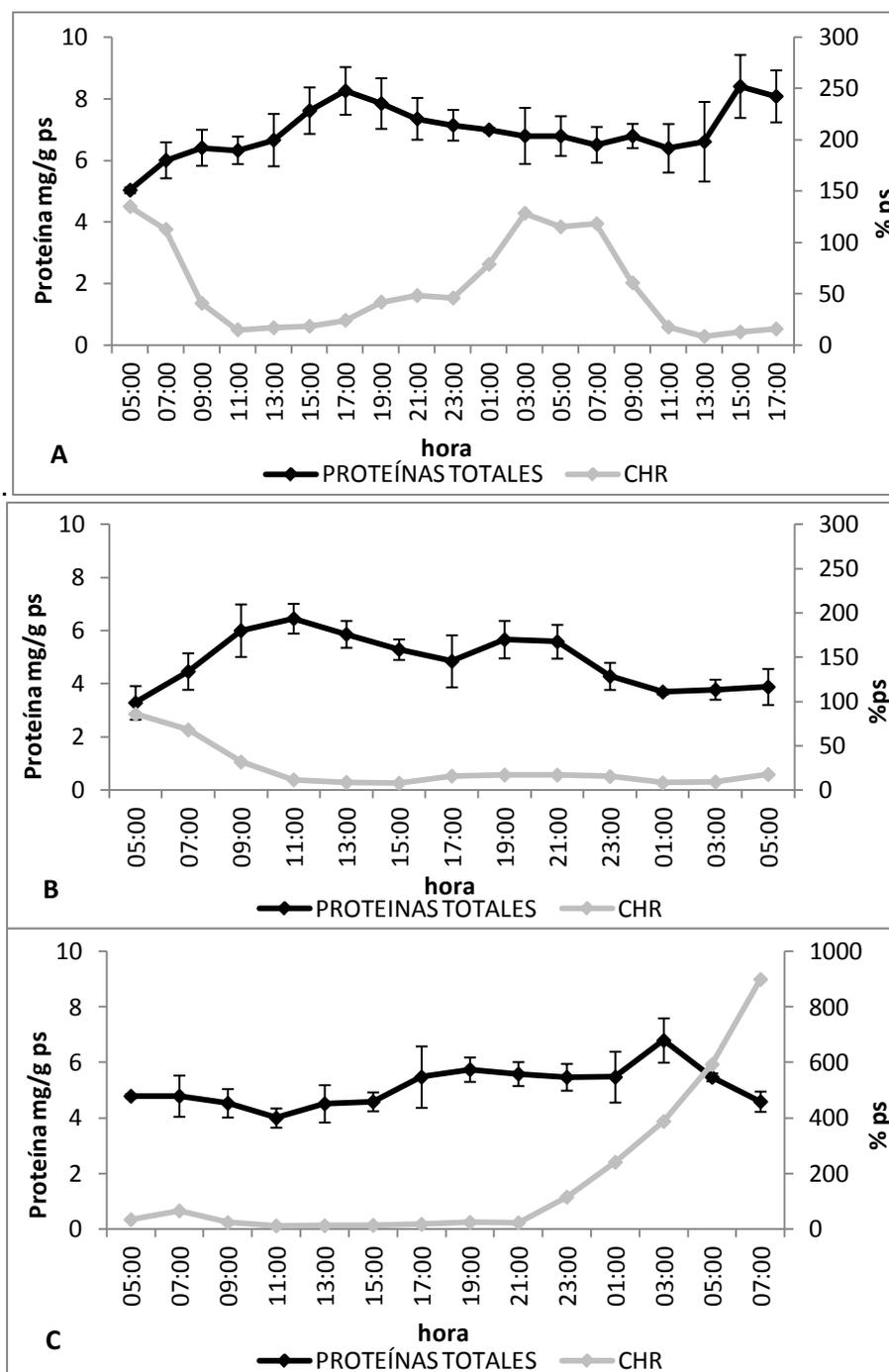
Para finales de la época seca (Figura 4-1 C) se observó que aumenta el contenido de proteína con el aumento del CHR presentando una regresión altamente significativa (Tabla 4-1). Mientras la planta estuvo deshidratada presentó un contenido de proteínas promedio de 4 a 5 mg proteína/g peso seco, y empezó a aumentar con la llegada de las lluvias hasta alcanzar un promedio de 7 mg proteína/g peso seco, seis horas después de iniciada la rehidratación volvió a descender el contenido de proteínas.

El análisis de varianza para proteínas totales en las tres temporadas de la época seca dio diferencias altamente significativas (Anexo C) mostrando efectos diferentes a medida aumenta el tiempo de exposición del musgo al déficit hídrico (en días) o cuando empieza a salir del mismo por la llegada de las primeras lluvias. Aunque la regresión (Tabla 4-1) para las dos primeras temporadas dio altamente significativa para la relación proteínas totales-CHR, los R^2 son bajos para un comportamiento lineal o polinomial.

Tabla 4-1 Modelos de regresión para proteínas totales en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

		R^2	p
Inicio de la época seca	$PROT = 7.5363 - 0.0104 * CHR$	0.1480	0.0063
Mediados de la época seca	No significativo	0.0817	0.0665
Final de la época seca	$PROT = 4.8829 + 5.67E - 3 * CHR$	0.4404	0.0000

Figura 4-1 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de proteínas totales de *P. schreberi*, en un ciclo de 24 horas en el Páramo de Chingaza, **A** inicio de época seca, **B** mediados de época seca y **C** finales de época seca. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha=5\%$



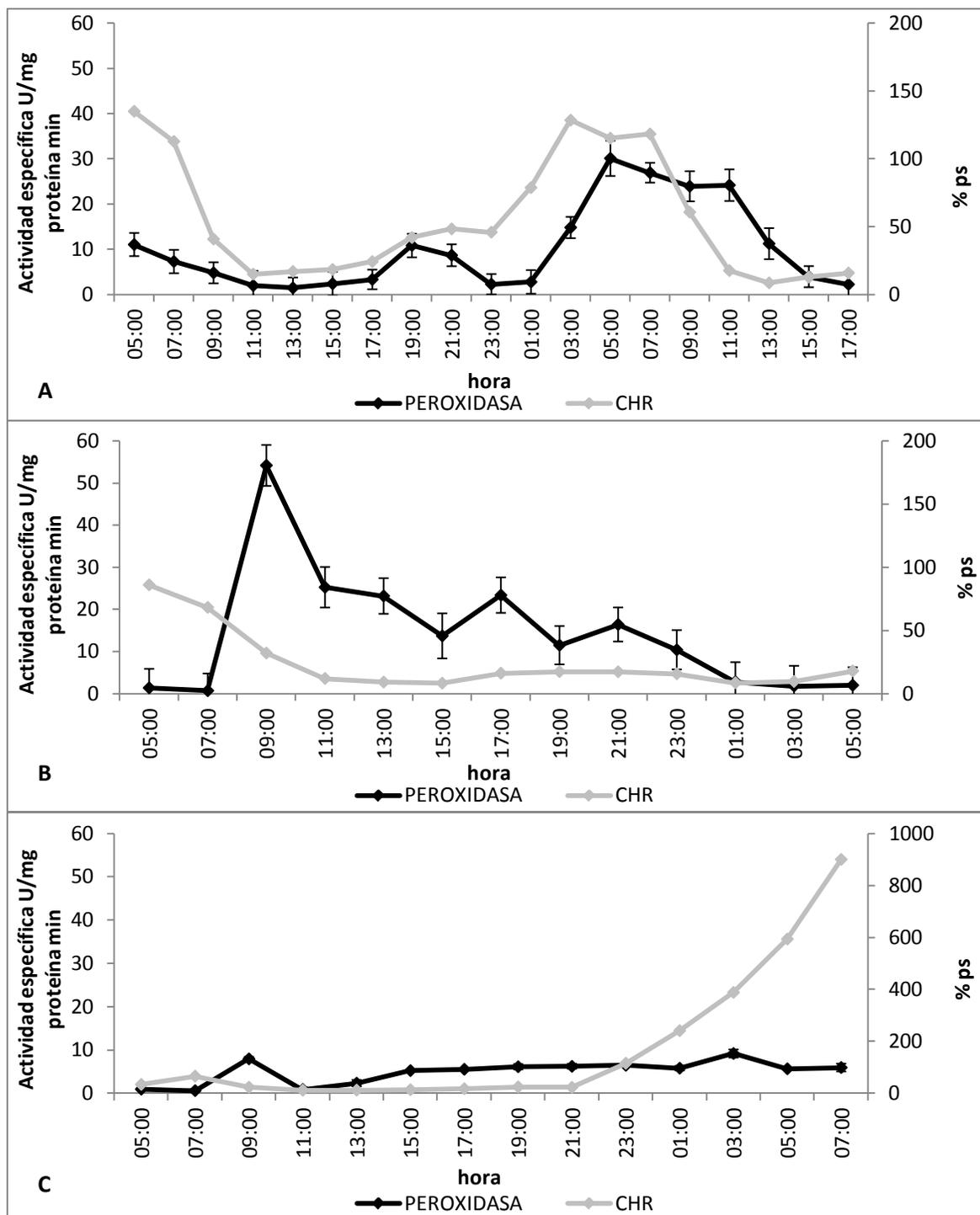
4.3.2 Actividad enzimática específica de peroxidasa POD en páramo.

Al inicio de la época seca (Figura 4-2 A) la actividad enzimática específica de POD fue de 10 UAE mg prot⁻¹ min⁻¹ cuando *P. schreberi* alcanzó un máximo de CHR de 135 %ps a las 5:00 h, después desciende a valores promedios de 2 UAE mg prot⁻¹ min⁻¹ durante las horas de mayor déficit hídrico. Con la llegada de la niebla a la madrugada siguiente (3:00 h) aumentó la actividad hasta valores promedio de 30 UAE mg prot⁻¹ min⁻¹, dos horas después de haberse iniciado la rehidratación y su efecto permanece 4 horas después de iniciado el siguiente ciclo de deshidratación. En general, se observa la misma tendencia del CHR con la actividad enzimática, presentando una regresión altamente significativa (Tabla 4-2).

A mediados la época seca (Figura 4-2 B) la actividad enzimática específica alcanzó su máximo dos horas después de iniciada la rehidratación de la madrugada (5:00 h) con valores promedio de 54 UAE mg prot⁻¹ min⁻¹ y empezó a disminuir a medida el musgo se deshidrataba hasta llegar a valores promedio de 1.5 UAE mg prot⁻¹ min⁻¹, 16 horas después. En general, se observa que en las horas de mayor radiación y por lo tanto menor CHR la actividad de la enzima POD es mayor que en la temporada anterior. La regresión actividad específica-CHR es altamente significativa y en general presentan la misma tendencia (Tabla 4-2).

En la tercera temporada al finalizar la época seca (Figura 4-2 C) después de que el musgo estuvo varias semana con CHR inferiores al 20% ps, la actividad de POD es muy baja con promedios de 0.5 UAE mg prot⁻¹ min⁻¹. Se observó un ligero aumento con la llegada de las lluvias y la rehidratación del musgo, alcanzando un máximo de 10 UAE mg prot⁻¹ min⁻¹ dos horas después de iniciada la rehidratación para luego caer a valores promedios de 5.7 UAE mg prot⁻¹ min⁻¹. La regresión actividad específica-CHR dio altamente significativa, mostrando la misma tendencia entre las dos variables (Tabla 4-2).

Figura 4-2 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en la actividad enzimática específica de peroxidasa en *P. schreberi*, en un ciclo de 24 horas en el Páramo de Chingaza, **A** inicio de época seca, **B** mediados de época seca y **C** finales de época seca. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha=5\%$



El análisis de varianza para POD en las tres temporadas de la época seca (Anexo C) dio diferencias altamente significativas mostrando efectos diferentes a medida aumenta el tiempo de exposición del musgo al déficit hídrico (en días) o cuando empieza a salir del mismo por la llegada de las primeras lluvias.

Tabla 4-2 Modelos de regresión para peroxidasa en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

		R ²	p
Inicio de la época seca	POD = -1.4811 + 0.1538 * CHR	0.4542	0.0000
Mediados de la época seca	POD = 28.561 - 2.6457 * CHR + 0.1069 * CHR ²	0.6061	0.0000
Final de la época seca	POD = 3.7466 + 0.0320 * CHR - 6.13E-5 * CHR ²	0.4562	0.0000

4.3.3 Actividad enzimática específica de catalasa CAT en páramo

Al inicio de la época seca (Figura 4-3 A) la actividad enzimática específica de CAT se expresó principalmente cuando la planta se encontraba deshidratada, alcanzando valores promedios de 14 a 17 UAE mg prot⁻¹ min⁻¹ cuando el musgo tenía CHR inferiores al 20% y en las horas de mayor radiación solar. En horas de la madrugada (3:00 a 5:00) cuando la planta se hidrató con la niebla los valores de CAT descendieron a promedios de 2 a 3 UAE mg prot⁻¹ min⁻¹. Se observa una tendencia inversa entre CHR y la actividad de CAT, la regresión dio altamente significativa (Tabla 4-3).

A mediados de la época seca (Figura 4-3 B) se observa que la actividad de CAT aumentó su actividad en los momentos de mayor deshidratación, pero también a medida avanzaban las horas de exposición a la deshidratación. Es así como cuando la planta disminuyó a un CHR inferior a 20% la actividad de CAT subió a 10 UAE mg prot⁻¹ min⁻¹, y después de 12 horas de permanecer deshidratada alcanzó un valor promedio de 23 UAE mg prot⁻¹ min⁻¹, donde se mantuvo. El valor más bajo lo registró a las 5:00 h (promedio 7 UAE mg prot⁻¹ min⁻¹), que es sin embargo mayor al registrado en la temporada anterior, teniendo en cuenta que se encuentra a mediados de la época seca y que se registró a esa hora formación de escarcha sobre la superficie de la planta (Tabla 1-3). La actividad de CAT mostró una tendencia inversa al CHR, la regresión dio significativa (Tabla 4-3),

con R^2 bajo, esto debido a que la actividad CAT siguió aumentando aunque la el CHR permaneció constante en un valor bajo.

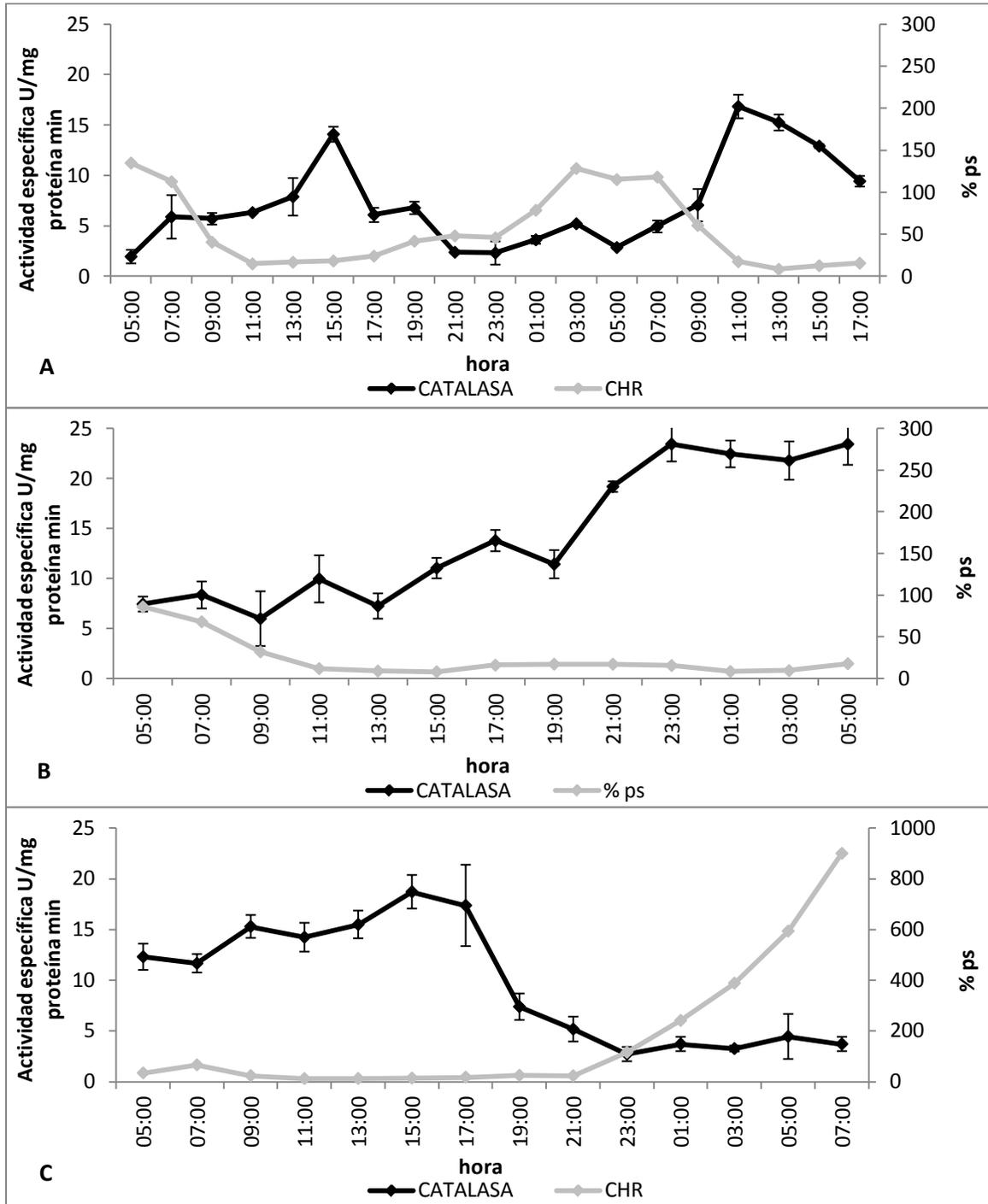
Al final de la época seca (Figura 4-3 C) se observó que la actividad catalasa presentó valores entre 13 y 18 UAE $\text{mg prot}^{-1} \text{min}^{-1}$ durante las horas de deshidratación y de mayor radiación, después descendió inmediatamente aumentó la humedad relativa e inició la rehidratación por la temporada de lluvias (Tabla 1-4), bajando a valores promedio de 4 UAE $\text{mg prot}^{-1} \text{min}^{-1}$.). La actividad de CAT mostró una tendencia inversa al CHR, la regresión dio altamente significativa (Tabla 4-3).

El análisis de varianza para CAT comparando las tres temporadas de la época seca (Anexo C) dio diferencias altamente significativas mostrando efectos diferentes posiblemente causados por el tiempo de exposición al déficit hídrico (días), la influencia de la hora del día o cuando empieza a salir del déficit por la llegada de las primeras lluvias.

Tabla 4-3 Modelos de regresión para catalasa en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

		R^2	p
Inicio de la época seca	$CAT=13.865-0.2907*CHR+175E-3*CHR^2$	0.4827	0.0000
Mediados de la época seca	$CAT=19.856-0.2682*CHR+1.40E-3*CHR^2$	0.2564	0.0183
Final de la época seca	$CAT=14.444-0.0692*CHR+8.75E-5*CHR^2$	0.5748	0.0000

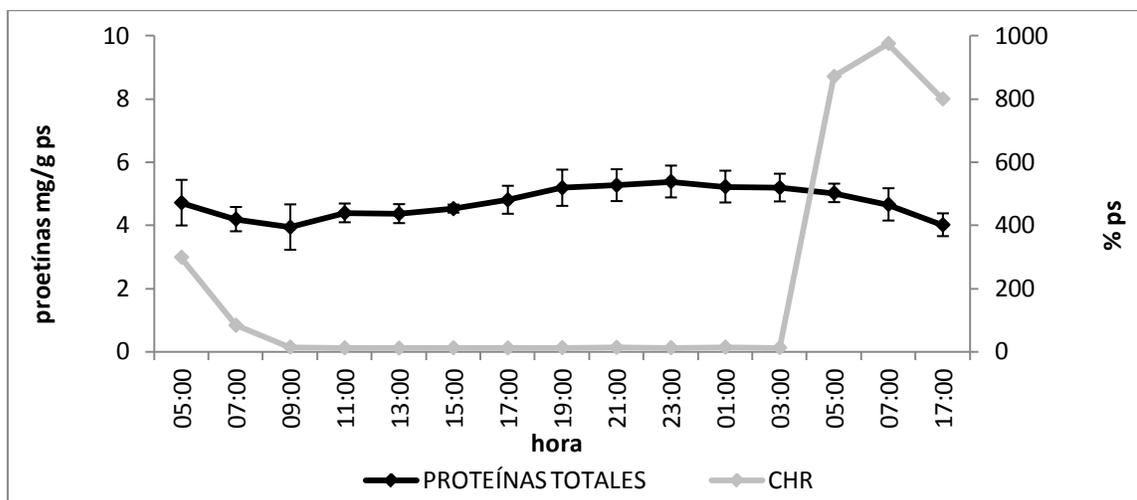
Figura 4-3 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en la actividad enzimática específica de catalasa en *P. schreberi*, en un ciclo de 24 horas en el Páramo de Chingaza, **A** inicio de época seca, **B** mediados de época seca y **C** finales de época seca. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha=5\%$



4.3.4 Contenido de proteínas totales y actividad enzimática específica de POD y CAT en condiciones controladas de laboratorio.

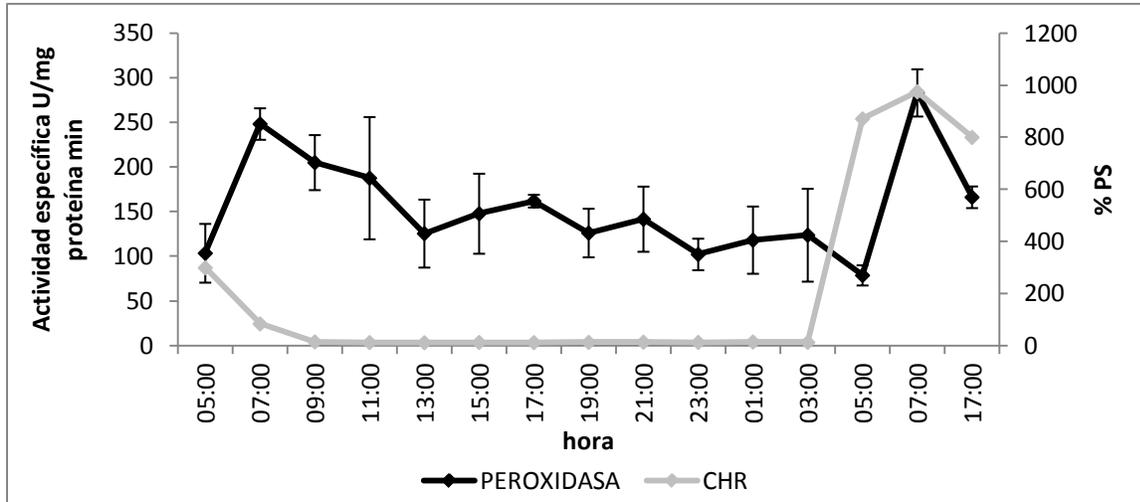
En la figura 4-4 se observa que *P. schreberi* no presentó una variación considerable en el contenido de proteínas, comparado con las variaciones encontradas en páramo, permaneciendo constante durante el proceso de deshidratación (5 mg proteína/g ps en promedio). Cuando el musgo se rehidrató comenzó a disminuir hasta llegar a 4.0 mg proteína/g ps, 12 horas después de iniciado la rehidratación.

Figura 4-4 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de proteínas totales de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha=5\%$.



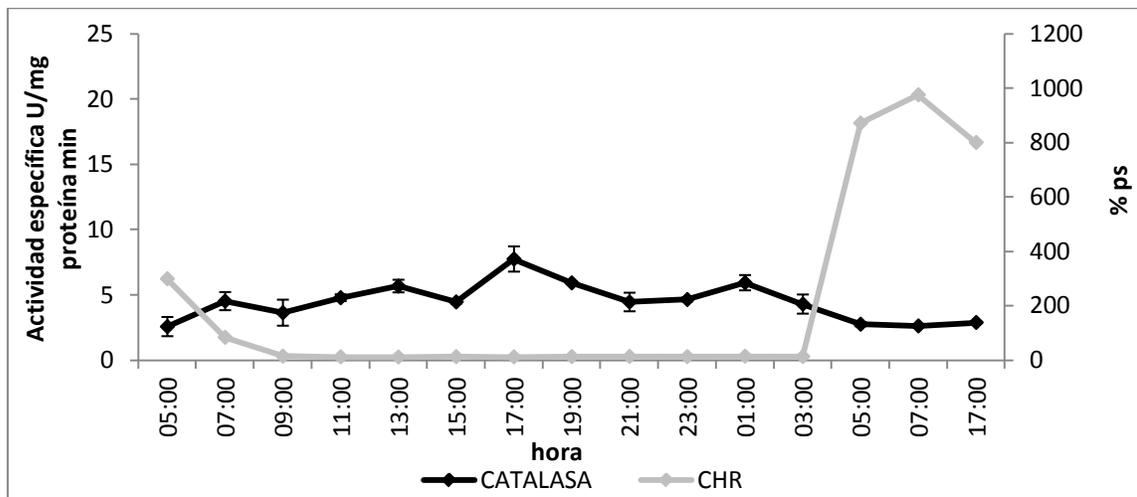
En relación a la actividad enzimática específica de peroxidasa (Figura 4-5) presentó un comportamiento similar a los observados en campo, aumentando en los momentos de hidratación y alcanzando el máximo dos horas después de la hidratación y rehidratación (250 y 280 UAE mg prot⁻¹ min⁻¹, respectivamente); y disminuyendo su actividad cuando la planta estaba deshidratada con valores promedio de 125 UAE mg prot⁻¹ min⁻¹. En general los valores de actividad enzimática específica de POD fueron muy superiores a los encontrados en campo. Doce horas después de iniciado los procesos de rehidratación el valor promedio descendió acercándose al presentado por la planta en estado normal (sin efectos de estrés) de 150 UAE mg prot⁻¹ min⁻¹.

Figura 4-5 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en la actividad enzimática específica de peroxidasa de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha=5\%$.



La actividad enzimática específica de CAT (Figura 4-6) mostró un comportamiento similar al encontrado en páramo, ya que aumentó con la deshidratación hasta alcanzar valores promedio de $5 \text{ UAE mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$, y disminuye inmediatamente con la rehidratación, llegando a valores similares a los del musgo en condiciones ideales ($3 \text{ UAE mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$ promedio) y se mantiene en esos valores inclusive doce horas después de iniciado el proceso de rehidratación. La actividad CAT, en general, presenta valores menores a los encontrados en páramo.

Figura 4-6 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en la actividad enzimática específica de catalasa de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha=5\%$.



El análisis de regresión de proteínas dio no significativo, y CAT y POD en función del CHR a pesar de dar altamente significativas, tienen R^2 muy bajos (Tabla 4-4, Anexo C).

Tabla 4-4 Modelos de regresión proteínas totales, peroxidasa y catalasa en función del CHR, bajo condiciones controladas de laboratorio. (p) probabilidad de la regresión.

		R^2	p
Proteínas totales	No significativa	0.0059	0.5878
Peroxidasa	$POD = 137.90 - 0.0671 * CHR$	0.1691	0.0030
Catalasa	$CAT = 5.2394 - 0.0120 * CHR + 1.04E-5 * CHR^2$	0.2965	0.0043

4.4 Discusión

En *P. schreberi* el contenido de proteínas totales es mayor en los momentos en que está deshidratado, para el inicio y mediados de la época seca, sin embargo su aumento se presenta cuando la planta empieza a deshidratarse, utilizando su poco contenido hídrico para la síntesis de proteínas que le permitan sobrevivir los estados de mayor déficit hídrico. Esto podría mostrar un metabolismo altamente eficiente a nivel ribosomal para la elaboración de proteínas cuando la planta siente que entrará en un estado desfavorable

(estrés) (Bewley 1973, 1972). Dentro de las proteínas principales que puede sintetizar posiblemente están las enzimas del sistema antioxidante para proteger los fotosistemas y la integridad de la membrana, y las rehidrinas asociadas a mecanismos de reparación en musgos. Esta capacidad de síntesis de proteínas en los momentos previos a la deshidratación debe verse promovida por períodos de endurecimientos anteriores (ciclos de deshidratación rehidratación), que en el páramo se presenta comúnmente en las épocas de secas normales o en el caso de estudio (fenómeno “el Niño”) al inicio de la época seca, donde las plantas tienen un período de rehidratación cada 24 horas con la llegada de la niebla en las horas de la madrugada; esto explica por qué el aumento de proteínas es mayor en esta temporada en comparación con los musgos deshidratados en condiciones de laboratorio. Investigaciones realizadas con musgos tolerantes a la deshidratación en ciclos de deshidratación-rehidratación han encontrado que la producción de proteínas no estaba relacionada con la reparación de los fotosistemas sino con proteínas protectoras de los mismos (Ramanjulu y Bartels 2002, Proctor y Smirnoff 2000).

La capacidad de producir proteínas cuando la planta siente que empieza la deshidratación no ha sido observada en los diferentes estudios con musgos tolerantes a la deshidratación, los cuales sintetizan principalmente durante la rehidratación. Este fenómeno se puede presentar debido a que la deshidratación se da lentamente y puede tomar alrededor de 4 horas. Esta puede ser una característica de adaptación de *P. schreberi* a condiciones del ecosistema páramo registrada por primera vez para la ecofisiología de los musgos en el trópico.

Una explicación adicional a este aumento de proteínas previo a la deshidratación es su función similar al de los azúcares, dando estabilidad a las membranas y favoreciendo la vitrificación del espacio celular cuando se presentan los CHR más bajos (Proctor y Tuba 2002)

En la tercera temporada, cuando finalizó la época seca, se presentó un aumento en el contenido de proteína con la rehidratación de los musgos. Estas plantas llevaban en el páramo varias semanas sin agua con el metabolismo a su mínimo para sobrevivir, este aumento en el contenido de proteínas está asociado con la formación de proteínas de defensa al daño por estrés (principalmente enzimas del sistema antioxidante) y con la restauración de la función fotosintética, esto se puede deber a que durante la

deshidratación se mantiene la integridad de los ribosomas, y permanecen funcionales los rARNs y mARNs (Chen *et al.* 2002, Dhinsa 1987, Gwózdź *et al.* 1974, Bewley 1973, 1972) .

Se ha encontrado en el musgo *Tortula ruralis*, conocido por su tolerancia a la deshidratación, y otros briófitos que los ribosomas mantienen su integridad durante los períodos de deshidratación, lo que les permite restaurar la producción de proteínas minutos después de haber iniciado la rehidratación (Oliver *et al.* 1993, Oliver 1991, Oliver y Bewley 1984, Gwózdź *et al.* 1974, Bewley 1973, 1972). Esto puede explicar por qué tanto en páramo (tercera temporada) como en condiciones controladas de laboratorio se observó una rápida producción de proteínas cuando el musgo se rehidrató; resultados similares fueron encontrados en *Racomitrium crispipilum* bajo condiciones similares en el páramo de Chingaza (Barón *et al.* 2009). Además, Oliver *et al.* (1993, 1991) también encontraron que el control de síntesis de proteínas cuando el musgo está hidratado difiere de cuando el musgo está rehidratado, presentándose un cambio en la expresión génica de la planta; así en el momento de la rehidratación en *T. ruralis* dejan de expresarse 25 proteínas presente en musgos en estado normal hidratado y aparecen o aumenta la síntesis de 75 proteínas en el momento de la rehidratación.

Resultados similares se han encontrado en *Tortula norvegica* y *T. caninervis*, *Polytrichum comune* y *Neckera crispa*. También se ha observado una rápida recuperación en la síntesis de ARN durante la rehidratación de *T. ruralis*, y rARNs y mARNs estables durante la deshidratación, lo que permite ser utilizados rápidamente en la fase de rehidratación (Stark *et al.* 2007, Oliver *et al.* 2000, Oliver 1991, Oliver y Bewley 1984, Gwózdź *et al.* 1974).

También se ha encontrado en musgos deshidratados rápidamente, como sucede cuando se utiliza sílicagel, que la tasa de síntesis de proteínas en el momento de rehidratación no está limitada por la disponibilidad de iones o de fuentes de energía, y se sugiere que es baja debido a los niveles de glutatión oxidado presente en los tejidos (Dhindsa 1987), lo cual explicaría por qué no se presenta un cambio fuerte en el contenido de proteínas como sucede en el páramo.

Por otra parte, se encontró en *T. ruralis*, que el regreso a los niveles normales de síntesis de proteínas era sincrónico en los musgos hidratados mientras que en los rehidratados

dependía de la proteína y su necesidad en los procesos de protección o reparación. Así mismo, se ha encontrado que el patrón de síntesis de proteínas durante las dos primeras horas después de la rehidratación es sustancialmente diferente al patrón de síntesis del mismo musgo no estresado, sugiriendo un cambio en la expresión génica que es en gran parte modulado a nivel de traducción de mARNs específicos (Oliver 1991, Oliver y Bewley 1984). En el estudio de las proteínas en briófitos tolerantes a la deshidratación todo señala a una protección constitutiva de las estructuras celulares junto con la reparación estimulada por la rehidratación Lloyd *et al.* 2007 (Stark *et al.* 2007, Oliver *et al.* 2005, Oliver *et al.* 2000, Oliver 1991).

En las plantas cuando se enfrentan a estados de tensión o estrés se presenta un aumento en la producción de ROS, para lo cual las especies tolerantes a la deshidratación aumentan la actividad de antioxidantes y enzimas del sistema antioxidante, entre ellas sobresalen la superóxido dismutasa, la catalasa y la peroxidasa; y su evaluación ha sido un indicativo del nivel de estrés y de la capacidad de las plantas para sobrevivir a un estado de estrés (Dazy *et al.* 2008, Nayyar y Gupta 2006, Bor *et al.* 2003, Proctor y Tuba 2002, Oliver *et al.* 2000)

La actividad enzimática específica de peroxidasa tanto en páramo como en los experimentos en laboratorio aumentó considerablemente dos horas después de iniciar la rehidratación, mostrando una participación en el control de H_2O_2 que se forma normalmente cuando la célula empieza a recuperar su contenido hídrico y se constituye en uno de los mayores problemas para mantener la integridad de membranas y la funcionalidad de proteínas, por lo tanto son peroxidosas encargadas de la reparaciones después del déficit hídrico y mantenimiento de la integridad celular. Por otra parte, se observó una sensibilidad de la actividad enzimática con relación al tiempo de exposición al factor de estrés (sequía) ya que disminuyó fuertemente en la tercera temporada cuando los musgos llevan varios días deshidratados y a pesar de la llegada de las lluvias no aumentó como en temporadas anteriores. Además, la actividad enzimática en páramo fue inferior a la presentada en laboratorio, debida también a que *P. schreberi* se encontraba en la época seca contrario al laboratorio donde previo a la deshidratación se mantuvo en condiciones ideales mostrando en el caso de *P. schreberi* que la actividad enzimática de POD se ve afectada por exposición a sequía por prolongados períodos de tiempo.

En relación con el contenido de proteínas se podría concluir que el incremento de proteínas durante la deshidratación no involucra POD, y estaría más enfocado a proteínas constitutivas o de otras enzimas del sistema antioxidante. En trabajos realizados en el musgo *Racomitrium crispipilum* (Barón *et al.* 2009) en el páramo de Chingaza se observaron resultados diferentes, donde la POD aumentaba su actividad durante el período en que la planta se encontraba con los CHR más bajos. Esto se asocia en parte al microhábitat, ya que *R. crispipilum* suele estar ubicado en superficies expuestas, con mayor posibilidad de daño por altos niveles de radiación, mientras que los complejos pajonal-frailejónal donde se encontraba *P. schreberi* son más protegidos. En estudios realizados en el musgo *Mnium affine* durante ciclos de deshidratación-rehidratación se encontró una alta actividad peroxidasa durante el estado deshidratado; sin embargo, en los primeros minutos de rehidratación descendió a valores normales y volvió a aumentar media hora después, similar a lo ocurrido en el páramo, protegiendo contra los ROS formados por el ingreso del agua; además, encontraron dos grupos principales de isoenzimas, la actividad del primer grupo se incrementó como consecuencia de la deshidratación mientras el otro lo hacía durante la rehidratación, para después de 16 horas volver al estado inicial de los musgos en estado normal (Christov *et al.* 2000, Christov y Bakardjieva 1998). En la mayoría de las plantas vasculares tolerantes y no tolerantes a la deshidratación la actividad de la peroxidasa aumenta cuando se enfrentan a estrés hídrico (Smirnoff 1993).

En estudios de la actividad de peroxidasa en musgos expuestos a diferentes tipos de estrés encontraron que ésta disminuye o se presenta un efecto inhibitorio de la actividad entre más prolongado sea el tiempo de exposición al factor de estrés (Dazy *et al.* 2008, Choudhury y Kumar 2005). También en investigaciones donde compararon musgos tolerantes a la deshidratación con no tolerantes, se ha encontrado que en los primeros la peroxidasa y ascorbato peroxidasa no aumentan considerablemente su actividad durante los períodos de déficit hídrico en comparación con las plantas susceptibles, sugiriendo un papel más importante de los compuestos antioxidantes que de éstas enzimas en la protección contra ROS (Proctor y Tuba 2002, Seel *et al.* 1992).

Cuando se relaciona la actividad POD con la eficiencia fotosintética, en ambos casos aumentan horas después de la rehidratación, asociando esto principalmente a la protección de los fotosistemas por parte de la POD, en el caso de *P. schreberi*. Resultados similares se ha encontrado en estudios de estrés por radiación UV en

musgos y hepáticas (Takács *et al.* 1999). Esta protección de los fotosistemas explicaría por qué se presentó en la primera y segunda temporada un leve aumento de la actividad de POD en horas de la tarde y en la tercera temporada el aumento en la actividad empezó también en horas de la tarde, esta actividad protectora se ha encontrado también en plantas vasculares tolerantes a la deshidratación (plantas de resurrección) (Farrant *et al.* 2003).

Por otra parte, se ha encontrado la participación de peroxidasas en la producción de H₂O₂ en las paredes celulares como una forma de defensa contra patógenos en la rehidratación de musgos expuestos a déficit hídrico (Mayaba *et al.* 2002, Minibayeva y Beckett 2001).

En investigaciones sobre diversos tipos de estrés en musgos se ha reportado la acción de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa (Dey y Nath De 2012, Dazy *et al.* 2008, Choudhury y Kumar 2005, Mayaba *et al.* 2002, Blokhina *et al.*, 2002); sin embargo, los estudios sobre catalasa aun son escasos para los briófitos a diferencias de los reportados para las plantas vasculares. En relación con la actividad enzimática específica de catalasa (CAT) ésta aumentó considerablemente en páramo cuando *P. schreberi* se encontraba deshidratado y disminuyó cuando se hidrató. Si se tiene en cuenta la actividad en la segunda y tercera temporada, este aumento está relacionado con el CHR bajo y no con la temperatura o radiación que se presentó en el momento de la medición. Esta actividad se presentó de forma similar en las mediciones hechas en laboratorio, solo que el aumento no fue tan grande, debido a que los musgos estaban inicialmente bajo condiciones ideales de crecimiento durante varios días; por lo tanto el efecto de los días de estrés en páramo son acumulativos en el caso de *P. schreberi* para la función de catalasa como parte del sistema constitutivo de defensa ante procesos de estrés hídrico. Otra razón por la cual se presenta esa diferencia de actividad entre páramo y laboratorio puede deberse al papel que desempeña la catalasa en protección contra estrés por radiación UV, que es característica en el páramo. En los estudios hechos por Steel *et al.* (1992) en *T. ruralis* sobre efecto de la luz y tolerancia a la deshidratación encontraron que la actividad catalasa aumentaba con la deshidratación pero disminuía con el aumento de radiación por fotoinhibición. Se podría esperar que *P. schreberi* esté adaptado a mantener la actividad CAT durante las horas de déficit hídrico y alta radiación ya que en el ecosistema de páramo es el fenómeno que se presenta diariamente.

En el estudio hecho en la especie *Racomitrium crispipilum* en el páramo, también se encontró un aumento de la actividad de CAT cuando el musgo se encontraba deshidratado (Barón *et al.* 2009). Y en estudios hechos bajo condiciones de laboratorio en ciclos de deshidratación-rehidratación con *Mnium affine* también observaron que la actividad de CAT aumentaba cuando el musgo estaba deshidratado, pero también siguió aumentando durante la rehidratación (Christov *et al.* 2000, Christov y Bakardjieva 1998).

Dhindsa y Matowe (1981) estudiaron el efecto de la rehidratación en dos especies de musgos *Tortula ruralis* (tolerante a la deshidratación) y *Cratoneuron filicinum* (no tolerante a la deshidratación), midiendo la actividad CAT encontraron que cuando se deshidrataba lentamente (como sucede en el páramo) la actividad de CAT en *T. ruralis* aumentó fuertemente 1 h después de iniciado el proceso de deshidratación, alcanzando un máximo 3 horas después; sin embargo durante el secado rápido la actividad de catalasa aumenta solo un 50%. Se encontró que durante la rehidratación la actividad en los especímenes secados lentamente disminuye mientras que en los secados rápidamente aumenta, cayendo poco tiempo después. Este comportamiento se presentó en forma similar a lo registrado en *P. schreberi* en páramo y laboratorio respectivamente, confirmando la afirmación de que es un musgo tolerante a la deshidratación. En otras especies como *C. filicinum* no observaron ningún aumento de la actividad de CAT durante la deshidratación a diferencia de lo encontrado en *P. schreberi*.

4.5 Conclusiones

P. schreberi presenta aumento en el contenido de proteínas totales cuando entra en estados de deshidratación, asociado posiblemente a la producción de enzimas del sistema antioxidante como catalasa o para mantener la estabilidad de los fotosistemas, lo cual se ve reflejado en la rápida recuperación de los procesos fotosintéticos cuando el musgo se rehidrata.

P. schreberi presenta como adaptaciones constitutivas para sobrevivir a estrés por deshidratación una alta actividad enzimática de catalasa, mientras que se presenta como adaptación inducida por la deshidratación una alta actividad enzimática de peroxidasa

El aumento de la actividad de CAT durante la deshidratación está asociado a procesos de protección, mientras que el aumento de POD durante la rehidratación está asociado a procesos de reparación y protección en especial de los fotosistemas, lo cual se corrobora

con los resultados encontrados en la medición de eficiencia fotosintética y tasa fotosintética.

La deshidratación que se presenta bajo condiciones del páramo genera procesos relacionados con pérdida lenta del agua, mientras que la deshidratación con sílicagel en laboratorio genera procesos relacionados con deshidratación rápida en musgos, y por tanto, *P. schreberi* en relación con la actividad enzimática específica de catalasa y peroxidasa presenta características de un musgo tolerante a la deshidratación.

Para entender mejor el funcionamiento del sistema antioxidante para protección de estrés hídrico por deshidratación en *P. schreberi* se necesita analizar la enzima superóxido dismutasa, determinar las isoenzimas de CAT y POD para determinar su participación en la protección y reparación.

5. CONTENIDO DE AZÚCARES, PROLINA Y ABA EN *Pleurozium schreberi* DURANTE LA ÉPOCA SECA EN PÁRAMO Y BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE DEFICIT HÍDRICO EN LABORATORIO

5.1 Introducción

En las plantas sometidas a estrés por déficit hídrico, el mecanismo más importante de defensa es la disminución del potencial osmótico, por acumulación de iones inorgánicos o bien por aumento en los niveles de solutos orgánicos (osmorreguladores o solutos compatibles); dicho proceso denominado **ajuste osmótico** busca impedir la pérdida de turgencia en las células, evitando detener funciones asociadas a la fotosíntesis, al crecimiento celular, etc. (Reigosa y Pedrol, 2004; Medrano y Flexas, 2004; Zhang *et al.*, 1999; Sánchez y Aguirreolea, 1993).

Los osmorreguladores o solutos compatibles se han definido como “*osmolitos orgánicos responsables del balance osmótico, que son compatibles con el mecanismo celular*”. Se localizan en el citoplasma y permiten disminuir el potencial osmótico de la célula, sin interferir con las funciones metabólicas, a pesar de alcanzar concentraciones altas. Por lo general son moléculas de bajo peso molecular, altamente solubles en agua, con carga neta a pH fisiológico y con una gran cubierta hídrica en solución. El mecanismo de ajuste osmótico mediante osmolitos se ha seleccionado a lo largo de la evolución porque permite la adaptación al estrés hídrico temporal de forma más flexible, y minimiza los cambios adaptativos necesarios en las proteínas para funcionar en soluciones intracelulares más concentradas, ya que su acumulación no perturba la fisiología celular. Los osmorreguladores, bajo diferentes condiciones de estrés, también pueden actuar estabilizando proteínas y membranas celulares, y captando radicales libres. Dicha habilidad les ha permitido ser llamados osmoprotectores. En estado anhidro los grupos OH de algunos de ellos remplazan el agua en la formación de puentes de hidrógeno con los residuos polares de proteínas y fosfolípidos. El aumento típico de los niveles de osmoprotectores se debe a que las enzimas involucradas en su síntesis son inducidas por el estrés. (Reigosa y Pedrol, 2004; Romero *et al.*, 2004; Taiz y Zeiger, 1998).

Únicamente cuatro grandes grupos parecen funcionar como osmolitos orgánicos: compuestos metilaminas y metilsulfonio, urea (en animales), polioles (ej. Sacarosa) y algunos aminoácidos (prolina) (Bolen 2004).

Los disacáridos cumplen dos importantes papeles en la protección de membranas: reducción de la temperatura de transición de la fase de secado de membrana (T_m) y formación de un “*glass*” de carbohidratos con una alta temperatura de fusión (vitrificación del citoplasma). Aunque ambas características son necesarias, no son suficientes para la protección de membranas en períodos de deshidratación e hidratación. Cuando las membranas están deshidratadas pero hay presencia de estos disacáridos, el modelo sugiere que las moléculas de azúcar detienen el colapso de los lípidos a través de una interacción con las cabezas de los fosfolípidos, de ese modo previenen la elevación de T_m durante la deshidratación. La segunda característica es la vitrificación a bajos contenidos hídricos, los carbohidratos forman un material amorfo que previene los procesos de deterioro tales como fusión de membranas (Oliver *et al.*, 2002).

La sacarosa, (α -D-glucopiranosil(1->2)- β -D-fructofuranósido), es el azúcar osmolito más importante en los briófitos (Smirnoff, 1992). En general, se acepta que los disacáridos (y otros azúcares) tienen un papel esencial en la tolerancia a la deshidratación, pero que otros factores deben ser importante (Proctor y Tuba 2002).

La acumulación de prolina libre en plantas puede ser parte de una adaptación general al estrés hídrico, actuando como osmolito orgánico. Además de contribuir en el ajuste osmótico se le atribuye la capacidad de estabilizar membranas y proteínas, interactuando entre las cabezas de los fosfolípidos y reduciendo la actividad de los radicales libres (Knipp y Honermeier, 2006). Por otra parte, se ha encontrado que la prolina participa en la disminución de la acidosis citoplasmática, manteniendo la relación $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ en valores compatibles con el metabolismo, al igual que se le han encontrado funciones antioxidantes (Nayyar, 2003).

La fitohormona Ácido Abscísico es una reguladora de procesos importantes para el desarrollo de las plantas, como es el desarrollo de la semilla, donde aumenta la tolerancia a la deshidratación, induce a la dormancia y regula la transición del estado embrionario al crecimiento vegetativo. El ABA además es un mediador esencial de la respuesta de las plantas a los estreses ambientales, tanto abióticos (sequía, sal, hipoxia, herida, frío) como bióticos (patógenos). Se encuentra en todas las plantas y en todos los

tejidos vegetales. Para conocer cómo el ABA regula estos procesos es muy importante conocer los mecanismos que regulan su metabolismo así como los mecanismos que traducen una variación en su concentración, en respuestas fisiológicas (Medandro y Flexas, 2004; Romero *et al.*, 2004; Gogay y Pages, 2004; Nieva, 2003).

El ABA promueve la tolerancia a estreses abióticos como las bajas temperaturas, la alta salinidad y el déficit hídrico, los cuales inducen una situación de deshidratación celular. El estrés osmótico y las bajas temperaturas incrementan la concentración de ABA celular. La expresión de muchos genes de respuesta a estas situaciones se inducen con un tratamiento con ABA exógeno. En la mayoría de las ocasiones la respuesta de la planta en la naturaleza integra las diferentes vías de respuesta: Un estrés osmótico causado por sequía en verano se acompaña frecuentemente de estrés por altas temperaturas y las bajas temperaturas se relacionan con el estrés osmótico al dificultar la absorción y el transporte del agua (Nievas, 2003; Taylor *et al.*, 2000).

La hipótesis que enmarcan este capítulo son: *P. schreberi* utiliza la sacarosa y la prolina como osmolitos para tolerar el déficit hídrico en páramo y bajo condiciones controladas de laboratorio; y el ABA es la hormona señal que utiliza *P. schreberi* para desencadenar los procesos de adaptación al déficit hídrico. Para comprobar estas hipótesis los objetivos a seguir fueron: Determinar la variación de azúcares totales, sacarosa, azúcares reductores y fructuosa durante déficit hídrico y rehidratación en *P. schreberi*; determinar la variación del contenido de prolina bajo las mismas condiciones; y determinar la variación del contenido del ABA bajo las mismas condiciones de páramo y laboratorio.

5.2 Metodología

5.2.1 Material vegetal

Las mediciones de campo y laboratorio se realizaron con el material vegetal descrito en el capítulo dos.

5.2.2 Extracción de azúcares

Para la extracción de los azúcares (Malgarejo 2010) el material vegetal fue liofilizado, se tomaron 0.02 g por cada muestra y se maceraron en nitrógeno líquido, se adicionó como solución de extracción 2 ml de buffer acetato 50 mM pH 5.0. Se centrifugó a 6.000 rpm durante 30 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se utilizó para la determinación de

azúcares totales solubles y azúcares reductores. Para la extracción de azúcares para HPLC se utilizó agua destilada desionizada.

5.2.3 Determinación de azúcares totales solubles

El contenido de azúcares totales solubles se determinó utilizando el método de Dubois *et al.* (1956), utilizando glucosa como patrón (1.01 mg/mL) y leyendo absorbancia a 490 nm (Anexo F). La mezcla de reacción contenía extracto de azúcar, fenol (80% p/v) y ácido sulfúrico al 99%. Para las muestras de páramo y laboratorio se utilizó un espectrofotómetro BIO-RAD Smartspec 3000.

5.2.4 Determinación de azúcares reductores

Se utilizó el método de Somogyi-Nelson se basa en la oxidación de los azúcares que contengan extremo reductor. La mezcla de reacción contenía el extracto de azúcar, los reactivos de Somogyi I, Somogyi II, Nelson y agua dd, se leyó absorbancia a 660 nm (Green *et al.* 1989, Somogyi 1952, Nelson 1944). Se utilizó glucosa como patrón (1.0 mg/mL) (Anexo F). Para las muestras de páramo y laboratorio se utilizó un espectrofotómetro BIO-RAD Smartspec 3000.

5.2.5 Determinación de Sacarosa y Fructosa por HPLC

Se determinaron por HPLC utilizando una Columna Ca⁺⁺ monosacharide Phenomenex. Fase Móvil agua tipo I desgasificada, flujo fase móvil 0,6mL/min, temperatura del horno para columna: 80°C, detector: Índice de refracción, temperatura del detector 44°C, tiempo de equilibrio para la columna 3 horas, volumen de inyección 10µL y tiempo de análisis 25 minutos (Chinnici *et al.* 2005, Gallander 1985). Se utilizó un equipo HPLCELITE LaChrom Hitachi, con detector L2490.

5.2.6 Determinación de prolina

Para la extracción de prolina se tomaron 0.02 g de material vegetal liofilizado por cada muestra y se maceraron en nitrógeno líquido, se adicionó como solución de extracción 1.25 ml de ácido sulfosalicílico 3% p/v, se centrifugó a 6.000 rpm durante 30 min a 10°C, se tomó el sobrenadante. Para la determinación se utilizó el método de Bates *et al.* (1973) adaptado por Melgarejo (2010) que se fundamenta en la descarboxilación de los aminoácidos por parte de la ninhidrina. La mezcla de reacción contiene extracto, ninhidrina 0.1 M, ácido acético glacial puro y tolueno seco (puro). Se lee la absorbancia a

520 nm. Para las muestras de páramo y laboratorio se utilizó un espectrofotómetro BIO-RAD Smartspec 3000.

5.2.7 Determinación de ABA

Para la extracción de ABA se tomaron 0.02 g de material vegetal liofilizado por cada muestra y se maceraron en nitrógeno líquido, se adicionó como solución de extracción metanol (puro), butil hidroxilo tolueno (0.4 mM) y ácido cítrico (2 mM), se centrifugó a 6.000 rpm durante 30 min a 4°C, se tomó el sobrenadante (Hellwege *et al.* 1994, 1992). Para la cuantificación se utilizó el KIT Phytodetek ABA Test de Agdia Inc., se leyó absorbancia a 405 nm. Para la lectura de las muestras de páramo y laboratorio se utilizó un lector de microplacas iMark™ BioRad.

5.2.8 Análisis estadístico

Los datos se analizaron bajo un diseño experimental completamente al azar, con 5 réplicas (cada una de las colonias) tanto para páramo como para laboratorio, para las lecturas de azúcares totales, azúcares reductores y prolina; 3 réplicas para sacarosa y fructosa (HPLC) y 2 réplicas para ABA. Se elaboraron análisis de varianza para comparar las tres temporadas en páramo (inicio, mediados y final de la época seca), análisis de regresión lineal y regresión polinomial para todas las variables en función al contenido hídrico relativo, para determinar la relación y el modelo. El nivel de significancia fue del 95% y se utilizó el programa estadístico "Statistix 9".

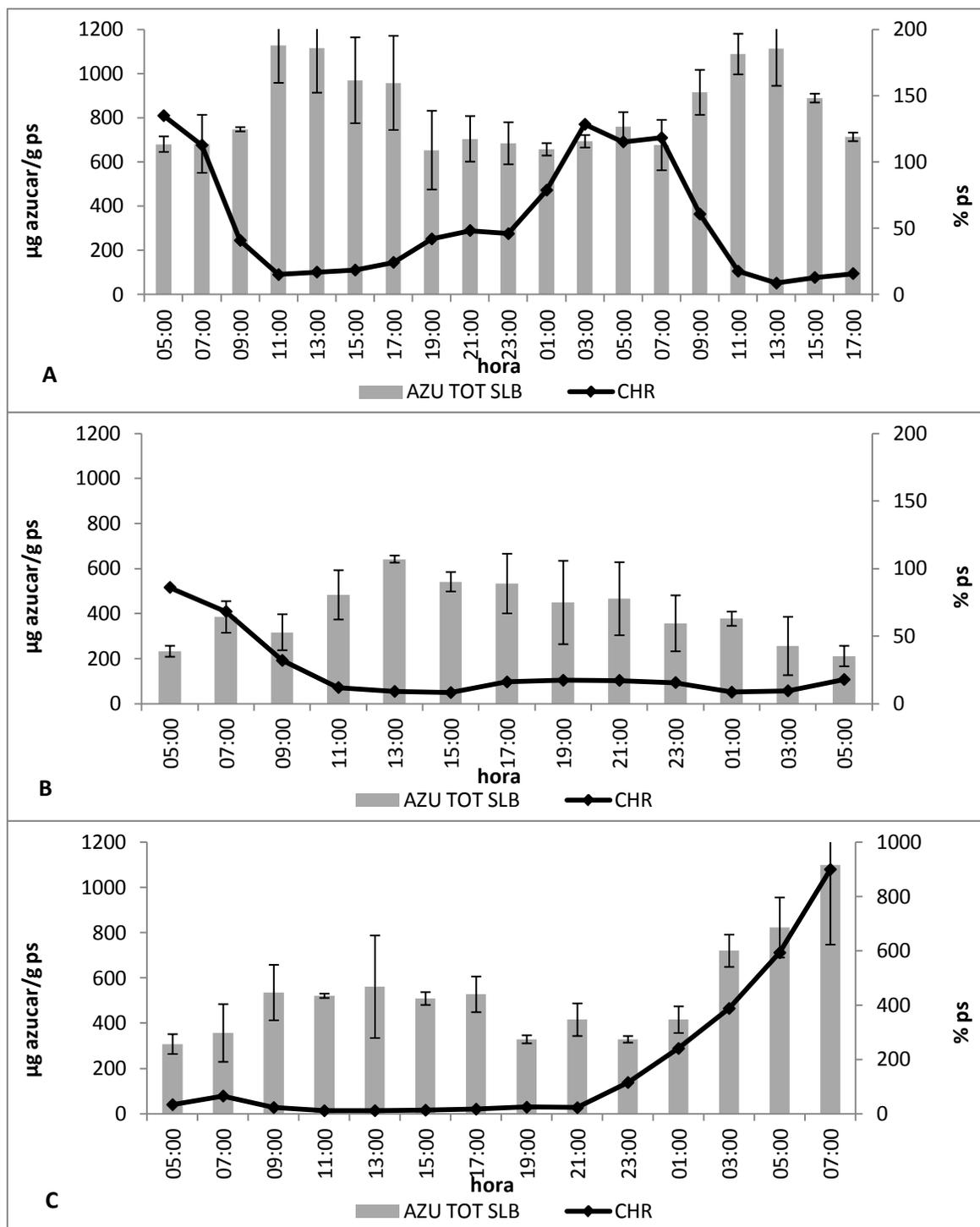
5.3 Resultados

5.3.1 Variación en el contenido de azúcares totales solubles.

El análisis de varianza para las tres temporadas de la época seca en páramo dio diferencias altamente significativas entre las tres temporadas (Anexo D), así al inicio de la época seca (Figura 5-1 A) el contenido de azúcares totales solubles cuando la planta se encontraba hidratada (horas de la madrugada) fue en promedio de 700 μg de azúcar gps^{-1} , aumentando hasta 1100 μg de azúcar gps^{-1} en promedio cuando el musgo tuvo los CHR más bajos. En la segunda temporada (Figura 5-1 B) cuando el páramo presentó los días de sequía más fuertes, se encontró que los contenidos de azúcares totales solubles fueron inferiores a la temporada anterior, igualmente se observó un aumento hacia las horas de la tarde alcanzando valores promedio de 600 μg de azúcar gps^{-1} en las horas

del medio día y tarde cuando la radiación y temperatura son altas y la humedad relativa es inferior a 40% (Tabla 1-3). Hacia finales de la época seca (Figura 4-1 C) el musgo llevaba varios días en déficit hídrico y los contenidos de azúcar fueron similares a los encontrados en la temporada anterior, presentándose también un aumento en horas del medio.

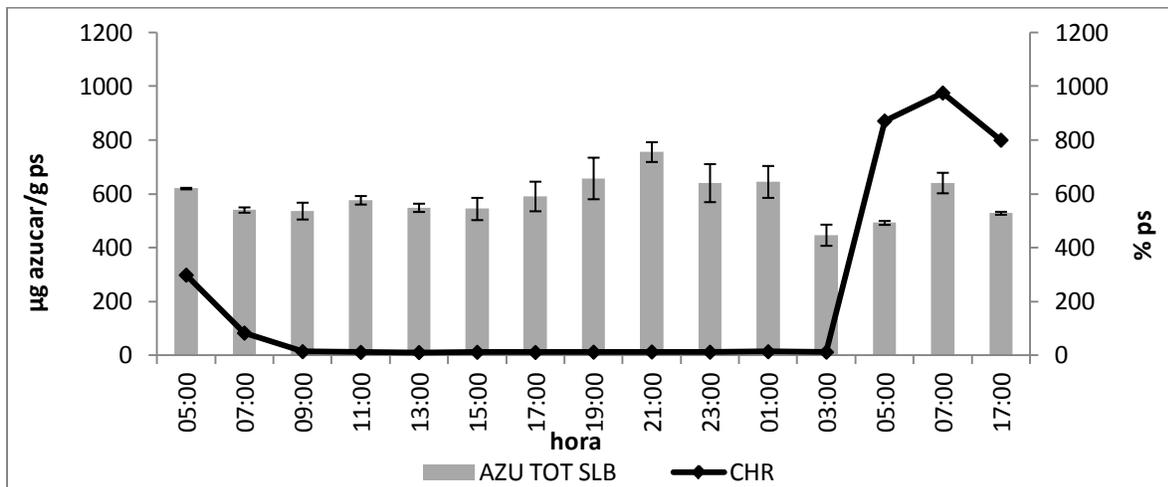
Figura 5-1 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de azúcares totales solubles de *P. schreberi*, en un ciclo de 24 horas en el Páramo de Chingaza, **A** inicio de época seca, **B** mediados de época seca y **C** finales de época seca. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha = 5\%$



El contenido de azúcares totales aumentó considerablemente en especial hacia las 7:00 h, del segundo día de muestreo, cuando se presentaron lluvias y la planta empezó a fotosintetizar (Figura 2-3 C) alcanzando valores de 1100 μg de azúcar gps^{-1} : En esta última temporada se presentó una regresión altamente significativa (Tabla 5-1) entre el contenido de azúcar y el CHR, mostrando la misma tendencia.

En el laboratorio los musgos permanecieron varias semanas en condiciones ideales presentando contenidos de azúcares en promedio 600 μg de azúcar gps^{-1} inferiores a los presentados en páramo cuando la planta estaba hidratada en horas de la madrugada. Sin embargo con la deshidratación rápida no se presentó una variación significativa en el contenido de azúcares totales, solo un pequeño aumento a las 12 horas de estar con CHR bajos llegando a 700 μg de azúcar gps^{-1} . Tampoco hubo aumento con la rehidratación (Figura 5-2).

Figura 5-2 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de azúcares totales solubles de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha = 5\%$.



Las regresiones para azúcares totales en función del CHR (Tabla 5-1) dieron altamente significativas para las mediciones hechas en campo, y no significativas para los valores de laboratorio.

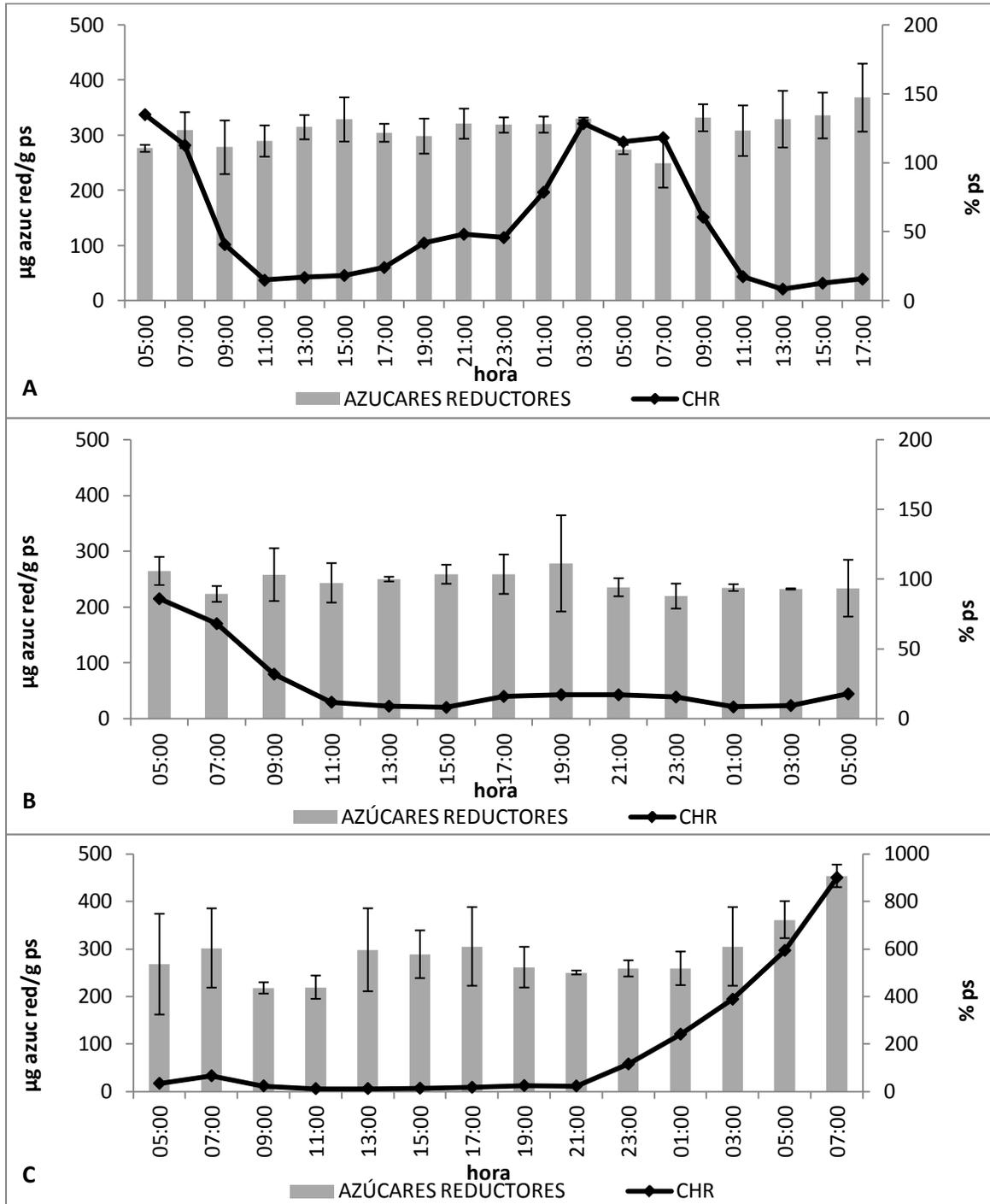
Tabla 5-1 Modelos de regresión para azúcares totales en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión.

		R ²	p
Inicio de la época seca	AZÚCAR = 987.67 – 3.0024 * CHR	0.1508	0.0064
Mediados de la época seca	AZÚCAR = 463.65 – 2.1972 * CHR	0.1233	0.0284
Final de la época seca	AZÚCAR=444.47-0.3439*CHR+1.78E-3*CHR ²	0.6114	0.0000
Laboratorio	No significativo	0.0576	0.1043

5.3.2 Variación en el contenido de azúcares reductores.

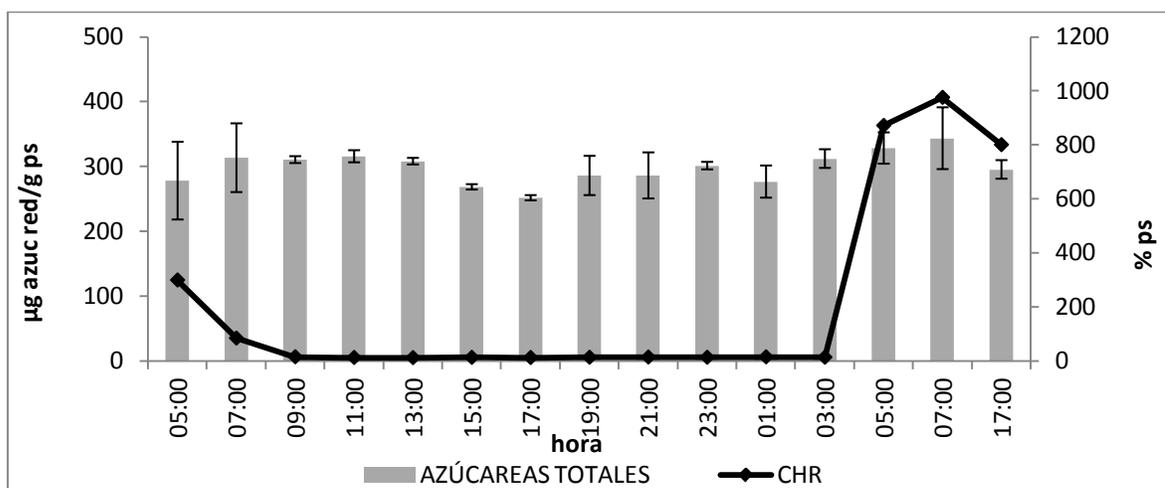
Para azúcares reductores el análisis de varianza (Anexo D) mostró que hay variación significativa entre las tres temporadas en páramo. Tanto al inicio como a mediados de la época seca (Figura 5-3 A y B, respectivamente) la variación de azúcares reductores no fue significativa a través de todo el día, en promedio el contenido para la primera temporada fue de 300 µg de azúcar gps⁻¹ y para la segunda de 220 µg de azúcar gps⁻¹; las regresiones lineales dieron no significativas. En la tercera temporada durante las horas más secas el promedio de azúcares reductores fue similar al encontrado a mediados de la época seca; sin embargo, aumentó considerablemente cuando el musgo empezó a aumentar su contenido hídrico y en horas de la mañana cuando se activa la fotosíntesis llegando a valores promedio de 450 µg de azúcar gps⁻¹ (Figura 5-3 C).

Figura 5-3 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de azúcares reductores de *P. schreberi*, en un ciclo de 24 horas en el Páramo de Chingaza, **A** inicio de época seca, **B** mediados de época seca y **C** finales de época seca. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha= 5\%$



En el experimento bajo condiciones controladas de laboratorio tampoco se presentó una variación significativa en la cantidad de azúcares reductores durante el ciclo de deshidratación-rehidratación (Figura 5-4), manteniendo un contenido promedio de 300 μg de azúcar gps^{-1} .

Figura 5-4 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de azúcares reductores de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha=5\%$.



Las regresiones del contenido de azúcares reductores en función del CHR (Tabla 5-2) solo dio significativo para la tercera temporada.

Tabla 5-2 Modelos de regresión para azúcares reductores en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión

		R^2	p
Inicio de la época seca	No significativo	0.0048	0.6101
Mediados de la época seca	No significativo	0.0020	0.7866
Final de la época seca	$A_{RED}=268.59-0.1075*CHR+4.49E-4*CHR^2$	0.3936	0.0000
Laboratorio	No significativo	0.0688	0.1068

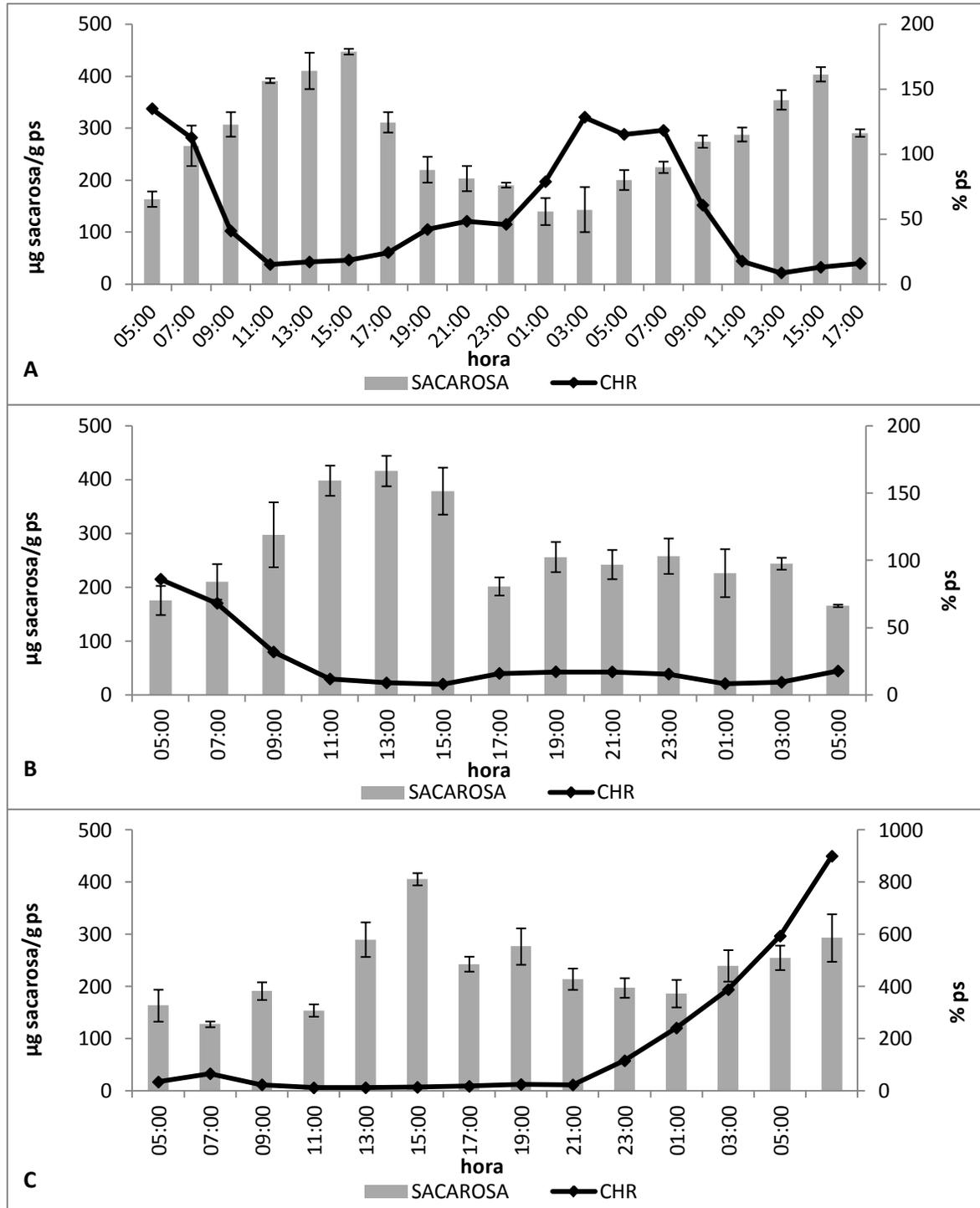
5.3.3 Variación en el contenido de sacarosa

En relación al contenido de sacarosa el análisis de varianza dio diferencias altamente significativas entre las tres temporadas de páramo y en la concentración a través del día en cada temporada (Anexo D). Al inicio de la época seca (Figura 5-5 A), cuando los musgos cuentan con la niebla para rehidratarse en horas de la madrugada, el contenido de sacarosa varió considerablemente; con CHR altos el promedio de sacarosa fue de 200 μg de sacarosa g ps^{-1} pero cuando los musgos se deshidrataban el contenido de sacarosa alcanzaba valores promedio de 400 μg de sacarosa gps^{-1} .

A mediados de la época seca (Figura 5-5 B) se observó un aumento en el contenido de sacarosa (400 μg de sacarosa gps^{-1}) cuando el musgo disminuyó el CHR, pero solo durante las horas del medio día y la tarde, cuando las condiciones de estrés son más fuertes, para finalmente descender a valores promedio de 200 μg de sacarosa gps^{-1} . A pesar de permanecer deshidratado en horas de la noche.

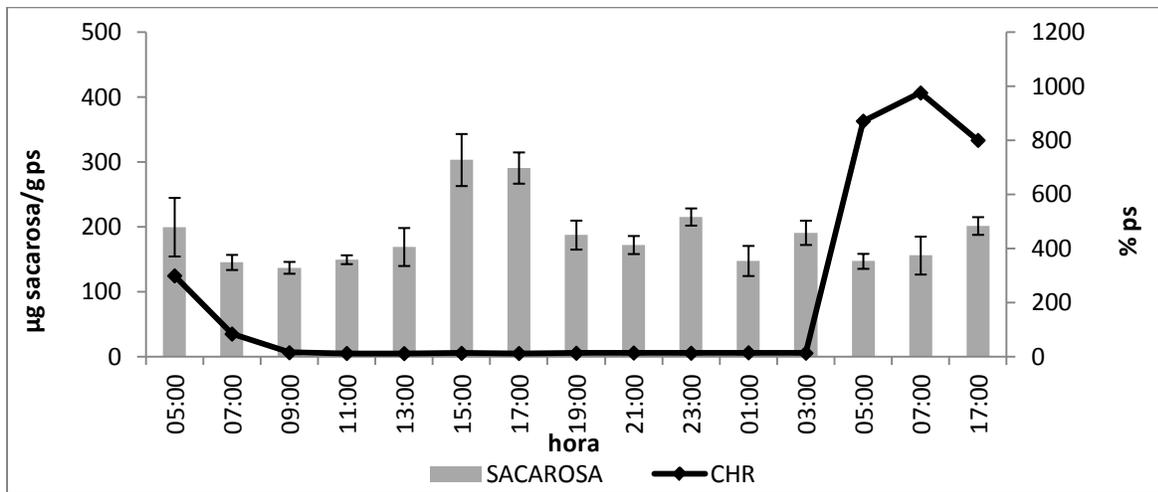
Para finales de la época seca (Figura 5-5 C) con el musgo deshidratado el contenido de sacarosa inició con promedios de 180 μg de sacarosa gps^{-1} en horas de la madrugada, pero en horas de la tarde cuando la humedad relativa del ambiente fue baja (Tabla 1-4), el contenido de sacarosa aumentó alcanzando valores promedio de 400 μg de sacarosa gps^{-1} , para nuevamente descender con la llegada de la noche y volver a incrementar en horas de la madrugada con la rehidratación del musgo, pero solo llegando a valores promedio de 290 μg de sacarosa gps^{-1} , aun cuando se activa la fotosíntesis.

Figura 5-5 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de sacarosa de *P. schreberi*, en un ciclo de 24 horas en el Páramo de Chingaza, **A** inicio de época seca, **B** mediados de época seca y **C** finales de época seca. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha=5\%$



En el ciclo bajo condiciones controladas de laboratorio (Figura 5-6) el contenido de sacarosa se mantuvo en valores promedio 150 y 200 µg de sacarosa gps⁻¹, con el musgo en condiciones normales de hidratación, cuando estuvo deshidratado y cuando se rehidrató, valores menores a los registrados por *P. schreberi* en páramo. Solo se presentó un aumento a las 10 horas del musgo permanecer deshidratado alcanzando valores promedio de 290 µg de sacarosa gps⁻¹, durando solo 2 horas ese aumento.

Figura 5-6 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de sacarosa de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. Valores de medias, +/- desviación estándar α= 5%.



El contenido de Sacarosa mostro una tendencia inversa en relación al CHR para las temporadas uno y dos, mostrando regresiones altamente significativas (Tabla 5-3). Sin embargo para la tercera temporada y el laboratorio dio no significativo.

Tabla 5-3 Modelos de regresión para sacarosa en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión

		R ²	p
Inicio de la época seca	SAC=522.13-8.5512*CHR+0.0464*CHR ²	0.7824	0.0000
Mediados de la época seca	SAC = 304.94 – 1.5267 * CHR	0.1822	0.0060
Final de la época seca	No significativo	0.0004	0.9060
Laboratorio	No significativo	0.0468	0.1859

5.3.4 Variación en el contenido de fructosa.

El contenido de fructosa según el análisis de varianza no tuvo diferencias significativas entre temporadas ni durante las diferentes horas del día (Anexo D). De igual forma no se observaron variaciones en cada una de las tres temporadas en páramo ni en el experimento de laboratorio (Figuras 5-7 A, B, C y Figura 5-8), manteniendo un contenido promedio de 85 μg de ABA gps^{-1} , las regresiones lineales para ninguno de los casos dio significativas (Tabla 5-4).

Tabla 5-4 Modelos de regresión para fructuosa en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión

		R ²	p
Inicio de la época seca	No significativo	0.0032	0.6774
Mediados de la época seca	No significativo	0.0606	0.0481
Final de la época seca	No significativo	0.0006	0.8528
Laboratorio	No significativo	0.0014	0.7894

Figura 5-7 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de fructosa de *P. schreberi*, en un ciclo de 24 horas en el Páramo de Chingaza, **A** inicio de época seca, **B** mediados de época seca y **C** finales de época seca. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha = 5\%$

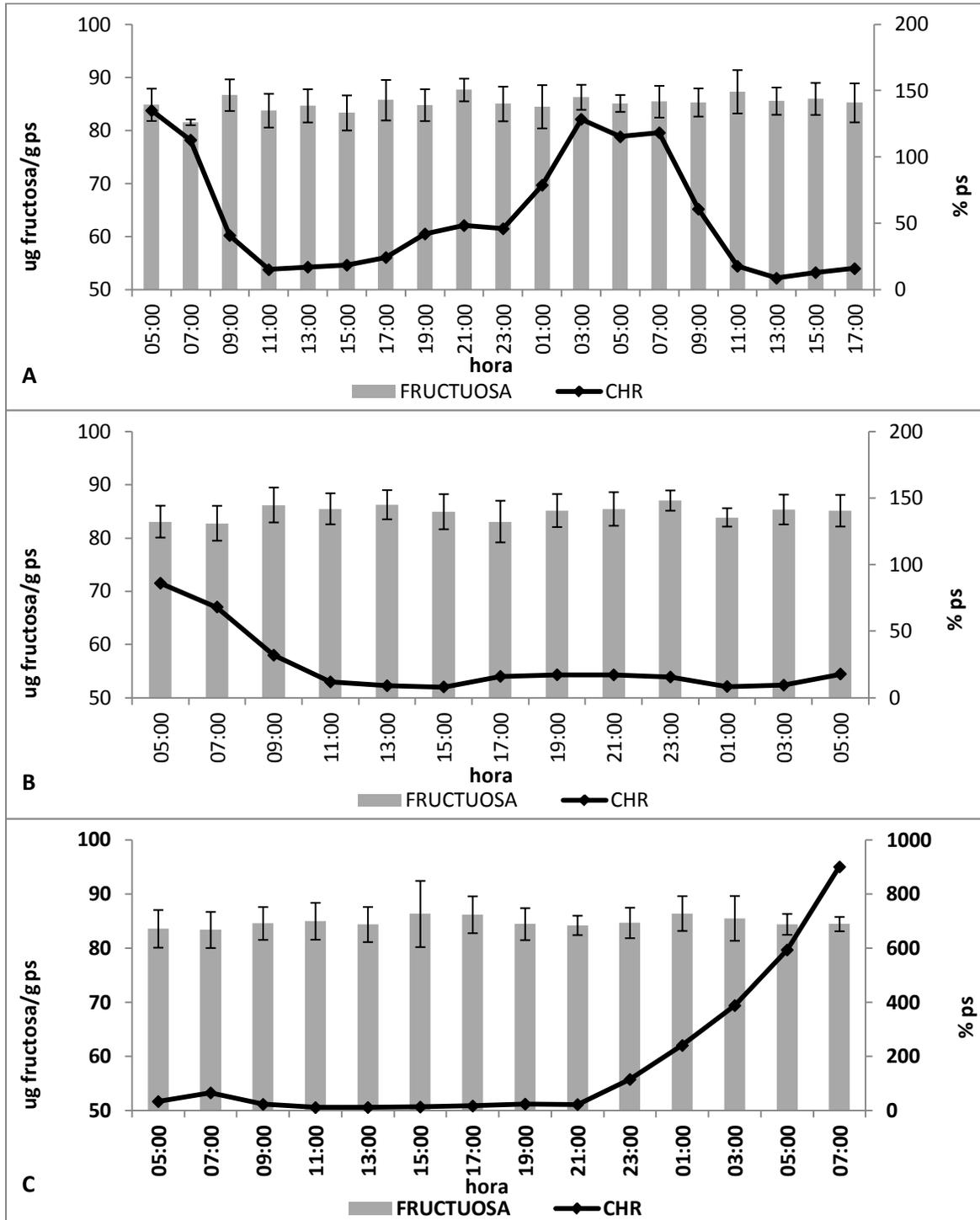
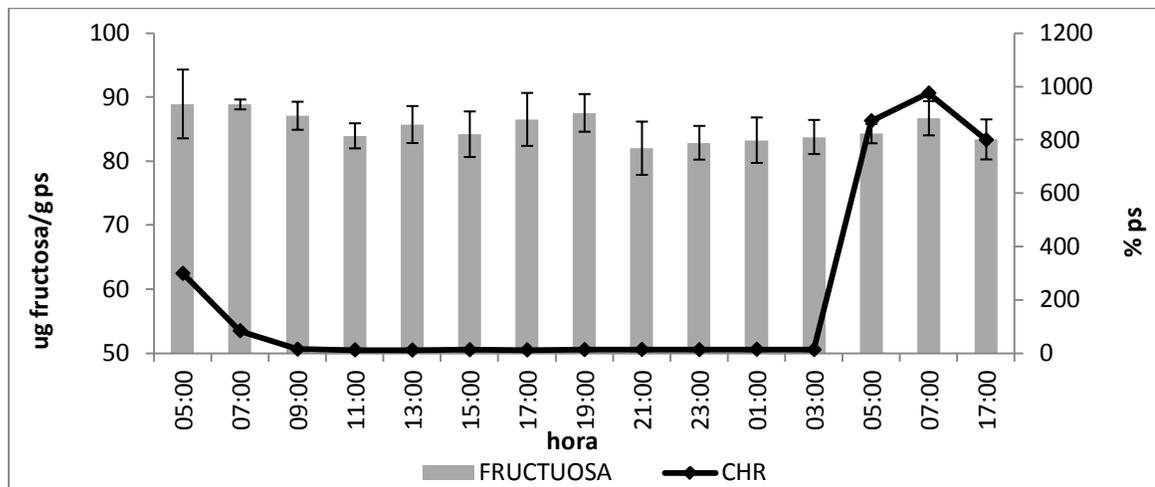


Figura 5-8 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de fructosa de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha=5\%$.



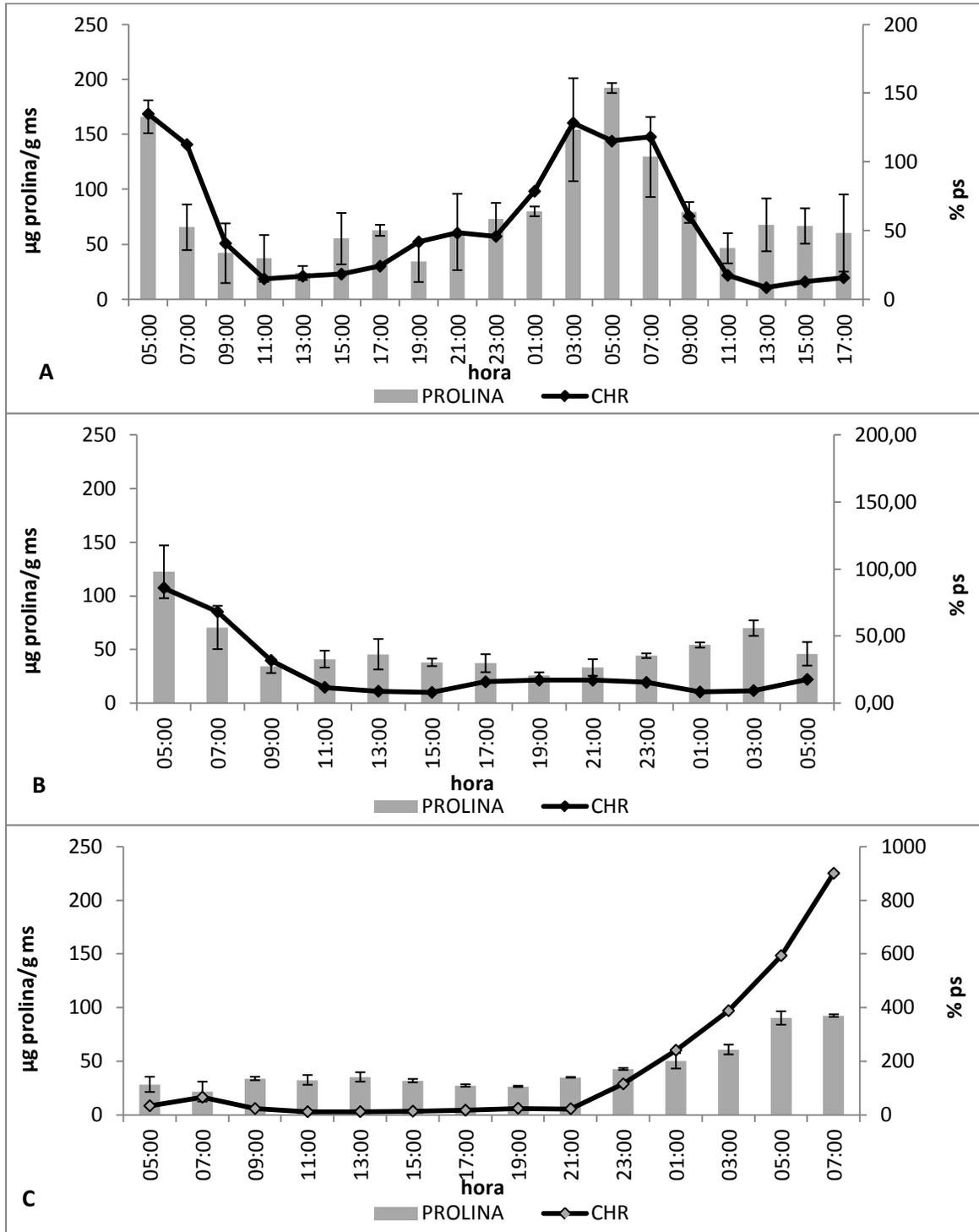
5.3.5 Variación en el contenido de prolina

En relación con el contenido de prolina el análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre las tres temporadas en páramo. Al inicio de la época seca (Figura 5-9 A) el contenido de prolina aumentó con el CHR alcanzando valores promedio de $200 \mu\text{g}$ de prolina gps^{-1} y disminuyó con la deshidratación del musgo llegando a valores promedio de $60 \mu\text{g}$ de prolina gps^{-1} .

A mediados de la época seca (Figura 5-9 B) el contenido de prolina en general fue inferior al de la temporada anterior, llegando a valores promedio de $41 \mu\text{g}$ de prolina gps^{-1} cuando el musgo estaba deshidratado.

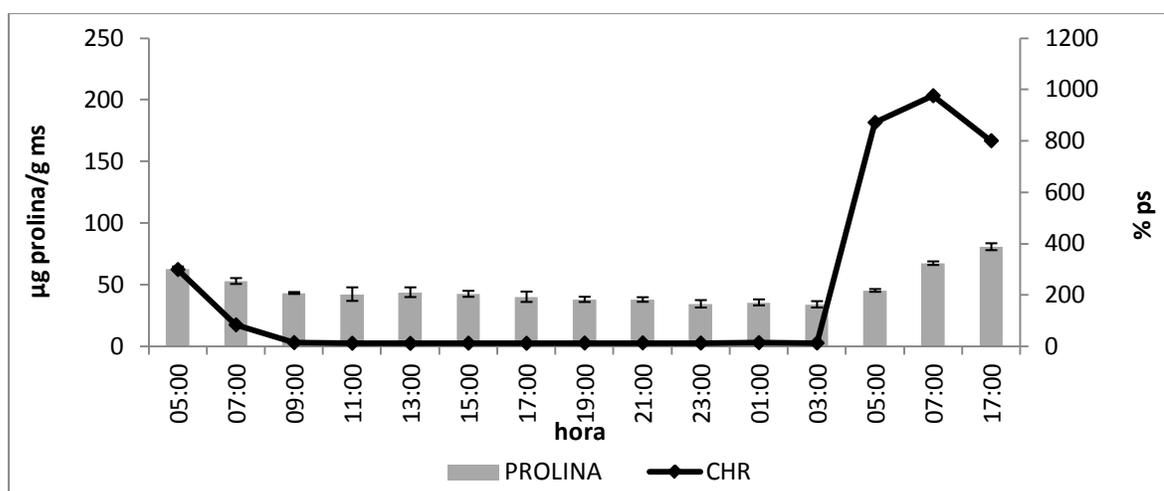
En la última temporada (Figura 5-9 C) el contenido de prolina se mantuvo similar al de la temporada anterior durante la deshidratación, pero aumentó significativamente con la hidratación del musgo hasta alcanzar valores promedio de $90 \mu\text{g}$ de prolina gps^{-1} .

Figura 5-9 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de prolina de *P. schreberi*, en un ciclo de 24 horas en el Páramo de Chingaza, **A** inicio de época seca, **B** mediados de época seca y **C** finales de época seca. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha=5\%$



En el ciclo en laboratorio (Figura 5-10) el contenido de prolina cuando el musgo no se encuentra estresado es de $60 \mu\text{g}$ de prolina gps^{-1} , durante la deshidratación el contenido descendió en promedio a $40 \mu\text{g}$ de prolina gps^{-1} , pero en la rehidratación donde el musgo absorbió el máximo de agua también aumentó el contenido de prolina hasta alcanzar valores promedio de $80 \mu\text{g}$ de prolina gps^{-1} .

Figura 5-10 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de prolina de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha = 5\%$.



Las regresiones (Tabla 5-5) dieron altamente significativas para todas las temporadas y el experimento en laboratorio. El contenido de prolina muestra la misma tendencia que el CHR.

Tabla 5-5 Modelos de regresión para prolina en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión

		R ²	p
Inicio de la época seca	$PRO=40.425+0.0760*CHR+6.95E-3*CHR^2$	0.6568	0.0000
Mediados de la época seca	$PRO=65.209-2.0920*CHR+0.0320*CHR^2$	0.7454	0.0000
Final de la época seca	$PROL=30.547+0.0564*CHR+7.23E-5*CHR^2$	0.9453	0.0000
Laboratorio	$PROL=37.902+0.1316*CHR-1.42E-4*CHR^2$	0.7271	0.0000

5.3.6 Variación en el contenido de ABA.

Para el contenido de ABA el análisis de varianza dio diferencias altamente significativas entre las tres temporadas en páramo. En el caso de ABA para el páramo (Figuras 5-11 A, B y C) el contenido general en campo se mantuvo alto durante la época seca con valores promedio entre 0.05 y 0,1 μg de ABA gps^{-1} . Sin embargo, presenta picos de aumento en el momento que se deshidrata *P. schreberi* por debajo del 50%; en la primera temporada alcanza valores de 0,25 μg de ABA gps^{-1} y en la segunda 0.17 μg de ABA gps^{-1} , también se presentan picos cuando la humedad relativa del ambiente es muy baja y la radiación alta, así en la segunda temporada a la hora 17:00 alcanza 1.3 μg de ABA gps^{-1} y en la tercera a la hora 9:00 con 1.2 μg de ABA gps^{-1} . Finalmente se observó un aumento en la tercera temporada al momento que inicia la rehidratación alcanzando valores de 1.5 μg de ABA gps^{-1} .

Para las mediciones realizadas en laboratorio se encontró en general valores inferiores a los hallados en páramo con promedios de 0.02 μg de ABA gps^{-1} , y se presentó el pico característico al momento de la deshidratación alcanzando un valor de 0.05 μg de ABA gps^{-1} .

Aunque la regresión (Tabla 5-6) de cada temporada dio altamente significativa los R^2 son muy bajos, ya que los aumentos de ABA se dan por picos en una momento de la deshidratación. Para el experimento en laboratorio la regresión dio no significativa.

Tabla 5-6 Modelos de regresión para ABA en función del CHR. (p) probabilidad de la regresión

		R^2	p
Inicio de la época seca	$\text{ABA}=0.1742-2.49\text{E}-3*\text{CHR}+1.32\text{E}-5*\text{CHR}^2$	0.3289	0.0102
Mediados de la época seca	$\text{ABA}=0.0553+2.46\text{E}-3*\text{CHR}-1.77\text{E}-5*\text{CHR}^2$	0.4208	0.0019
Final de la época seca	$\text{ABA}=0.0618+1.98\text{E}-4*\text{CHR}-1.03\text{E}-7*\text{CHR}^2$	0.6746	0.0000
Laboratorio	No significativo	0.0787	0.3897

Figura 5-11 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de ABA en *P. schreberi*, en un ciclo de 24 horas en el Páramo de Chingaza, **A** inicio de época seca, **B** mediados de época seca y **C** finales de época seca. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha = 5\%$

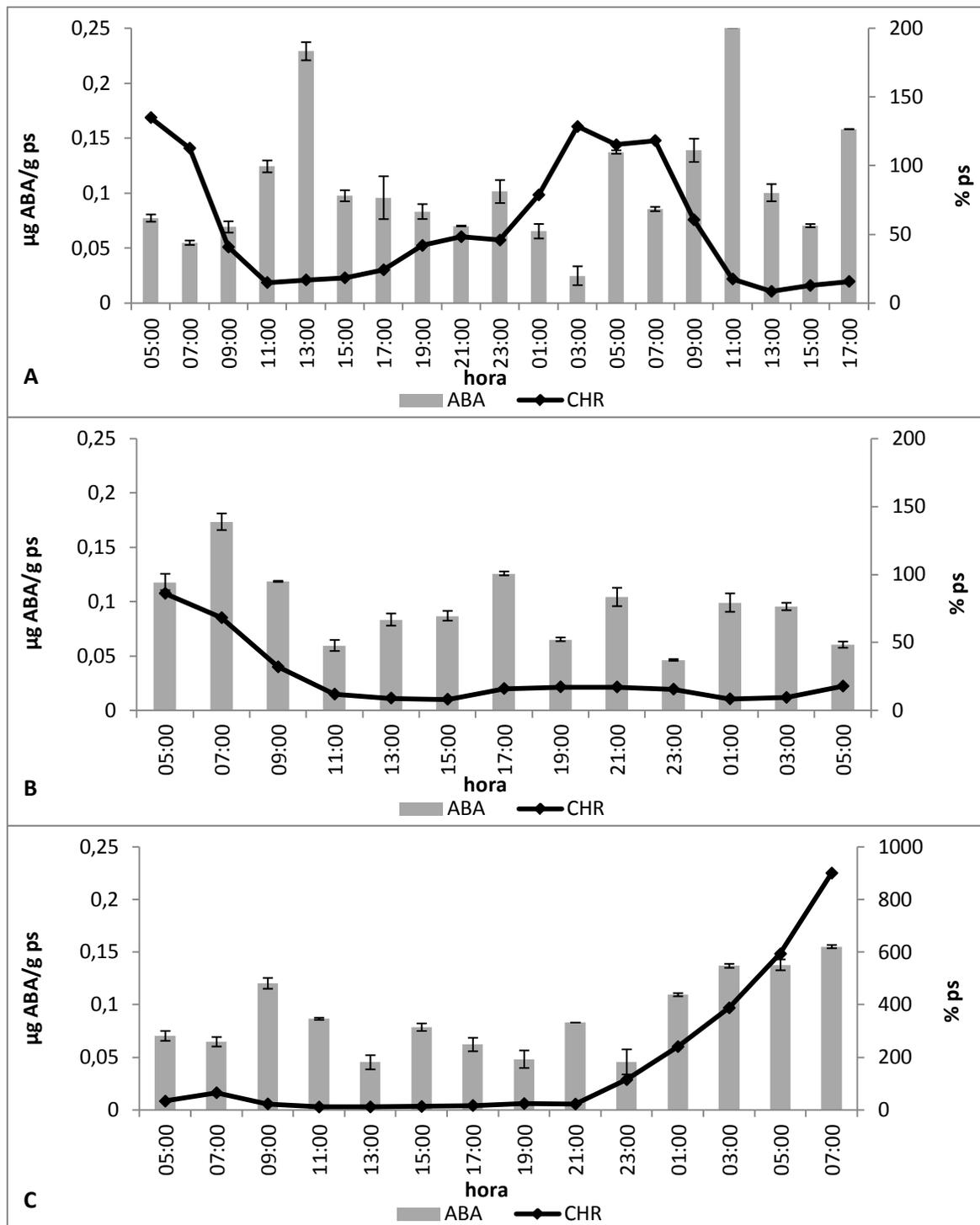
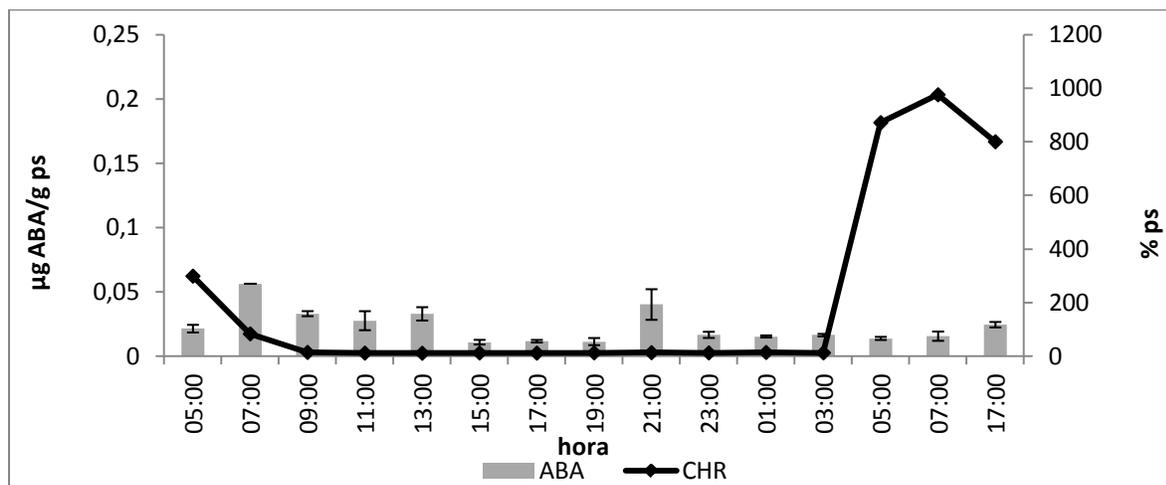


Figura 5-12 Efecto de la variación del contenido hídrico relativo (CHR) en el contenido de ABA de *P. schreberi*, en un ciclo de 36 horas bajo condiciones de laboratorio. Valores de medias, +/- desviación estándar $\alpha=5\%$.



5.4 Discusión de resultados

De acuerdo a lo observado en azúcares totales solubles y sacarosa *P. schreberi* presenta un sistema de protección contra estrés hídrico utilizando polisacáridos para realizar el ajuste osmótico y equilibrar la célula a las condiciones secas del medio, posiblemente bajando el potencial hídrico, ya que se han registrado en estudios con el musgo *Tortula ruralis* que el potencial hídrico puede descender a valores inferiores a -70 MPa (Oliver *et al.* 2005, Ramanjulu y Bartels 2002, Alpert 2000, Proctor 2000, Robinson *et al.* 2000, Seel *et al.* 1992).

Es posible que el aumento de sacarosa observado esté relacionado con el fenómeno de vitrificación del citoplasma el cual depende principalmente de este disacárido, ya que en horas del medio día en las tres temporadas se registraron contenidos hídricos inferiores al 20%. La vitrificación permite disminuir la velocidad de las reacciones químicas dentro de la célula y así ayuda a preservar macromoléculas y la integridad de la membrana por períodos prolongados de tiempo (Proctor *et al.* 2007, Oliver *et al.* 2005, Robinson *et al.* 2000), aunque faltan estudios para entender este fenómeno en briófitos en general.

También se ha definido la función de osmoprotectores para varios azúcares solubles entre ellos la sacarosa por su capacidad de formar puentes de hidrógeno con y entre macromoléculas estabilizando su estructura y la funcionalidad de la enzimas (Oliver 2009, Alpert 2006, Oliver *et al.* 2005, Ramanjulu y Bartels 2002). Así, se puede asociar el incremento de sacarosa en *P. schreberi* en el momento de la deshidratación con la alta actividad catalasa y la pronta recuperación de la actividad fotosintética en la rehidratación de la primera temporada y en laboratorio, con una posible función de protección de las membranas de los cloroplastos y las proteínas constituyentes de los fotosistemas.

Se ha observado en musgos tolerantes a la deshidratación que los altos niveles de sacarosa también son usados como una fuente de energía almacenada que puede ser utilizada para ensamblar proteínas y otras tareas, mientras se restauran los procesos fotosintéticos (Brinda *et al.* 2011, Robinson *et al.* 1999). En el caso de *P. schreberi* esto explicaría por qué disminuye el contenido de sacarosa en la temporada dos y tres del páramo y en laboratorio a pesar de seguir deshidratado, y además se relaciona el hecho con el mantenimiento de las altas actividades catalasa durante la deshidratación y de la peroxidasa en la rehidratación, aun cuando la actividad fotosintética tarda en recuperarse en la tercera temporada como se observó en el capítulo tres.

Esta capacidad de aumentar el contenido de polisacáridos en *P. schreberi* se presenta cuando la deshidratación es lenta, ya que en las pruebas de laboratorio donde se realizó la deshidratación con sílicagel (rápida) el aumento de los azúcares totales solubles y entre ellos la sacarosa no fue tan importante como en páramo. En varias investigaciones con musgos estresados se ha observado el efecto de la velocidad de deshidratación, encontrándose que algunos de los sistemas de defensa (ajuste osmótico, sistema antioxidante, etc.) actúan en mayor magnitud cuando los musgos disminuyen el CHR lentamente (Dhindsa 1991, Dhindsa y Matowe 1981, Malek y Bewley 1978). Esto también supone que estos polisacáridos no son una adaptación constitutiva para sobrevivir al estrés hídrico sino que se activa como consecuencia de la deshidratación. Por otra parte, se apreció una mayor concentración de azúcares en los musgos expuestos en a estrés en páramo durante la primera temporada que en laboratorio, como una adaptación de *P. schreberi* a aprovechar al máximo las rehidrataciones que se presentan en horas de la madrugada y poder realizar fotosíntesis eficientemente con las primeras horas de luz para acumular azúcares para protección y fuente de energía, que serán utilizadas en momentos de mayor déficit hídrico como lo fue la segunda temporada de la época seca.

Por lo general se reconoce el papel esencial de los disacáridos (y otros azúcares) en la tolerancia a la deshidratación de los musgos, incluso en el musgo tolerante a la deshidratación *Tortula ruralis* alcanza a ser el 10% del peso seco (Proctor *et al.* 2007, Proctor y Tuba 2002), pero en relación con la sacarosa se habían encontrado concentraciones altas en especies de musgos tolerantes como *Dicranum majus*, *Hookeria lucens*, *Polytrichum commune*, *Racomitrium lanuginosum*, *Thuidium tamariscinum* and *Tortula ruraliformis* que estaban entre 100 y 500 $\mu\text{mol g ps}^{-1}$, y también en la hepática *Porella platyphylla* (Proctor *et al.* 2007, Olivert *et al.* 2005, Kavi 2005, Smirnoff 1995, Marschall 1998). Sin embargo, estas altas concentraciones de sacarosa en musgos tolerantes a la deshidratación eran constantes durante todo el ciclo de deshidratación-rehidratación, por lo tanto el hecho que *P. schreberi* en páramo aumente el contenido de sacarosa durante la deshidratación, como es común en plantas vasculares y otros microorganismos tolerantes a la deshidratación, se convierte en uno de las primeras observaciones de este fenómeno para briófitos. Aumentos en el contenido de azúcares solubles durante estrés hídrico también han sido reportados para el musgo *Atrichum androgynum* (Mayaba *et al.* 2001), así como para el musgo *Physcomitrella patens* se reportó un aumento en azúcares solubles de bajo peso molecular siendo el más importante la teanderosa (Nagao *et al.* 2006).

Los contenidos de azúcares reductores y entre ellos el de fructosa no variaron durante los ciclos de deshidratación-rehidratación no participando en la prevención del daño por estrés hídrico. Se conoce de los azúcares reductores que desnaturalizan las proteínas en seco (Alpert 2006, Proctor y Tuba 2002). En varias investigaciones con musgos tolerantes a la deshidratación, entre ellos del género *Tortula*, se ha encontrado que los azúcares reductores permanecen estables o disminuyen cuando se presenta la deshidratación y que los contenidos de Glucosa y Fructosa son menos de un décimo del contenido de sacarosa, (Smirnoff 1992). Estas disminuciones en los contenidos de glucosa y fructosa también se han observado en musgos tolerantes al congelamiento de la Antártida como son *Schistidium antarctici*, *Ceratodon purpureus*, *Bryum pseudotriquetrum* y la hepática *Cephaloziella varians* (Brinda *et al.* 2011).

La prolina es uno de los osmolitos más asociados a la tolerancia a la deshidratación en plantas vasculares; sin embargo, en el caso de *P. schreberi* se encontró tanto para los experimentos en páramo como en laboratorio que disminuía su contenido con la disminución del CHR; aunque su concentración fue mayor en páramo que en laboratorio

en especial al inicio de la época seca. En estudios realizados en páramo con el musgo *Racomitrium crispipilum* se encontró similar comportamiento, donde no se aprecia una participación de la prolina en la tolerancia ante el estrés hídrico (Barón *et al.* 2009). Tampoco se han encontrado cambios significativos en la concentración de prolina para otro tipo de estrés en musgos como el de metales pesados, que se ha estudiado ampliamente en la especie *Fiontinalis antipyretica* (Rau *et al.* 2007). En general se ha observado que glicin betaína y la prolina no tienen función de osmolitos en briófitos (Proctor 200). También en algunas plantas vasculares se ha encontrado que las concentraciones de prolina no son una adaptación a la tolerancia a estrés osmótico sino una consecuencia de daño (Ashraf y Foolad 2007).

Sin embargo, la disminución del contenido de prolina durante las horas de bajos CHR se puede asociar con la participación de la prolina en otros procesos como la formación de proteínas del sistema antioxidante. Además se ha encontrado en plantas vasculares y en el musgo *Mnium affine* que la prolina participaba en activar y proveer termoestabilidad a las enzimas catalasa y peroxidasa (Öztürk y Demir 2002, Christov *et al.* 2000). En el caso de *P. schreberi* tanto en páramo como en laboratorio la actividad POD aumentó al tiempo que aumentaba el contenido de prolina, cumpliendo así un posible papel de adaptación para activar enzimas que defienden la planta en el momento de la rehidratación, en especial los fotosistemas como se observó en el aumento de la eficiencia fotosintética con la llegada del agua (capítulo 3).

Los estudios de prolina en tolerancia a la deshidratación aun son escasos en briófitos, constituyéndose este trabajo en *P. schreberi* en un aporte para el entendimiento de su participación en los procesos de tolerancia a la deshidratación.

El ácido abscísico (ABA) llamada la hormona del estrés está bien reflejada en *P. schreberi* tanto en páramo como en laboratorio, siendo más expresada en el primero. Los picos que presenta ABA en cada una de las temporadas se relacionan con su función de señal del estrés e inducción de genes asociados a la tolerancia a la deshidratación, ya que con el aumento de la concentración de ABA se desencadena el aumento en la actividad catalasa, en proteínas totales solubles, en azúcares totales solubles y en sacarosa. En las especies de musgos su tolerancia aumenta cuando son expuestas a períodos cortos de sequía que funcionan como endurecimiento y esto está mediado por

el ABA (Proctor 2009); en el caso de páramo este período se presentó al inicio de la época seca con ciclos diarios de deshidratación-rehidratación.

Los tipos de genes que son inducidos por la deshidratación donde interviene el ABA codifican proteínas que se clasifican en diferentes categorías: las proteínas implicadas en las vías de transducción de señales que regulan los genes en la respuesta al estrés, las proteínas que participan en el metabolismo de los carbohidratos en especial la acumulación de sacarosa, las proteínas de protección como las que estabilizan los cloroplastos, las LEA, las proteínas de choque térmico, las acuapurinas y las proteínas involucradas en el sistema antioxidante. A pesar de esto, no se ha podido detectar en musgos tolerantes a la deshidratación aumentos significativos de ABA durante los ciclos de deshidratación-rehidratación como es el caso de *Tortula ruralis*, ni acúmulo de dehidrinas durante la hidratación (Oliver 2009), lo que hace que el registro de *P. schreberi* en páramo aporte al entendimiento de esta hormona en la fisiología del estrés en briófitos.

En contraste se han realizado investigaciones donde se ha incrementado la resistencia a la deshidratación por aplicación exógena de ABA, en el musgo *Atrichum androgynum* aumento la estabilidad de las membranas por modificación de los lípidos brindando protección ante deshidratación (Guschina *et al.* 2002, Mayaba *et al.* 2001), en la misma especie Beckett *et al.* (2000) encontró que los valores de Fo, Fm, Fv/Fm, ϕ PSII declinaron en especies tratadas y no tratadas con ABA cuando el musgo está deshidratado pero en la rehidratación se recuperaron más rápido las plantas con el tratamiento de ABA exógeno, situación similar a la presentada por *P. schreberi* en páramo en este trabajo. En *Funaria hygrometrica* acumuló proteínas durante el secado con aplicación de ABA (Oliver 2009, D'Souza y Mohan 2002), lo que implica en general que los briófitos tienen la maquinaria molecular para reaccionar ante el ABA. En el musgo *Physcomitrella patens* los tratamientos con ABA mostraron un rápido acúmulo de azúcares solubles cuando era expuesto a deshidratación y una disminución en el contenido de almidón (Nagao *et al.* 2005). En el trabajo realizado por Coming *et al.* (2007) en *P. patens* encontraron que tratamientos con ABA induce 56 genes principalmente asociados a LEAs, también se ha encontrado que regula la expresión de los transcriptos *MCamb1* y *MCamb2*, por aplicaciones exógenas de ABA, aumentando su recuperación después de procesos de estrés (Takezawa y Minami 2004, Minami *et al.* 2003). Además *P. patens* ha sido un musgo empleado para el reconocimiento de genes

dependientes de ABA asociados a la tolerancia a la deshidratación y relaciones evolutivas (Frank *et al.* 2005).

5.5 Conclusiones

Pleurozium schreberi creciendo en los páramos andinos es un musgo tolerante a la deshidratación para lo cual presenta una serie de adaptaciones bioquímicas que le permite sobrevivir a períodos de déficit hídrico extremos, como son:

Alto contenido de azúcares solubles en especial de sacarosa y bajos niveles de azúcares reductores. Registrando además un mayor aumento de sacarosa en los momentos de menor contenido hídrico relativo, aspecto no evidenciado en otros estudios realizados con musgos tolerantes a la deshidratación.

Sacarosa puede ser el osmolito más importante durante la deshidratación de *P. schreberi* en épocas secas en el páramo, cumpliendo funciones de ajuste osmótico, vitrificación, osmoprotección y fuente de energía.

En *P. schreberi* la prolina no es un osmolito importante en el ajuste osmótico durante la deshidratación, sin embargo su aumento de concentración en el momento de la rehidratación puede estar asociado a promover la actividad peroxidasa.

En *P. schreberi* se presenta un aumento en la hormona ABA cuando el musgo disminuye su CHR por debajo de 50 % y cuando se presenta alta radiación y baja humedad relativa en el páramo; posiblemente induciendo genes asociados al aumento del contenido de sacarosa, incremento en la actividad específica catalasa y proteínas que protegen los fotosistemas. Los contenidos endógenos de ABA no han sido fácilmente estudiados en otras especies de musgos ni se han encontrado los picos registrados aquí en momentos de déficit hídrico lo que constituye este trabajo en uno de los primeros reportes de la actividad endógena de ABA en musgos.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

Los páramos de Colombia son ecosistemas únicos, fuentes de agua y donde nacen un número grande de ríos, además se encuentran reservas hídricas en embalses, lagos y pantanos. Sin embargo, los páramos presentan características ambientales extremas para los organismos vivos en especial las plantas, como son alta radiación U.V, temperaturas elevadas en horas de la tarde y temperaturas bajas (incluso debajo de 0°C) en horas de la noche, fuertes vientos secos, en época húmeda abundancia de lluvia que inunda los suelos y en época seca bajos potenciales hídricos en el aire y el suelo. Todas estas condiciones hacen que las plantas estén permanentemente en condiciones de tensión y tengan que adaptar su metabolismo en ocasiones a cambios fuertes que se presentan en menos de 12 horas; es por eso que la vegetación típica de estos ecosistemas es xerofítica, igual que en los desiertos, ya que incluso con lluvia las bajas temperaturas no permiten que las plantas tomen el agua fácilmente del suelo.

Pleurozium schreberi es un musgo cosmopolita, presente en diferentes ecosistemas y condiciones ambientales, desde las zonas templadas con estaciones hasta el trópico en bosques de clima frío y páramos. En Colombia es una especie abundante en los páramos, crece muy bien en asociación con gramíneas y frailejones cubriendo grandes extensiones de terreno.

P. schreberi es un típico musgo poiquilohídrico cuyo contenido hídrico cambia con la variación del agua líquida o de la humedad del aire que lo rodea en el momento. Por no tener cutícula ni sistema de transporte interno el agua entra y sale de las células y de la planta en general con mucha facilidad. Durante la época de lluvias en el páramo almacena hasta 9 veces su peso seco en agua y crece a altas tasas formando colchones de más de un metro de profundidad, pero cuando el medio está seco, como en el desarrollo de esta investigación, entra en déficit hídrico en pocos minutos, llegando a perder hasta el 90% de su contenido hídrico y sobreviviendo con bajos potenciales hídricos por días e incluso semanas. Esto permite catalogar a *P. schreberi* como un briófito tolerante a la deshidratación.

Esta capacidad de tolerancia de *P. schreberi* a la deshidratación está basada en adaptaciones constitutivas y sistemas de reparación durante y después de la rehidratación, que le permite sobrevivir a déficit hídricos fuertes por períodos prolongados de tiempo, sugiriendo el siguiente modelo:

Adaptaciones morfológicas y Anatómicas:

P. schreberi presenta hojas adpresas y reflexas⁹ en todo el tallo principal y las ramas, que forman canales capilares importantes a todo lo largo de la planta. El transporte del agua por estos capilares se ve facilitado ya que la planta es baja y postrada recorriendo distancias cortas en forma horizontal. El caulidio¹⁰ presenta células de la corteza pequeñas y con paredes muy gruesas, en comparación con las células centrales (3 a 5 veces más grandes), esto es una adaptación a transportar la mayor parte del agua a través de la vía apoplasto en los caulidios, de igual forma la carencia de cutícula en la corteza facilita la entrada y salida de agua a lo largo de todo el caulidio por esta misma vía. La hoja de *P. schreberi* es plegada y cóncava lo que permite el almacenamiento de agua y el movimiento de la misma gracias a la formación de espacios capilares; también presenta células alares, que son grandes y huecas cuya función es la toma y almacenamiento de agua. La hoja presenta un grosor de una célula con lúmenes pequeños y paredes celulares gruesas, característica importante para la toma y transporte de agua vía apoplasto (Montenegro *et al.* 2005).

Estas adaptaciones morfológicas y anatómicas de *P. schreberi* le permiten capturar y transportar el agua rápidamente por toda la planta, como un musgo ectohídrico, y así aprovechar en la época seca cualquier momento de humedad por rocío, niebla o un aumento en la humedad relativa del aire.

Adaptaciones fisiológicas

P. schreberi, de acuerdo a la presente investigación, cuando entra en déficit hídrico detiene la fotosíntesis reactivándola al recuperar el contenido hídrico. Esta adaptación le permite proteger la antena de los fotosistemas y así empezar a fotosintetizar inmediatamente retorna el agua a las células, incluso alcanza los valores normales de

⁹ Reflexo (a): encorvado hacia abajo (abaxialmente) y hacia adentro, refiriéndose, generalmente, a los márgenes de las hojas u hojas sobre el tallo.

¹⁰ Caulidio: eje que soporta los filidios (hollas) en los musgos, similar a tallo o rama.

fotosíntesis en las primeras dos horas de iniciada la rehidratación. Esto también muestra que posiblemente protege la integridad de los cloroplastos y mantiene los pigmentos durante el déficit hídrico. Sin embargo esta adaptación es para períodos cortos de déficit hídrico, cuando el musgo se hidrata en la madrugada, pero en períodos prolongados de días o semanas de déficit hídrico alcanza a presentarse algún daño, lo que a pesar de fotosintetizar inmediatamente con la rehidratación, le toma más tiempo alcanzar las tasa normales, teniendo que utilizar sistemas de reparación por rehidratación.

Está adaptación fisiológica para tolerar la deshidratación le permite fotosintetizar eficientemente en los pocos momentos que se presente un contenido hídrico adecuado y de factores ambientales como la luz, es así como *P. schreberi* en época de sequía aprovecha una máximo de dos horas en la mañana para fotosintetizar y mantener los niveles de azúcares necesarios para los procesos metabólicos y de protección.

Cuando *P. schreberi* entra en déficit hídrico disminuye la tasa de respiración a niveles cercanos a cero, evitando el gasto de sustratos energéticos y la formación de especies reactivas de oxígeno. De igual forma se recupera inmediatamente cuando se inicia la rehidratación con tasa altas de respiración para la obtención de energía necesaria para los procesos de protección y reparación en la rehidratación. Este proceso hace suponer que durante la deshidratación se mantiene la integridad de mitocondrias.

P. schreberi fisiológicamente para tolerar la deshidratación detiene muchos procesos metabólicos y disminuye su tasa de respiración entrando en un estado de latencia, para sobrevivir al déficit hídrico por períodos prolongados de tiempo.

Adaptaciones bioquímicas

En *Pleurozium schreberi* la señal del estrés hídrico es muy probable dada por el ABA, y es la primera vez que se registra para un musgo. Cuando el contenido hídrico relativo disminuye al 50 % ps o menos, se presenta un pico de aumento de ABA y éste desencadena todos los procesos de tolerancia a deshidratación encontrados en esta investigación, así:

En primer lugar se generan mecanismos de ajuste osmótico, vitrificación del contenido celular y osmoprotección, síntesis de proteínas, y aumento del contenido de azúcares solubles totales durante todo el período de condiciones secas. Además, en los momentos de mayor déficit hídrico, se presentan incrementos adicionales de metabolitos, como la

sacarosa, aspecto que también se registra por primera vez para un musgo. Este contenido de sacarosa empieza a disminuir si el período de déficit hídrico se prolonga por varios días, posiblemente es utilizada como fuente de energía debido a que la fotosíntesis está detenida.

En segundo lugar se generan procesos de protección ante estrés oxidativo y mantenimiento de la síntesis de proteínas posiblemente asociadas al sistema fotosintético y protección de membranas. Para esto se presenta un aumento en el contenido de proteínas totales solubles en los momentos de mayor déficit hídrico, lo cual puede estar asociado a enzimas del sistema antioxidante o proteínas tipo LEA. Al mismo tiempo aumenta la actividad catalasa para proteger contra el H_2O_2 que se produce durante el estado de deshidratación.

Por último se desencadenan procesos de protección y reparación para el momento de rehidratación y pos-rehidratación. Para eso aumenta la actividad enzimática de peroxidasa que protege contra el H_2O_2 que se forma característicamente en la rehidratación, esto viene acompañado con un aumento en la concentración de prolina que estimula y protege la actividad de la peroxidasa. Estos procesos presuponen que durante la deshidratación se conservan la integridad de ribosomas y permanecen estables los ARNs.

Otras consideraciones al modelo

Pleurozium schreberi difiere su respuesta dependiendo de la velocidad de deshidratación, cuando es lenta, como sucede en páramo que puede tomar 2 a 4 horas, el modelo se expresa típicamente. Sin embargo, si la velocidad de deshidratación es rápida, como sucede en el laboratorio en menos de dos horas, no alcanza a expresar todas las adaptaciones bioquímicas encontradas y su supervivencia depende de las adaptaciones constitutivas de la especie.

Pleurozium schreberi puede presentar procesos de endurecimiento que aumentan su tolerancia a la deshidratación, esto se consigue por ciclos repetidos de deshidratación-rehidratación, como sucede en el páramo al inicio de la época seca, y se manifiesta porque el contenido de azúcares (entre ellos sacarosa) y la concentración de ABA en general son mayores que en especímenes no estresados, incluso cuando se encuentran en el momento de la rehidratación en el páramo.

Finalmente esta investigación se constituye en uno de los primeros trabajos sobre ecofisiología de briófitos en el neotrópico y el primero en el ecosistema páramo que abarca varios aspectos fisiológicos y bioquímicos para entender la tolerancia a la deshidratación del musgo *Pleurozium schreberi*, que es capaz de sobrevivir con un CHR de 8 % ps durante períodos prolongados de tiempo, y se adapta a cambios ambientales extremos propios del páramo que se presentan desde cada 12 horas o meses.

6.2 Recomendaciones

En esta investigación se encuentra una vez más que el funcionamiento de las plantas en el trópico difiere de los registros de plantas de la zona templada. En especial cuando se estudian ecosistemas únicos de la región como son los páramos. Es por eso que se hace necesario continuar con las investigaciones que permitan entender y aprovechar las plantas adaptadas a nuestros ecosistemas.

El estudio de la fisiología y ecofisiología de los briófitos en nuestros ecosistemas está empezando y con este trabajo se espera fortalecer una línea de investigación que contribuya a su entendimiento y a futuro aprovechamiento de estas pequeñas plantas.

De cada capítulo quedan nuevas hipótesis por confirmar y nuevos estudios que complementar, otras enzimas del sistema antioxidante, estabilidad de membranas, pigmentos protectores, respiración y fotosíntesis en campo, etc. Quedan abiertas las puertas para todo un campo de la ciencia en Colombia.

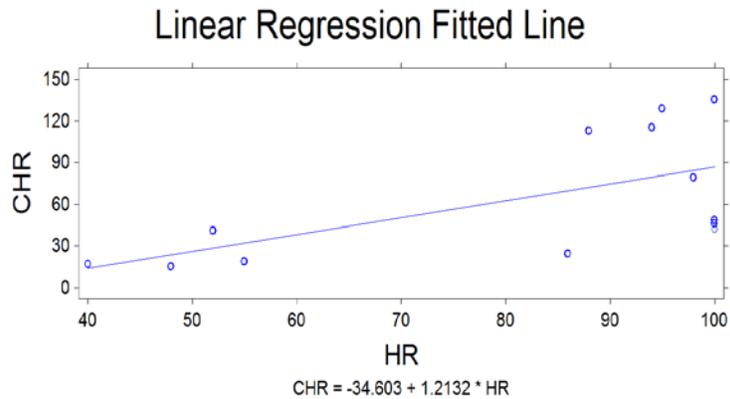
A. ANEXO: ANÁLISIS ESTADÍSTICO CAPÍTULO 2.

Análisis de Varianza para CHR en las tres temporadas

Temporada	P	0.0000
Hora	P	0.0000
Temporada*hora	P	0.0000

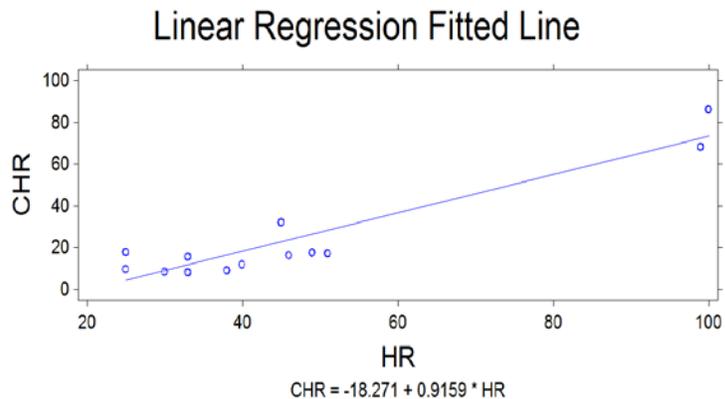
Regresión lineal por mínimos cuadrados de CHR vr HR al inicio de la época seca en el Páramo de Chingaza

Constant	P	0.0384
HR	P	0.0000
R ²		0.3800
Regression	P	0.0000



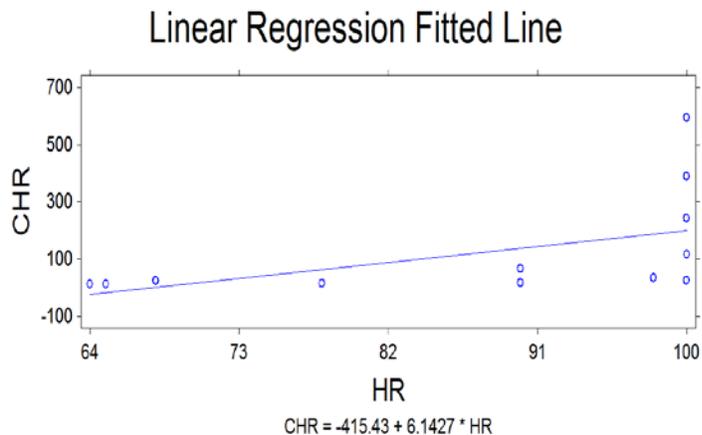
Regresión lineal por mínimos cuadrados de CHR vr HR a mediados de la época seca en el Páramo de Chingaza

Constant	P	0.0000
HR	P	0.0000
R ²		0.9016
Regression	P	0.0000



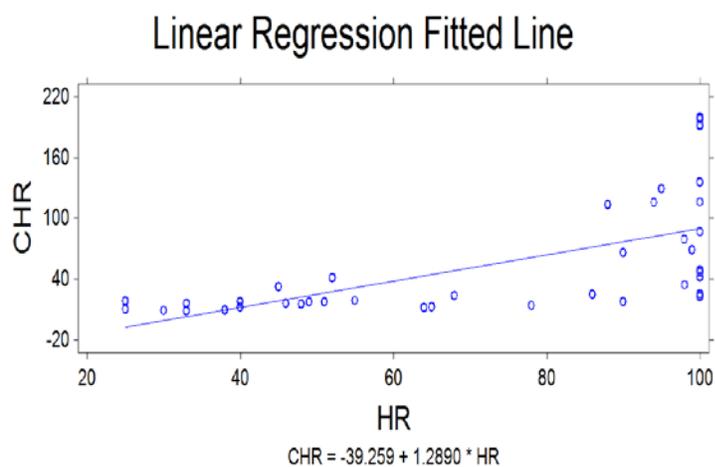
Regresión lineal por mínimos cuadrados para CHR vr HR a finales de la época seca en el Páramo de Chingaza

Constant P 0.0024
 HR P 0.0001
 R^2 0.2379
 Regression P 0.0001



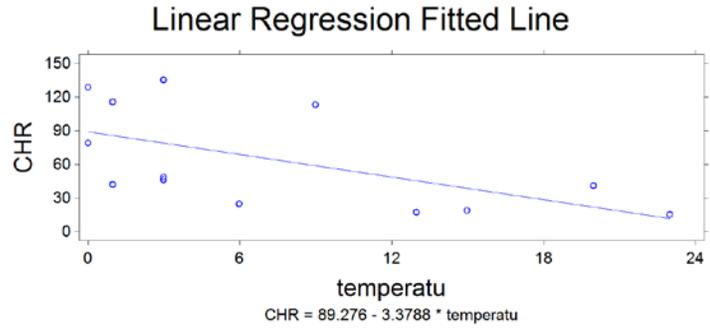
Regresión lineal por mínimos cuadrados de CHR vr HR para toda la época seca en el Páramo de Chingaza

Constant P 0.0000
 HR P 0.0000
 R^2 0.3925
 Regression P 0.0000



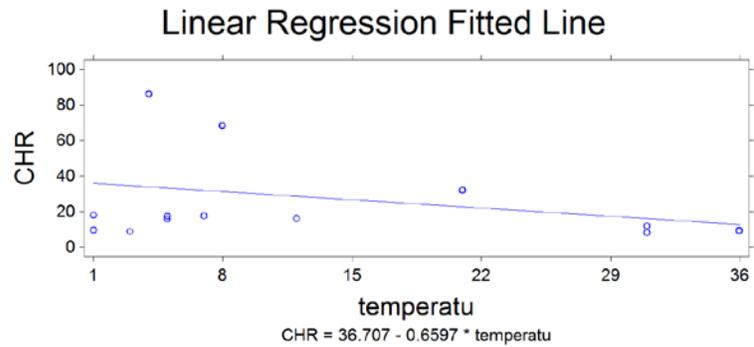
Regresión lineal por mínimos cuadrados para CHR vr Temperatura al inicio de la época seca

Constant	P	0.0000
Temperature	P	0.0000
R ²		0.3382
Regression	P	0.0000



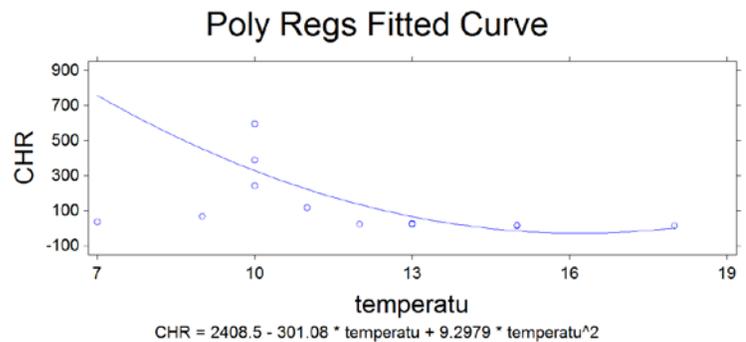
Regresión lineal por mínimos cuadrados para CHR vr Temperatura a mediados de la época seca

Constant	P	0.0000
Temperature	P	0.0177
R ²		0.0932
Regression	P	0.0177



Regresión polinomial para CHR vr Temperatura a finales de la época seca

Constant	P	0.0022
Temperature	P	0.0000
Temperatu2	P	0.0021
R ²	P	0.5034
Regression	P	0.0000

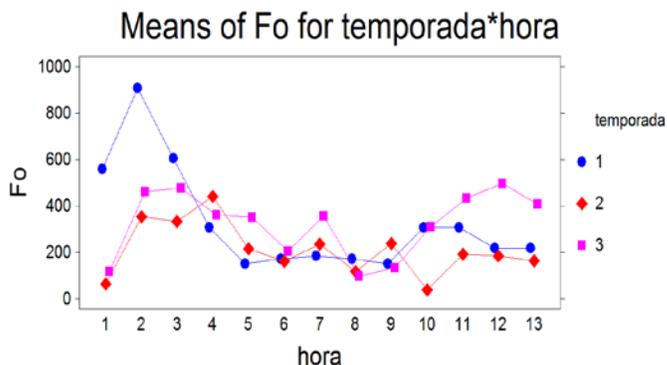


B. ANEXO: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

CAPÍTULO 3

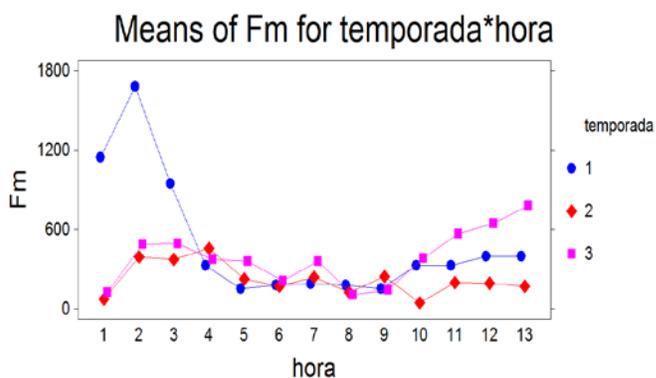
Análisis de varianza para F_o en las tres temporadas (inicio, mediados y final)

Temporada	P 0.0000
Hora	P 0.0000
temporada*hora	P 0.0000



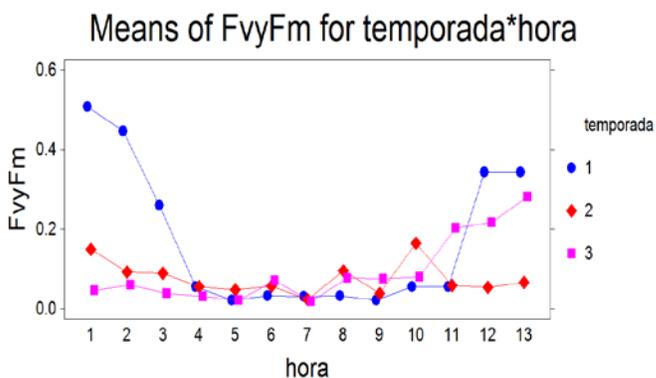
Análisis de varianza para F_m en las tres temporadas (inicio, mediados y final)

Temporada	P 0.0000
Hora	P 0.0000
temporada*hora	P 0.0000



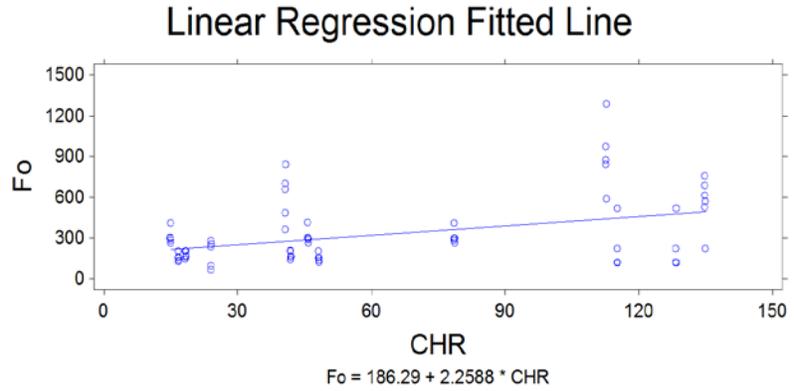
Análisis de varianza para F_v/F_m en las tres temporadas (inicio, mediados y final)

Temporada	P 0.0000
Hora	P 0.0000
temporada*hora	P 0.0000



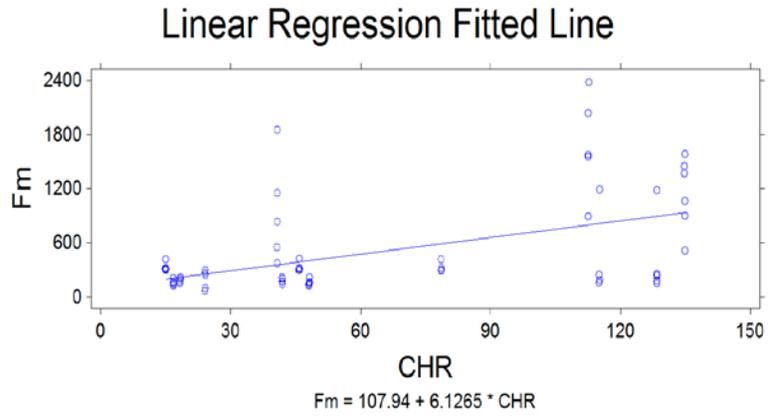
Regresión lineal por mínimos cuadrados de Fo para el inicio de la época seca en el Páramo de Chibgaza

Constant P 0.0005
 CHR P 0.0009
 R² 0.1581
 Regression P 0.0009



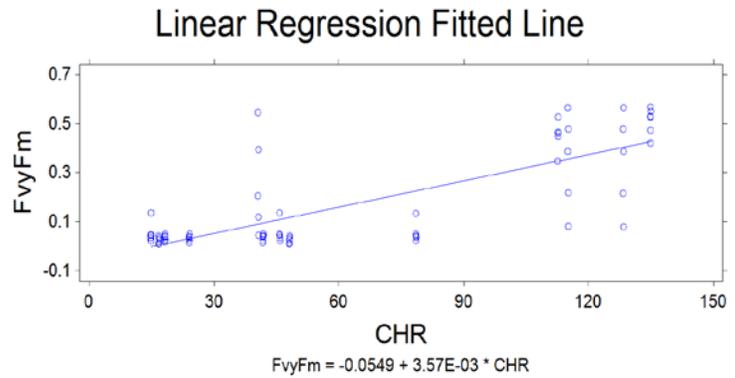
Regresión lineal por mínimos cuadrados de Fm para el inicio de la época seca en el Páramo de Chingaza

Constant P 0.2962
 CHR P 0.0000
 R² 0.2525
 Regression P 0.0000



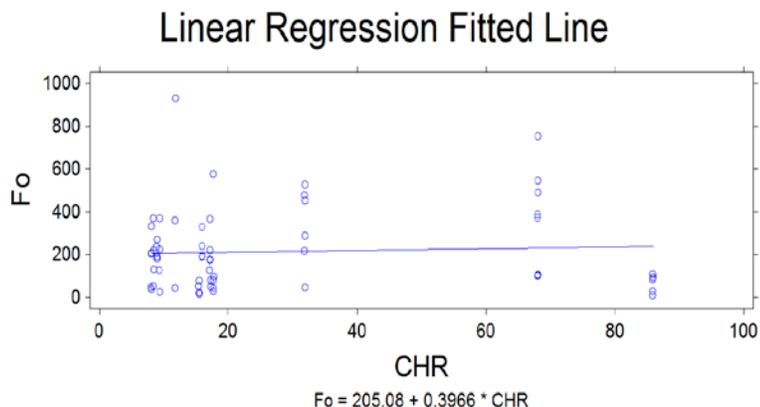
Regresión lineal por mínimos cuadrados de Fv/Fm para el inicio de la época seca en el Páramo de Chingaza

Constant P 0.0530
 CHR P 0.0000
 R² 0.6092
 Regression P 0.0000



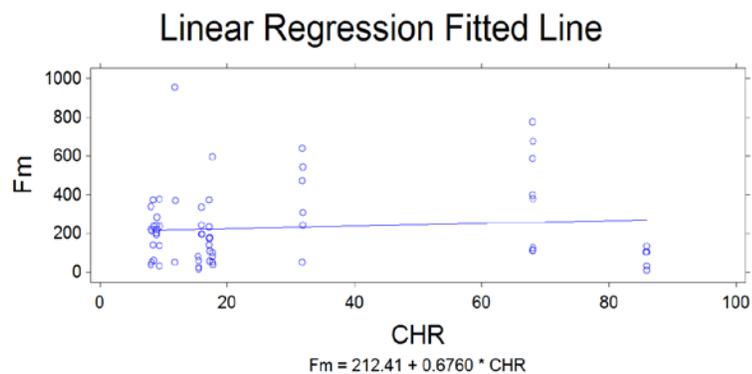
Regresión lineal por mínimos cuadrados de Fo para mediados de la época seca en el Páramo de Chingaza

Constant P 0.0000
 CHR P 0.6821
 R^2 0.0029
 Regression P 0.6821



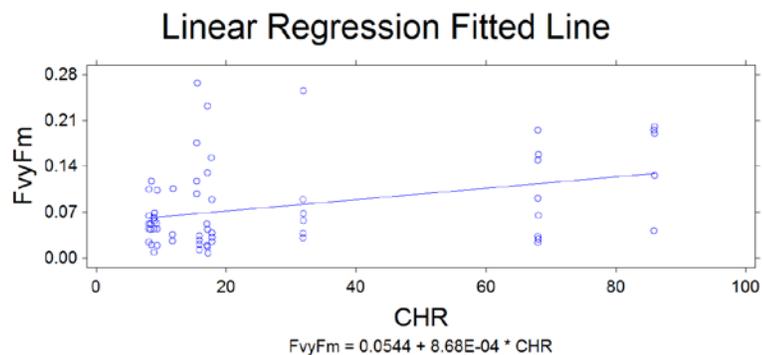
Regresión lineal por mínimos cuadrados de Fm para mediados de la época seca en el Páramo de Chingaza

Constant P 0.0000
 CHR P 0.5142
 R^2 0.0074
 Regression P 0.5142



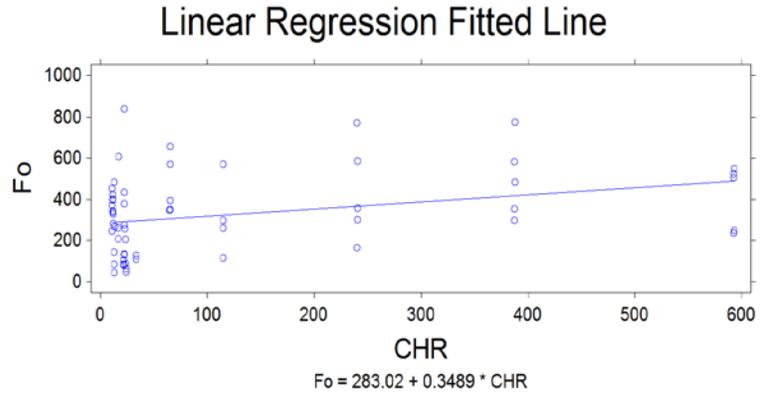
Regresión lineal por mínimos cuadrados de Fv/Fm para mediados de la época seca en el Páramo de Chingaza

Constant P 0.0000
 CHR P 0.0074
 R^2 0.1173
 Regression P 0.0074



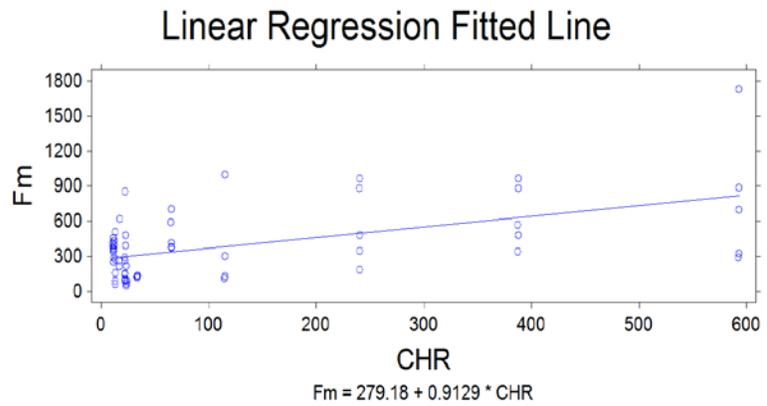
Regresión lineal por mínimos cuadrados de Fo para finales de la época seca en el Páramo de Chingaza

Constant P 0.0000
 CHR P 0.0123
 R² 0.1049
 Regression P 0.0123



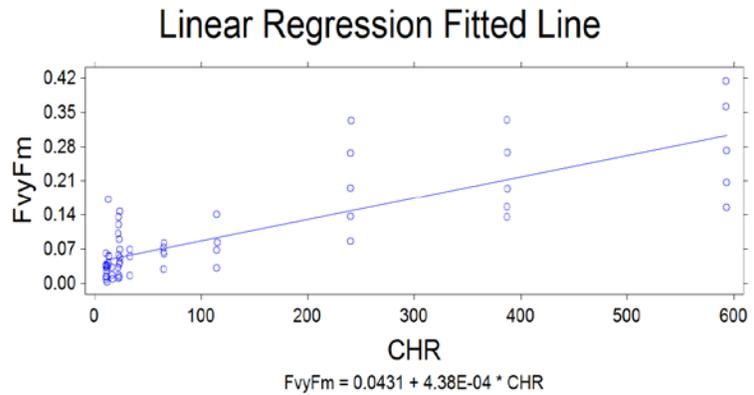
Regresión lineal por mínimos cuadrados de Fm para finales de la época seca en el Páramo de Chingaza

Constant P 0.0000
 CHR P 0.0000
 R² 0.2851
 Regression P 0.0000



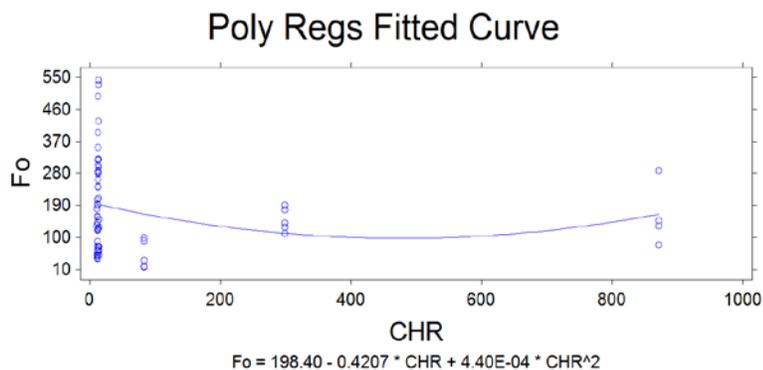
Regresión lineal por mínimos cuadrados de Fv/Fm para finales de la época seca en el Páramo de Chingaza

Constant P 0.0000
 CHR P 0.0000
 R² 0.6544
 Regression P 0.0000

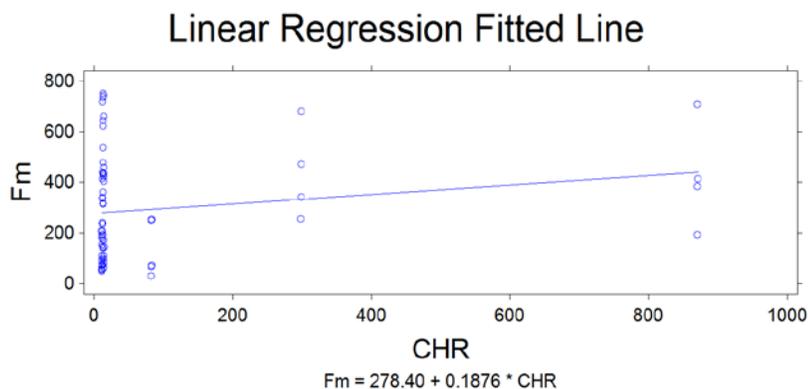


Regresión polinomial de Fo para laboratorio.

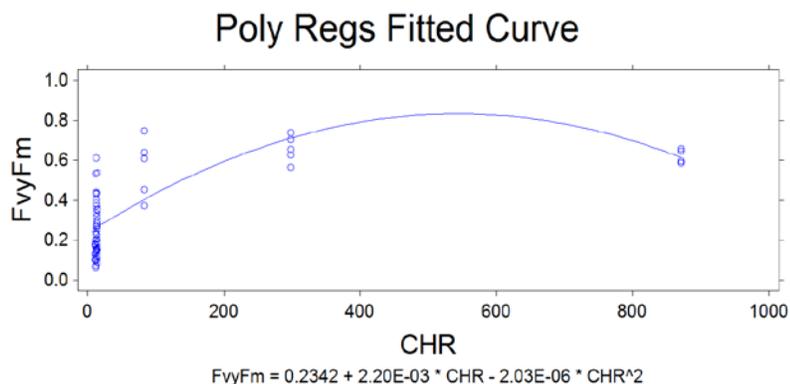
Constant	P	0.0000
CHR	P	0.1774
CHR ²	P	0.2375
R ²		0.0326
Regression	P	0.3765

**Regresión lineal por mínimos cuadrados de Fm para laboratorio**

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.1389
R ²		0.0367
Regression	P	0.1389

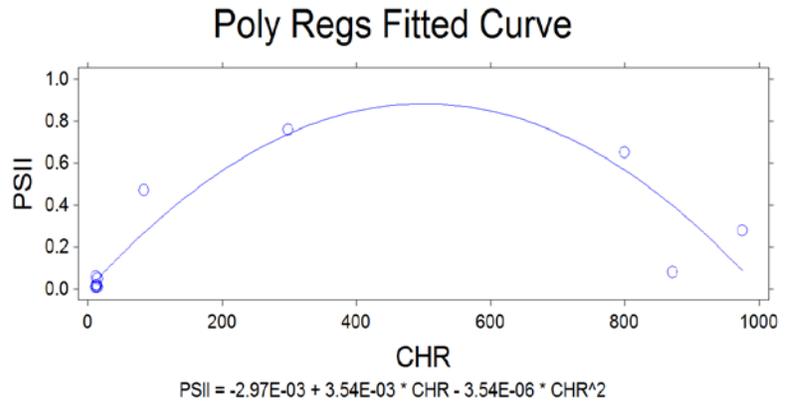
**Regresión polinomial Fv/Fm para laboratorio**

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.0000
CHR ²	P	0.0000
R ²		0.5375
Regression	P	0.0000



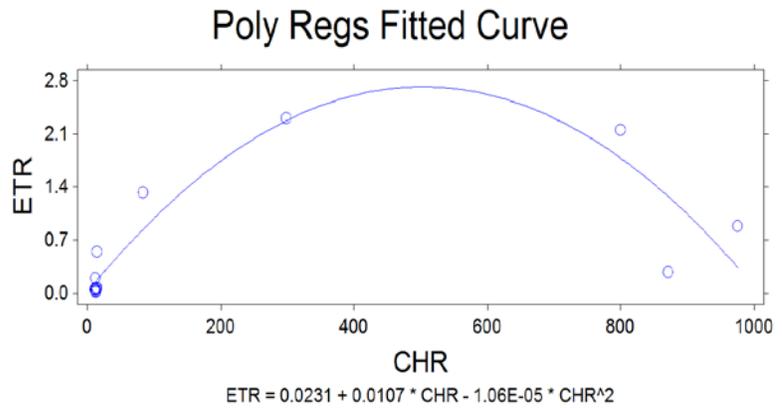
Regresión polinomial de (ϕ PSII) para laboratorio

Constant P 0.0000
 CHR P 0.0000
 CHR² P 0.0001
 R² 0.7875
 Regression P 0.0001



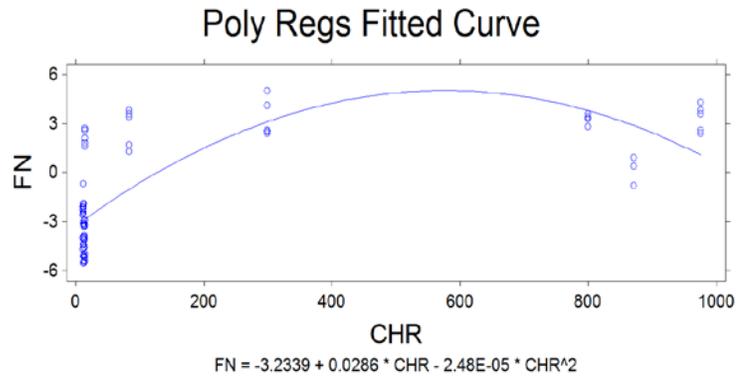
Regresión polinomial de ETR para laboratorio

Constant P 0.0000
 CHR P 0.0000
 CHR² P 0.0002
 R² 0.7796
 Regression P 0.0001



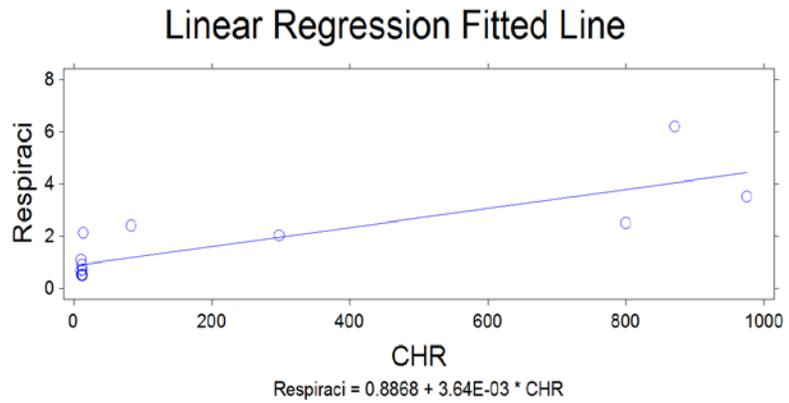
Regresión polinomial de A para laboratorio

Constant P 0.0124
 CHR P 0.0000
 CHR² P 0.0000
 R² 0.5541
 Regression P 0.0000



Regresión lineal por mínimos cuadrados de Respiración para laboratorio

Constant P 0.0069
CHR P 0.0001
 R^2 0.6848
Regression P 0.0001

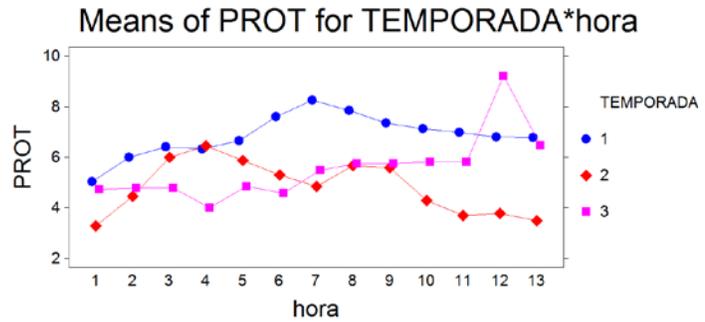


C. ANEXO: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

CAPÍTULO 4

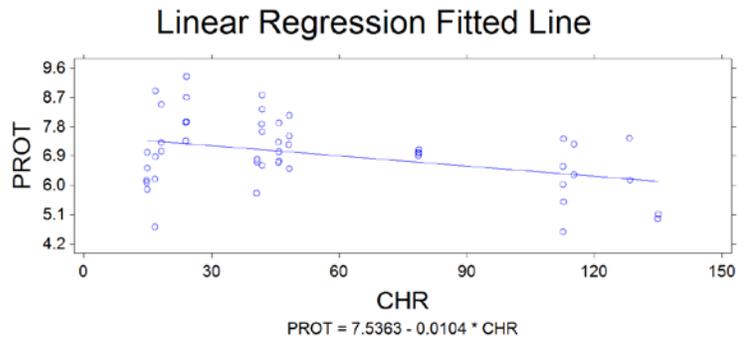
Análisis de varianza para proteínas totales en las tres temporadas (inicio, mediados y final)

TEMPORADA	P	0.0000
Hora	P	0.0000
TEMPORADA*hora	P	0.0000



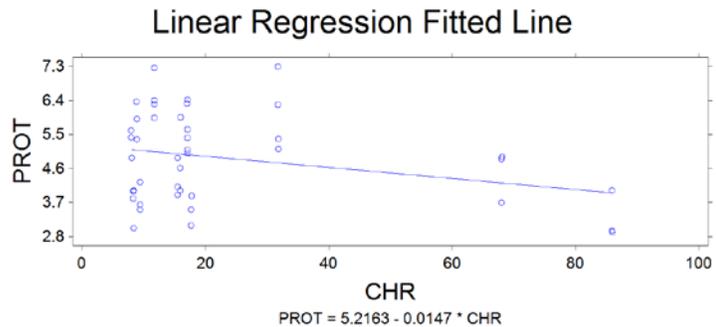
Regresión lineal por mínimos cuadrados de proteínas totales el inicio de la época seca en el Páramo de Chingaza

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.0063
R ²		0.1480
Regression	P	0.0063



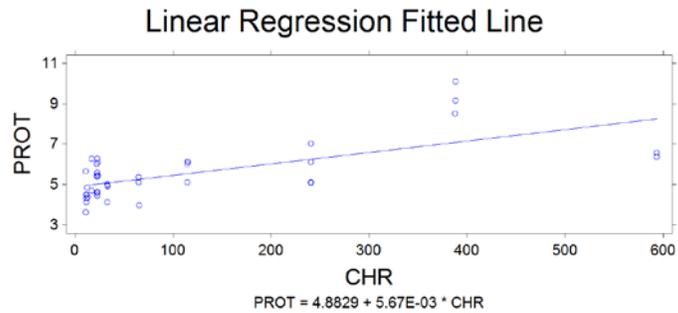
Regresión lineal por mínimos cuadrados de proteínas totales a mediados de la época seca en el Páramo de Chingaza

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.0665
R ²		0.0817
Regression	P	0.0665



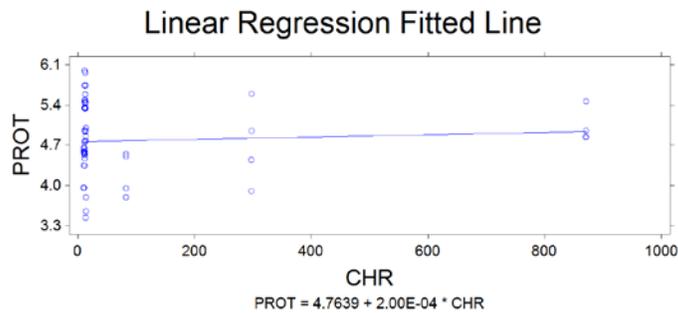
Regresión lineal por mínimos cuadrados de proteínas totales a finales de la época seca en el Páramo de Chingaza

Constant P 0.0000
 CHR P 0.0000
 R^2 0.4404
 Regression P 0.0000



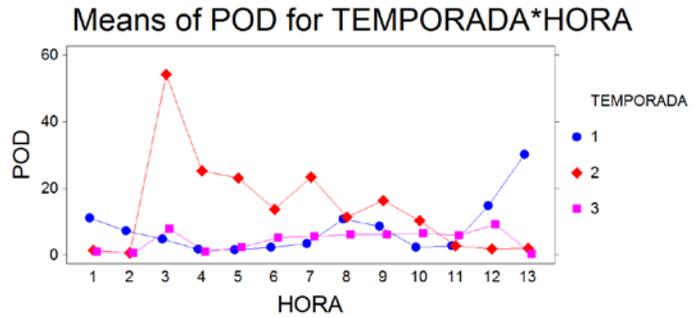
Regresión lineal por mínimos cuadrados de proteínas totales en laboratorio

Constant P 0.0000
 CHR P 0.5878
 R^2 0.0059
 Regression P 0.5878



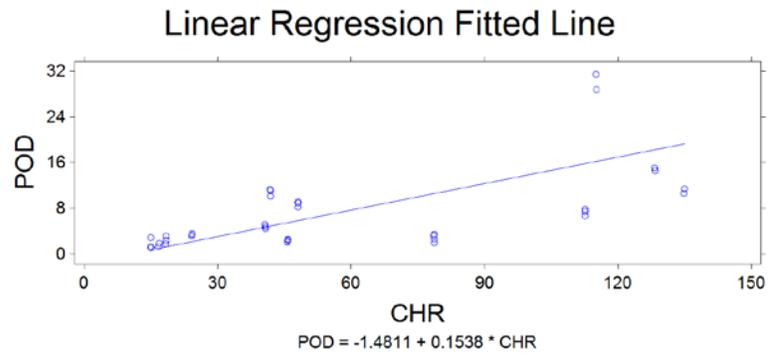
Análisis de varianza para actividad enzimática específica de POD en las tres temporadas (inicio, mediados y final)

TEMPORADA	P	0.0000
HORA	P	0.0000
temporada*hora	P	0.0000



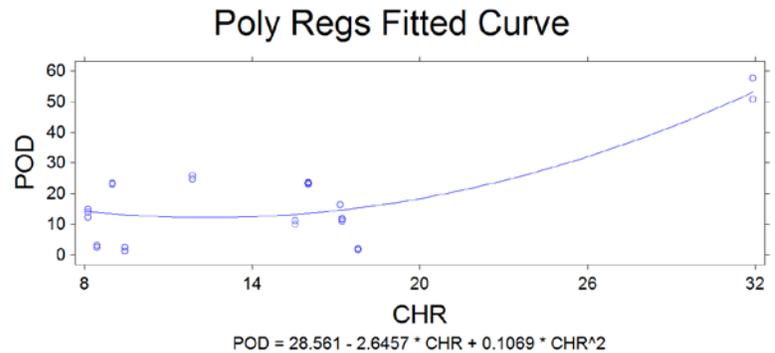
Regresión lineal por mínimos cuadrados para actividad enzimática específica de POD a inicios de la época seca en el Páramo de Chingaza

Constant	P	0.4739
CHR	P	0.0000
R ²		0.4542
Regression	P	0.0000



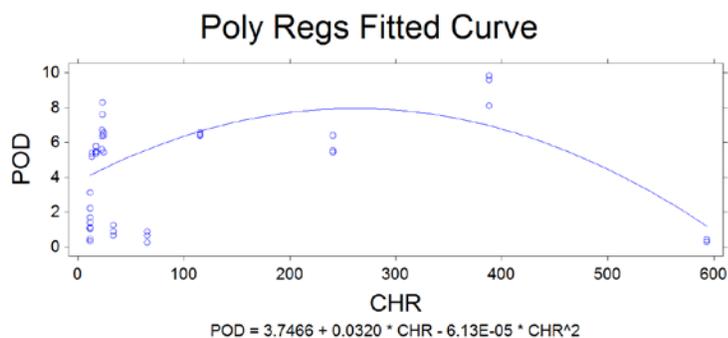
Regresión polinomial para actividad enzimática específica de POD a mediados de la época seca en el Páramo de Chingaza

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.2061
CHR ²	P	0.0013
R ²		0.6061
Regression	P	0.0000



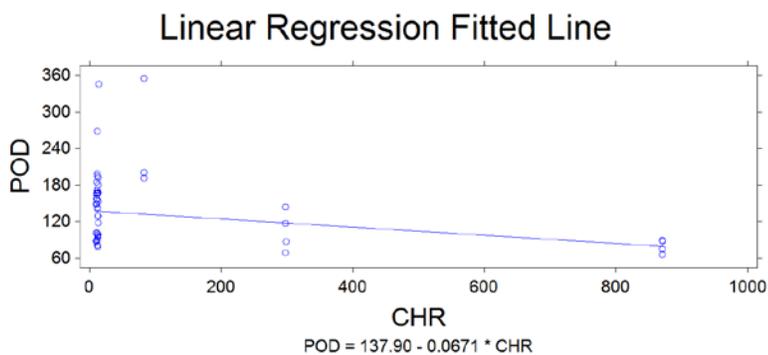
Regresión polinomial para actividad enzimática específica de POD a finales de la época seca en el Páramo de Chingaza

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.0000
CHR ²	P	0.0000
R ²		0.4562
Regression	P	0.0000



Regresión lineal por mínimos cuadrados para actividad enzimática específica de POD en laboratorio

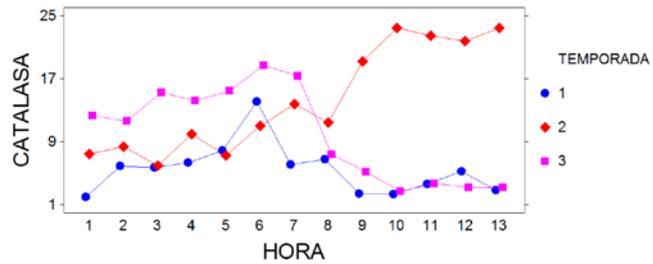
Constant	P	0.0000
CHR	P	0.0030
R ²		0.1691
Regression	P	0.0030



Análisis de varianza para actividad enzimática específica de CAT en las tres temporadas (inicio, mediados y final)

HORA	P	0.0000
TEMPORADA	P	0.0000
hora*temporada	P	0.0000

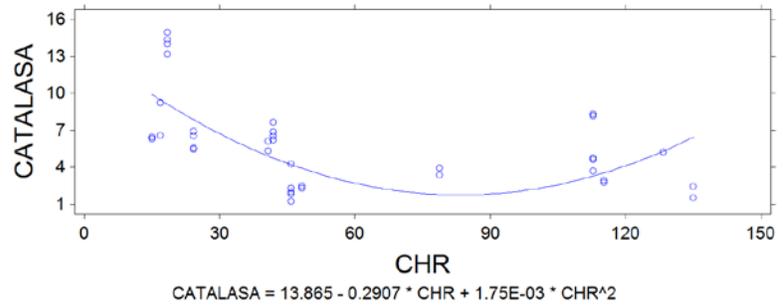
Means of CATALASA for HORA*TEMPORADA



Regresión polinomial para actividad enzimática específica de CAT a inicios de la época seca en el Páramo de Chingaza

Constant	P	0.0002
CHR	P	0.0000
CHR^2	P	0.0000
R ²		0.4827
Regression	P	0.0000

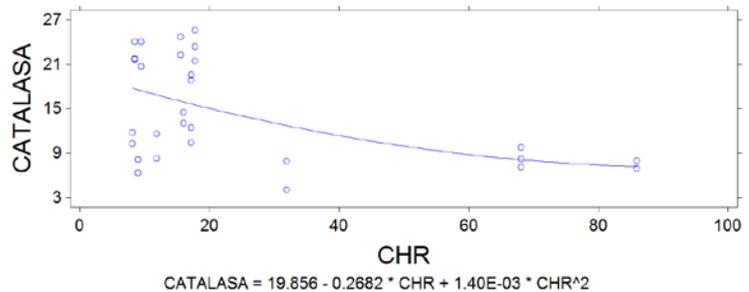
Poly Regs Fitted Curve



Regresión polinomial para actividad enzimática específica de CAT a mediados de la época seca en el Páramo de Chingaza

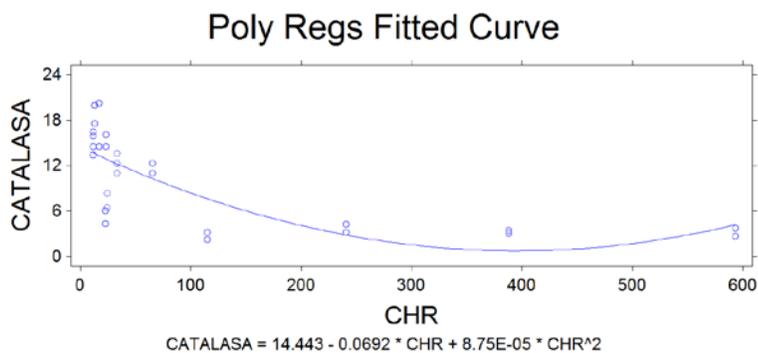
Constant	P	0.0000
CHR	P	0.1242
CHR^2	P	0.6358
R ²		0.2564
Regression	P	0.0183

Poly Regs Fitted Curve



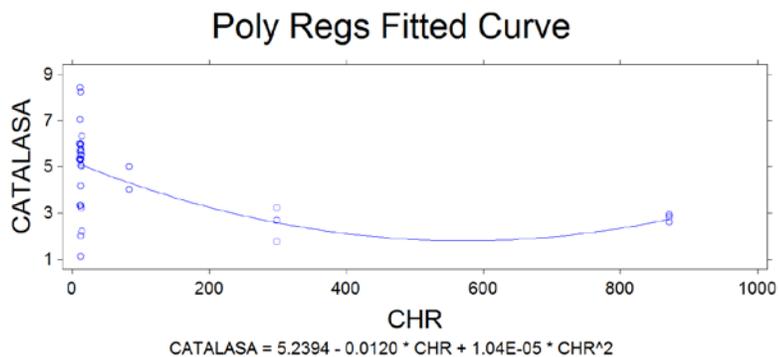
Regresión polinomial para actividad enzimática específica de CAT a finales de la época seca en el Páramo de Chingaza

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.0001
CHR^2	P	0.0069
R ²		0.5748
Regression	P	0.0000



Regresión lineal por mínimos cuadrados para actividad enzimática específica de CAT en laboratorio

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.0131
CHR^2	P	0.0777
R ²		0.2965
Regression	P	0.0043

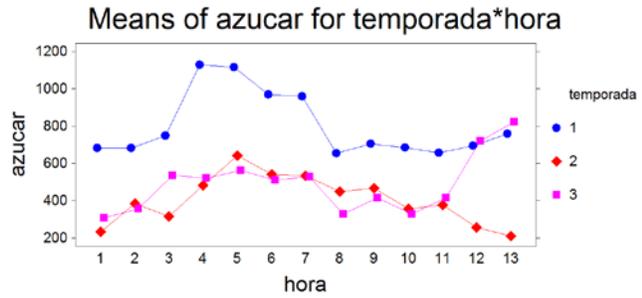


D. ANEXO: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

CAPÍTULO 5

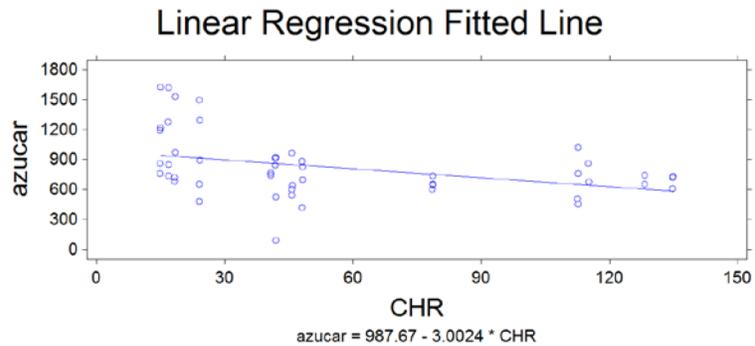
Análisis de varianza para azúcares totales solubles en las tres temporadas (inicio, mediados y final) de la época seca

Temporada	P	0.0000
Hora	P	0.0014
temporada*hora	P	0.1910



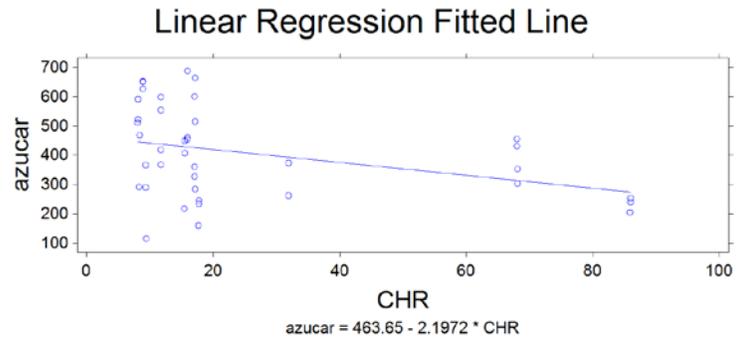
Regresión lineal por mínimos cuadrados para azúcares totales solubles a inicios de la época de sequía en el Páramo de Chingaza

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.0064
R ²		0.1508
Regression	P	0.0064



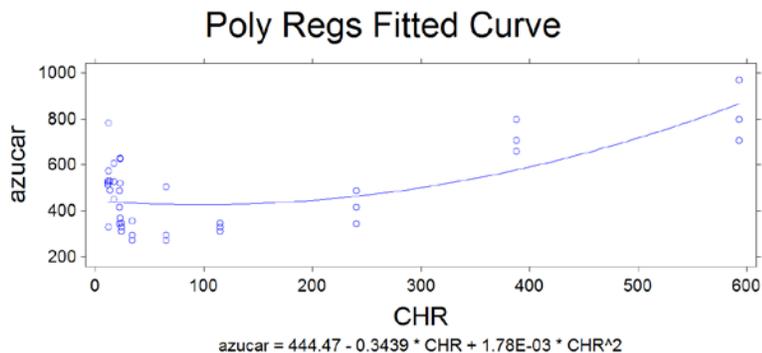
Regresión lineal por mínimos cuadrados para azúcares totales solubles a mediados de la época de sequía en el Páramo de Chingaza

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.0284
R ²		0.1233
Regression	P	0.0284



Regresión polinomial para azúcares totales solubles a finales de la época de sequía en el Páramo de Chingaza

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.6509
CHR ²	P	0.0038
R ²		0.6114
Regression	P	0.0000

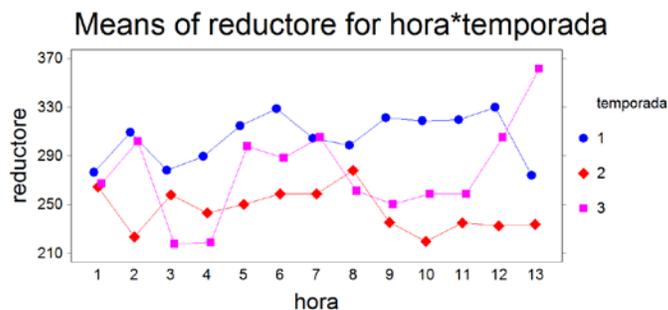


Regresión lineal por mínimos cuadrados para azúcares totales solubles en laboratorio

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.1043
R ²		0.0576
Regression	P	0.1043

Análisis de varianza para azúcares reductores en las tres temporadas (inicio, mediados y final) de la época seca

Hora	P	0.2981
Temporada	P	0.0000
hora*temporada	P	0.0387



Regresión lineal por mínimos cuadrados para azúcares reductores a inicios de la época de sequía en el Páramo de Chingaza

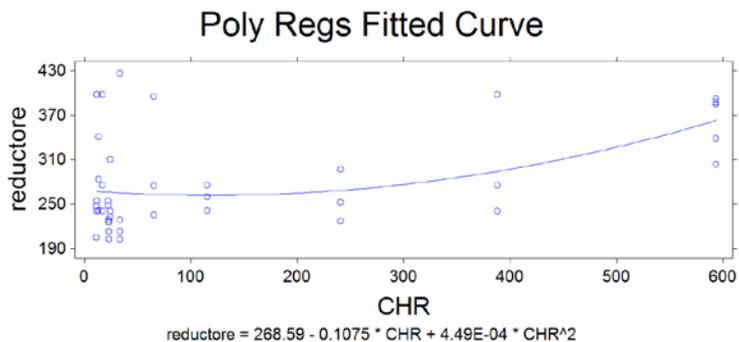
Constant	P	0.0000
CHR	P	0.6101
R ²		0.0048
Regression	P	0.6101

Regresión lineal por mínimos cuadrados para azúcares reductores a mediados de la época de sequía en el Páramo de Chingaza

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.7866
R ²		0.0020
Regression	P	0.7866

Regresión polinomial para azúcares reductores a finales de la época de sequía en el Páramo de Chingaza

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.8434
CHR ²	P	0.0655
R ²		0.3936
Regression	P	0.0000

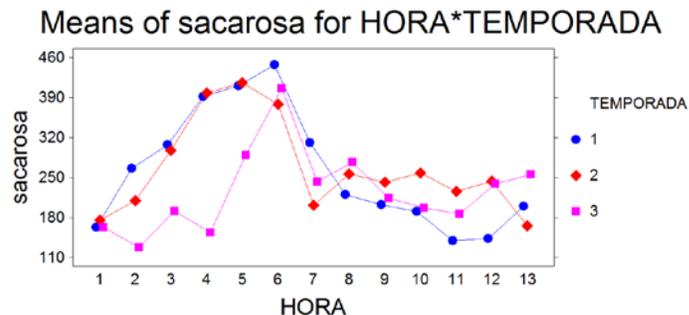


Regresión lineal por mínimos cuadrados para azúcares reductores en laboratorio

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.1068
R ²		0.0688
Regression	P	0.1068

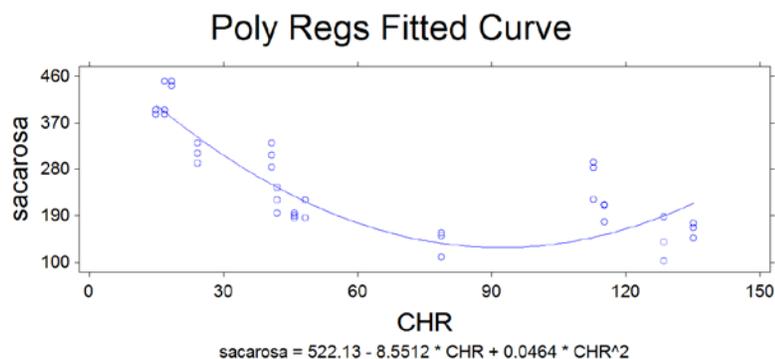
Análisis de varianza para sacarosa en las tres temporadas (inicio, mediados y final) de la época seca

HORA	P	0.0000
TEMPORADA	P	0.0000
HORA*TEMPORADA	P	0.0000



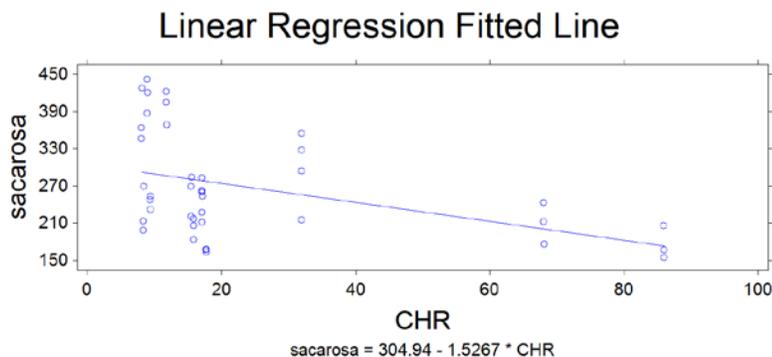
Regresión polinomial para sacarosa a principios de la época de sequía en el Páramo de Chingaza

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.0000
CHR^2	P	0.0000
R ²		0.7824
Regression	P	0.0000



Regresión lineal por mínimos cuadrados para sacarosa a mediados de la época de sequía en el Páramo de Chingaza

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.0060
R ²		0.1822
Regression	P	0.0060



Regresión lineal por mínimos cuadrados para sacarosa a finales de la época de sequía en el Páramo de Chingaza

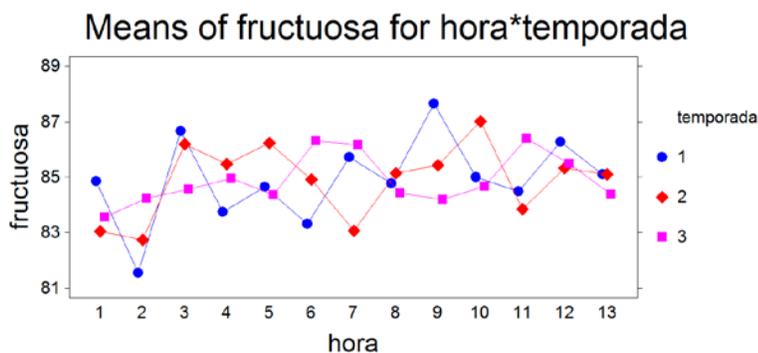
Constant	P	0.0000
CHR	P	0.9060
R ²		0.0004
Regression	P	0.9060

Regresión lineal por mínimos cuadrados para sacarosa en laboratorio

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.1859
R ²		0.0468
Regression	P	0.1859

Análisis de varianza para fructosa en las tres temporadas (inicio, mediados y final) de la época seca

Hora	P	0.4921
temporada	P	0.9995
hora*temporada	P	0.8284



Regresión lineal por mínimos cuadrados para fructosa a inicio de la época de sequía en el Páramo de Chingaza

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.6774
R ²		0.0032
Regression	P	0.6774

Regresión lineal por mínimos cuadrados para fructosa a mediados de la época de sequía en el Páramo de Chingaza

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.0481
R ²		0.0606
Regression	P	0.0481

Regresión lineal por mínimos cuadrados para fructosa a finales de la época de sequía en el Páramo de Chingaza

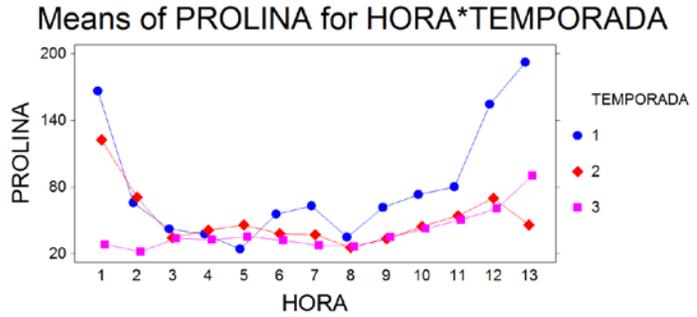
Constant	P	0.0000
CHR	P	0.8528
R ²		0.0006
Regression	P	0.8528

Regresión lineal por mínimos cuadrados para fructosa en laboratorio

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.7894
R ²		0.0014
Regression	P	0.7894

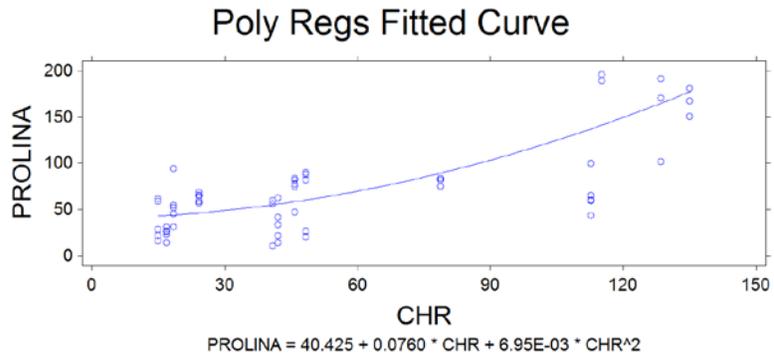
Análisis de varianza para prolina en las tres temporadas (inicio, mediados y final) de la época seca

HORA P 0.0000
 TEMPORADA P 0.0000
 HORA*TEMPORADA P 0.0000



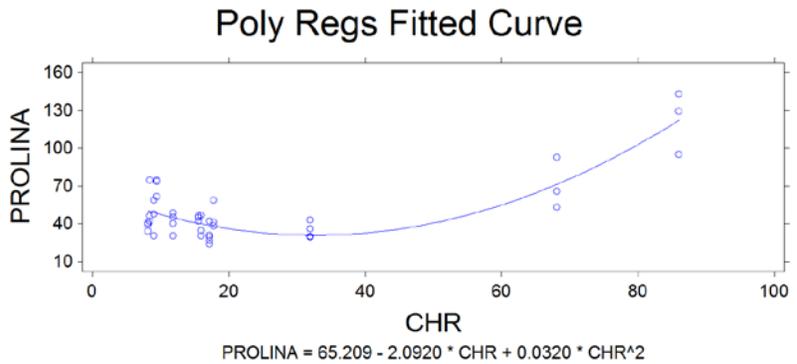
Regresión polinomial para prolina a principios de la época de sequía en el Páramo de Chingaza

Constant P 0.0000
 CHR P 0.0000
 CHR^2 P 0.0652
 R² 0.6568
 Regression P 0.0000



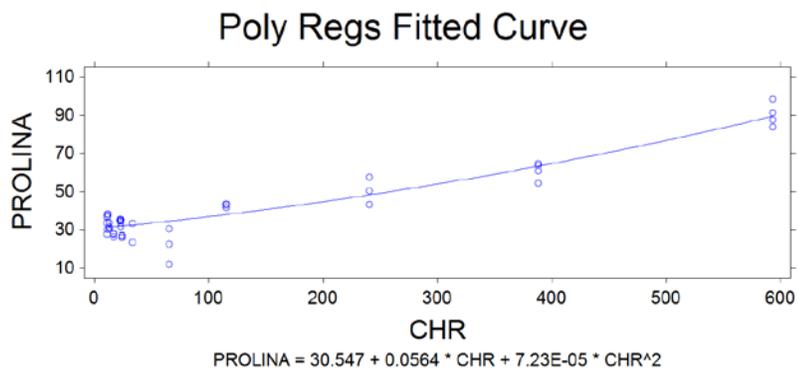
Regresión polinomial para prolina a mediados de la época de sequía en el Páramo de Chingaza

Constant P 0.0000
 CHR P 0.0282
 CHR^2 P 0.0000
 R² 0.7454
 Regression P 0.0000



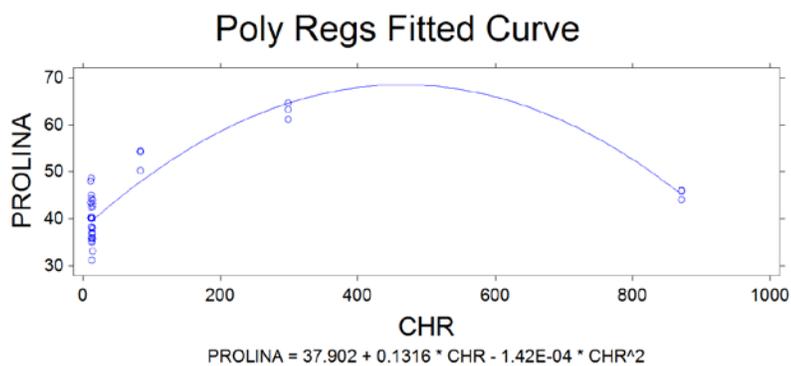
Regresión polinomial para prolina a finales de la época de sequía en el Páramo de Chingaza

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.0000
CHR ²	P	0.0074
R ²		0.9453
Regression	P	0.0000



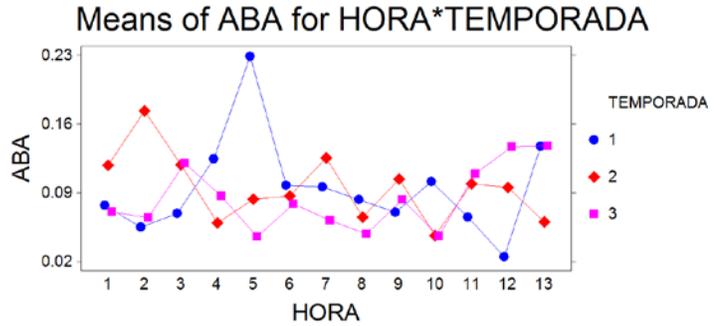
Regresión polinomial para prolina en laboratorio

Constant	P	0.0000
CHR	P	0.0000
CHR ²	P	0.0000
R ²		0.7271
Regression	P	0.0000



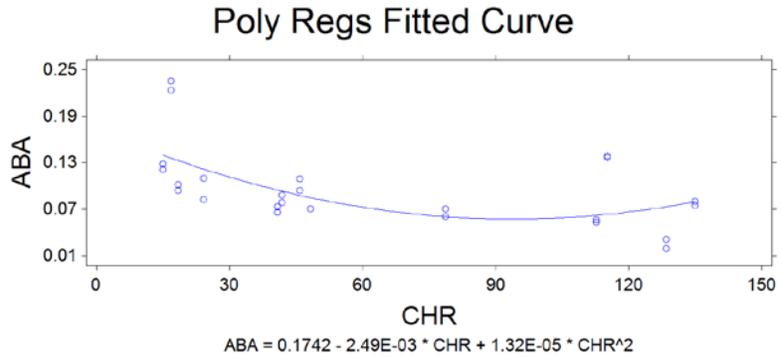
Análisis de varianza para ABA en las tres temporadas (inicio, mediados y final) de la época seca

HORA P 0.0000
 TEMPORADA P 0.0000
 HORA*TEMPORADA P 0.0000



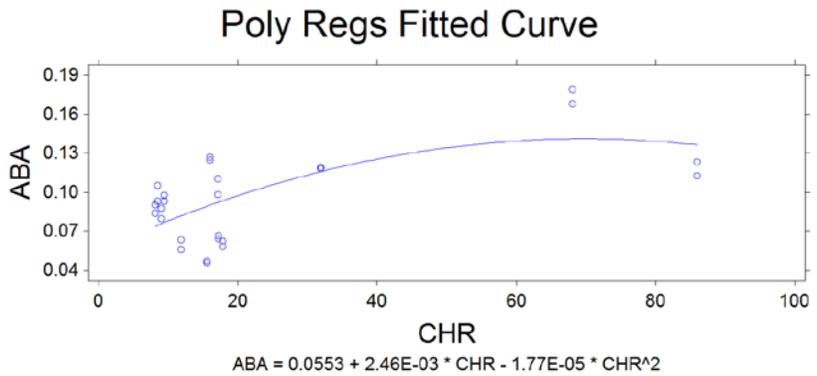
Regresión polinomial para ABA a principios de la época de sequía en el Páramo de Chingaza

Constant P 0.0001
 CHR P 0.0028
 CHR^2 P 0.0684
 R² 0.3289
 Regression 0.0102



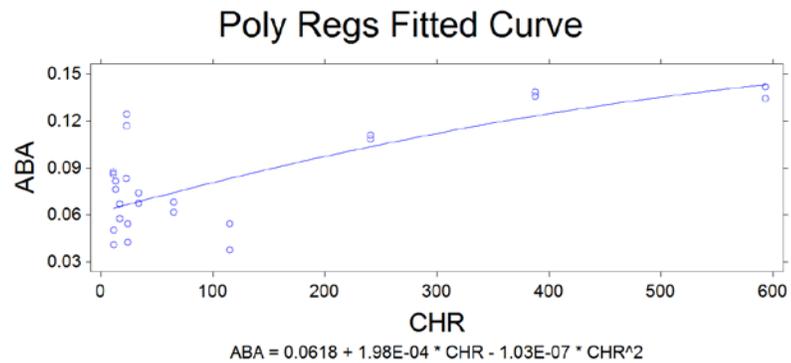
Regresión polinomial para ABA a mediados de la época de sequía en el Páramo de Chingaza

Constant P 0.0000
 CHR P 0.0142
 CHR^2 P 0.2039
 R² 0.4208
 Regression P 0.0019



Regresión polinomial para ABA a finales de la época de sequía en el Páramo de Chingaza

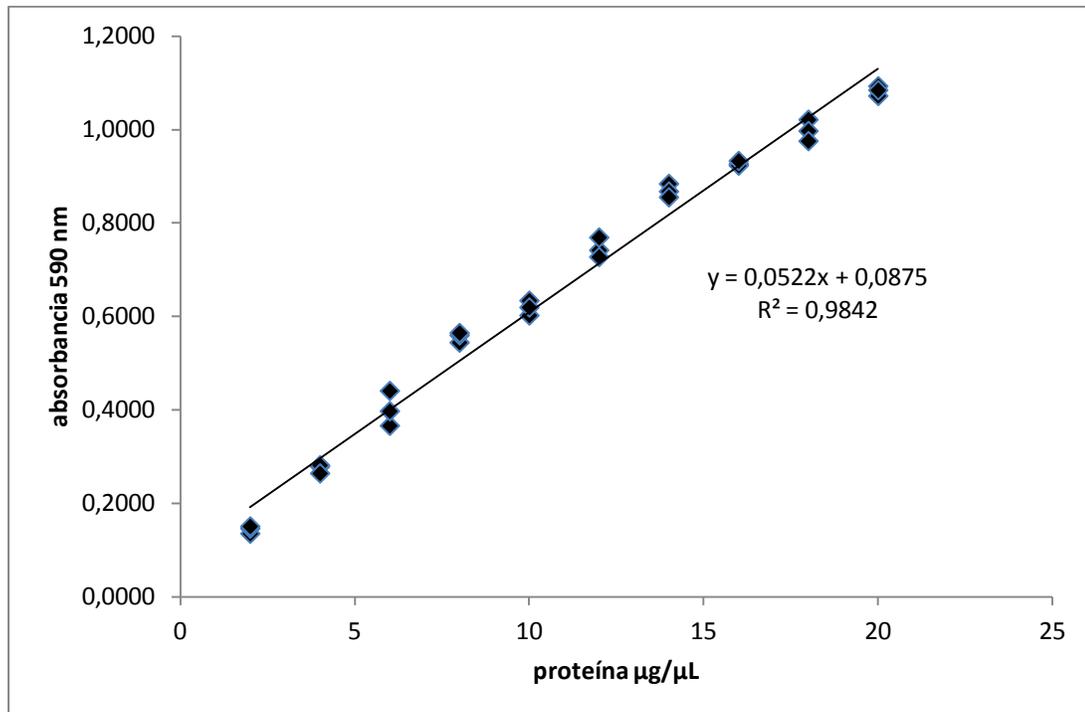
Constant	P	0.0000
CHR	P	0.0014
CHR ²	P	0.4466
R ²		0.6746
Regression	P	0.0000



Regresión polinomial para ABA en laboratorio

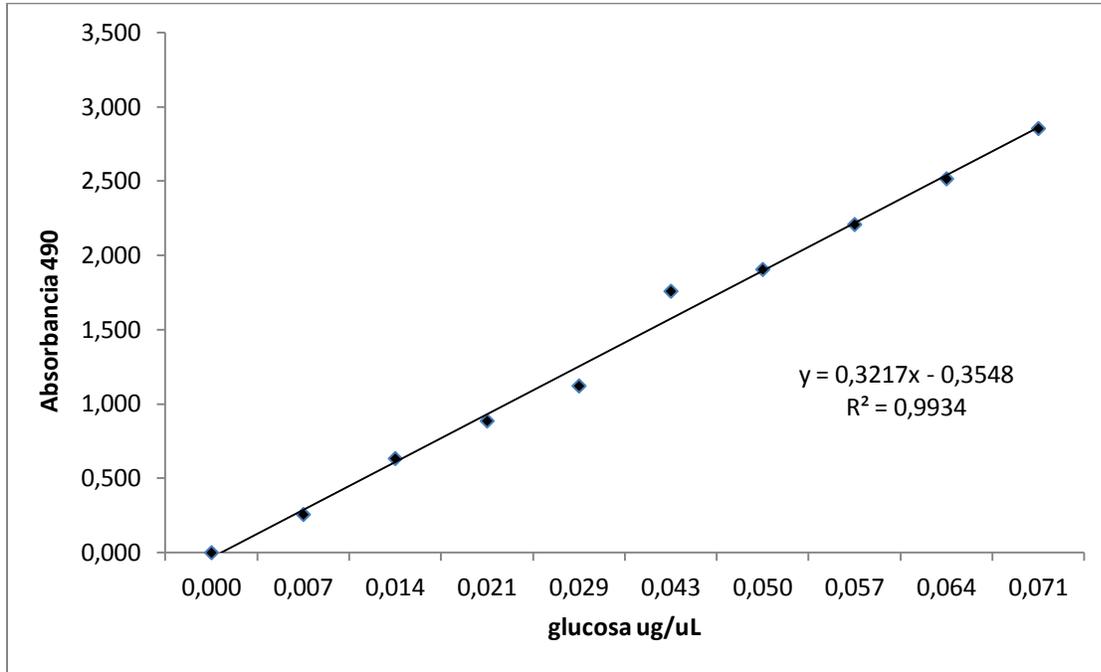
Constant	P	0.0000
CHR	P	0.4007
CHR ²	P	0.2671
R ²		0.0787
Regression	P	0.3897

E. Anexo: Curva de calibración de proteínas



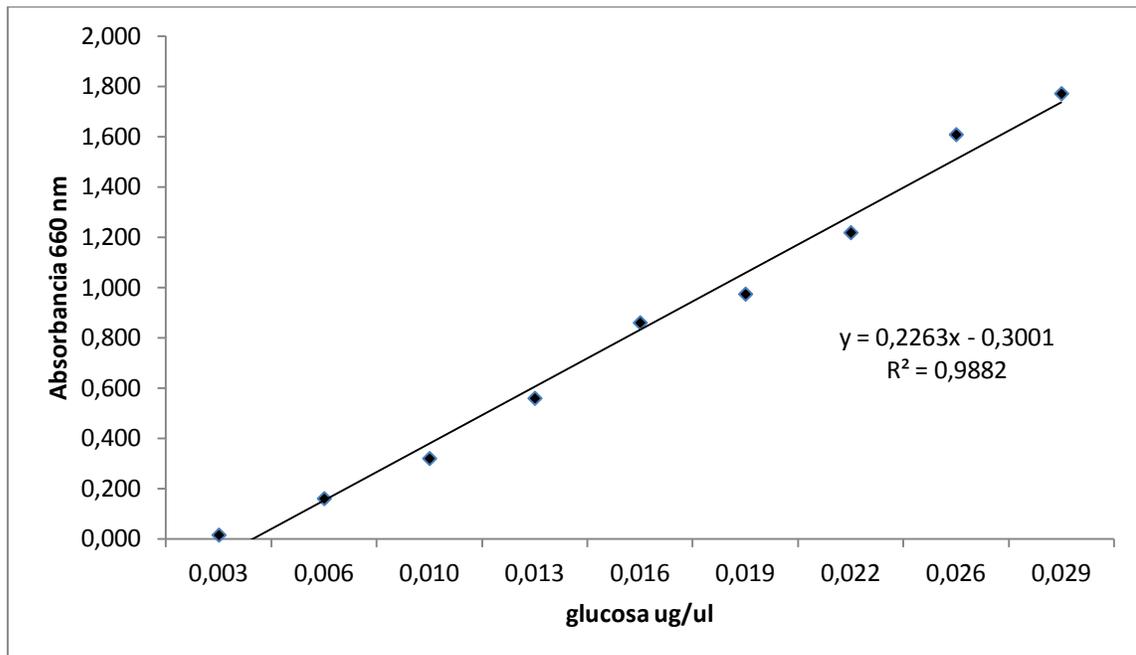
Curva de calibración obtenida por el método de Bradford (1976) modificado por Zor y Selinger (1996)

F. Anexo: Curva de calibración de azúcares totales



Curva de calibración de azúcares solubles totales por el método de Dubois *et al.* (1956).

G. Anexo: Curva de calibración de azúcares reductores



Curvas de calibración de azúcares reductores por el método de Somogyi-Nelson (1952).

Bibliografía

Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121–126.

Alpert P. 2000. The discovery, scope, and puzzle of desiccation tolerance in plants. *Plant Ecology* 151: 5–17.

Alpert P. 2006. Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? *The Journal of Experimental Biology* 209: 1575-1584.

Anić M., M. Tasić, M. V. Frontasyeva, M. Tomasévic, S. Rajsic, P. Strelkova, A. Popovic y E. Steinnes. 2009. Active biomonitoring with wet and dry moss: a case study in an urban area. *Environmental Chemical Lett* 7:55–60.

Armitage H., A. Britton, S. Woodin y R. van der Wal. 2011. Assessing the recovery potential of alpine mosses edge heath: Reciprocal transplants along a nitrogen deposition gradient. *Environmental Pollution* 159(1): 140-147.

Ashraf M. y M. R. Foolad. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59(2): 206-216

Barón A., W. García, L. M. Melgarejo y L. C. Montenegro. 2009. Physiological aspects of *Racomitrium crispipilum* Taylor A. (Jaeger) during dry season in Páramo de Chingaza, Colombia. *Tropical Bryology* 30: 1-7.

Bartels D., K. Schneider, G. Terstappen, D. Piatkowski and F. Salamini. 1990. Molecular cloning of ABA modulated genes which are induced during desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Planta* 181: 27-34.

Bates J. 1998. Life-form useful concept bryophyte ecology? *Oikos* 82: 223-237.

Bewley J. D. 1972. The conservation of polyribosomes in the moss *Tortula ruralis* during total desiccation. *Journal of Experimental Botany* 23(3): 692-698.

- Bewley J. D. 1973. Polyribosomes conserved during desiccation of the moss *Tortula ruralis* are active. *Plant Physiology* 51: 285-288.
- Bharali B. y J. Bates. 2006. Detoxification of dissolved SO₂ (bisulfite) by terricolous mosses. *Annals of Botany* 97: 257–263.
- Blokhina O., E. Virolainen y K. Fagertedt. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91: 179-194.
- Bolen D. 2004. Effects of naturally occurring osmolytes on protein stability and solubility: issues important in protein crystallization. *Methods* 34: 312–322.
- Bor M., F. Özdemir y I. Türkan. 2003. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Science* 164: 77-84.
- Borghetti M., J. Grace y A. Raschi. 1993. *Water Transport in Plants under Climatic Stress*. Cambridge University Press.
- Brinda J., C. Fernando, Z. Tuba, N. Slack, y L. Stark. 2011. Ecology of bryophytes in Mojave desert biological soil crusts: effects of elevated CO₂ on sex expression, stress tolerance, and productivity in the moss *Syntrichia caninervis* Mitt. *Bryophyte Ecology and Climate Change*. Cambridge University Press pp 169-191.
- Carter D. y J. M. Arocena. 2000. Soil formation under two moss species in sandy materials of central British Columbia-Canada. *Geoderma* 98: 157–176.
- Chance M. y A. C. Maehly. 1955. Assay of catalases and peroxidases. En: *Methods in Enzymology* 2. New York: Academic Press pp: 764–775.
- Chen X., T. Kanokporn, Q. Zeng, T. A. Wilkins y A. J. Wood. 2002. Characterization of the V-type H⁽⁺⁾-ATPase in the resurrection plant *Tortula ruralis*: accumulation and polysomal recruitment of the proteolipid c subunit in response to salt-stress. *Journal of Experimental Botany* 53(367): 225-232.

- Chinnici F. 2005. Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis* 18: 121–130.
- Choudhury S. y S. Kumar. 2005. Toxic effects, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (schwaegr.) Broth. under chromium and lead phytotoxicity. *Water, Air, and Soil Pollution* 167: 73–90.
- Christov K. y N. Bakardjieva. 1998. Peroxidase, catalase and superoxide dismutase in long-term desiccated moss *Mnium affine* and their role in the process of rehydration. *Plant Peroxidase Newsletter* 11: 35-44.
- Christov K., N. Christova y N. Bakardjieva. 2000. Activity and thermostability of peroxidase and catalase in *Mnium affine* enriched with calcium and copper ions and the amino acids alanine and valine. *Plant Peroxidase Newsletter* 15: 69-74.
- Churchill S. y E. Linares. 1995. *Prodromus bryologiae novo-granatensis*, introducción a la flora de musgos de Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Cleavitt N. 2002. Stress tolerance of rare and common moss species in relation to their occupied environments and asexual dispersal potential. *Journal of Ecology* 90: 785-795.
- Couto J., J. A. Fernández, J. R. Aboal y A. Carballeira. 2003. Annual variability in heavy-metal bioconcentration in moss: sampling protocol optimization. *Atmospheric Environment* 37: 3517–3527.
- Crowe J., J. Carpenter y L. Crowe. 1998. The role of vitrification in Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* 60: 73-103. 1998.
- Csintalan Z., M. Proctor, y Z. Tuba. 1999. Chlorophyll Fluorescence during drying and rehydration in the mosses *Rhytidiadelphus loreus* (Hedw.) Warnst., *Anomodon viticulosus* (Hedw.) Hook. & Tayl. and *Grimmia pulvinata* (Hedw.) Sm. *Annals of Botany* 84: 235-244.
- Cuming A., S. Hyun Cho, Y. Kamisugi, H. Graham y R. S. Quatrano. 2007. Microarray analysis of transcriptional responses to abscisic acid and osmotic, salt, and drought stress in the moss *Physcomitrella patens*. *New Phytologist* 176: 275–287.

D'Souza J. y M. Mohan. 2002. ABA and NaCl activate myelin basic protein kinase in the chloronema cells of the moss *Funaria hygrometrica*. *Plant Physiology Biochemistry* 40: 17–24

Dazy M, E. Béraud, S. Cotellet, E. Meux, J. Masfaraud, J. Féraud. 2008. Antioxidant enzyme activities as affected by trivalent and hexavalent chromium species in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere* 73: 281–290.

Del Río L., F. J. Corpas, L. M. Sandalio, J. M. Palma, M. Gómez y J. B. Barroso. 2002. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* 53(372): 1255-1272.

Deltoro V., A. Calatayud, F. Morales, A. Abadó y E. Barreno. 1999. Changes in net photosynthesis, chlorophyll fluorescence and xanthophyll cycle interconversions during freeze-thaw cycles in the Mediterranean moss *Leucodon sciuroides*. *Oecologia* 120:499-505.

Dhindsa R. 1987. Protein synthesis during rehydration of rapidly dried *Tortula ruralis*. *Plant Physiology* 85: 1094-1098.

Dhindsa R. 1991. Drought stress, enzymes of glutathione metabolism, oxidation injury and protein synthesis in *Tortula ruralis*. *Physiology* 95: 648-651.

Dhindsa R. y W. Matowe. 1981. Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany* 32(126): 79-91.

Dubois M., K. Gilles, J. Hamilton, P. Reners y F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.

Farrant J., C. Vander, D. A. Loffell, S. Bartsch y A. Whittaker. 2003. An investigation into the role of light during desiccation of three angiosperm resurrection plants. *Plant, Cell and Environment* 26: 1275–1286.

Fernández J. y A. Carballeira. 2001. Evaluation of contamination by different elements, in terrestrial mosses. *Archives of environmental contamination toxicology* 40: 461–468.

Frank W., D. Ratnadewi y R. Reski. 2005. *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. *Planta* 220: 384–394.

Gallander J. 1985. The science workbook.: Student Research Projects in Food-Agriculture- Natural Resources. College of Agriculture. Ohio State University.

Galuszka A. 2007. Distribution patterns of PAHs and trace elements in mosses *Hylocomium splendens* (Hedw.) B.S.G. and *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. from different forest communities: A case study, south-central Poland. *Chemosphere*. 67: 1415–1422.

Green III F., C. Clausen y T. Highley. 1989. Adaptation of the Nelson-Somogyi reducing sugar assay to a microassay using microtiter plates. *Analytical Biochemistry* 182: 197–199.

Guschina I., J. Harwood, M. Smith y R. P. Beckett. 2002. Abscisic acid modifies the changes in lipids brought about by water stress in the moss *Atrichum androgynum*. *New Phytologist* 156: 255–264.

Gwózdź E., J. D. Bewley y Tucker. 1974. Studies on protein synthesis in *Tortula ruralis*: polyribosome reformation following desiccation. *Journal of Experimental Botany* 25: 599–608.

Hamerlynck E., Z. Csintalan, Z. Nagy, Z. Tuba, D. Goodin y G. M. Henebry. 2002. Ecophysiological consequences of contrasting microenvironments on the desiccation tolerant moss *Tortula ruralis*. *Oecologia* (2002) 131:498–505.

Heber U., O. Lange y V. Shuvalov. 2006. Conservation and dissipation of light energy as complementary processes: homoiohydric and poikilohydric autotrophs. *Journal of Experimental Botany* 57(6): 1211–1223.

Hellwege E., K. Dietz y W. Hartung. 1996. Abscisic acid causes changes in gene expression involved in the induction of the landform of the liverwort *Riccia fluitans* L. *Planta* 198: 423–432

Hellwege E., K. Dietz, O. Volk and W. Hartung. 1994. Abscisic acid and the induction of desiccation tolerance in the extremely xerophilic liverwort *Exormotheca holstii*. *Planta* 194: 525-531.

Hellwege E., O. Volk and W. Hartung. 1992. A physiological role of abscisic acid in the liverwort *Riccia fluitrans* L. *Journal Plant Physiology* 140: 553-556

Hernandez C., J. Gonzalez and A. Lozada. 1999. Water relations of some mosses growing in pine forests of tenerife. *Lindbergia* 24: 15-22.

Hohe A. y R. Reski. 2005. Control of growth and differentiation of bioreactor cultures of *Physcomitrella* by environmental parameters. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 81: 307–311.

Huttunen S. 2003. Reproduction of the mosses *Pleurozium schreberi* and *Pohlia nutans* in the surroundings of coppers meltersat Harjavalta, S.W. Finland. *Journal of Bryology* 25: 41–47.

Huttunena S, T. Taipalea, N.M. Lappalainen, E. Kubinb, K. Lakkalac y J. Kaurola. 2005. Environmental specimen bank samples of *Pleurozium schreberi* and *Hylocomium splendens* as indicators of the radiation environment at the surface. *Environmental Pollution* 133: 315–326.

Kavi P, S. Sangam, R. Amrutha, P. Sri, K. Naidu, K. Rao, S. Rao, K. Reddy, P. Theriappan y N. Sreenivasulu. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* 88(3): 424-438.

Kosiora G., A. Samecka-Cymermana, A. Chmielewskib, R. Wierzchnickib, M. Derdab, y A.J. Kempers. 2008. Native and transplanted *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. as a bioindicator of N deposition in a heavily industrialized area of Upper Silesia (S Poland). *Atmospheric Environment* 42: 1310–1318.

Krab E., J. Cornelissen, S. Lang y R. van Logtestijn. 2008. Amino acid uptake among wide-ranging moss species may contribute to their strong position in higher-latitude ecosystems. *Plant Soil* 304: 199–208.

Lappalainen N., S. Huttunen y H. Suokanerva. 2007. Acclimation of a pleurocarpous moss *Pleurozium schreberi* (Britt.) Mitt. to enhanced ultraviolet radiation in situ. *Global Change Biology* 14: 1–13.

León Y., S. Engwald, M. C. F. Proctor. 2006. Microclimate, light adaptation and desiccation tolerance of epiphytic bryophytes in two Venezuelan cloud forests. *Journal of Biogeography* 33(5): 901-913.

León-Vargas, Y., S. Engwald y M. C. F. Proctor. 2006. Microclimate, light adaptation and desiccation tolerance of epiphytic bryophytes in two Venezuelan cloud forests. *Journal of Biogeography* 33: 901–913.

Malek L y J. Derek. 1978. Effects of various rates of freezing on the metabolism of a drought-tolerant plant, the moss *Tortula ruralis*. *Plant Physiology* 61: 334-338.

Marschall M., M. C. F. Proctor y N. Smirnov. 1998. Carbohydrate composition and invertase activity of the leafy liverwort *Porella platyphylla*. *New Phytology* 138: 343-353.

Marschall M. y M. C. F. Proctor. 2004. Are bryophytes shade plants? Photosynthetic light responses and proportions of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids. *Annals of Botany* 94: 593–603.

Mayaba N., F. Minibayeva y R. Beckett. 2002. An oxidative burst of hydrogen peroxide during rehydration following desiccation in the moss *Atrichum androgynum*. *New Phytologist* 155: 275–283.

Mayaba N. y R. Beckett. 2003. Increased activities of superoxide dismutase and catalase are not the mechanism of desiccation tolerance induced by hardening in the moss *Atrichum androgynum*. *Journal of Bryology* 25: 281-286.

Mayabaf N, R. Beckett, Z. Csintalanj y Z. Tuba. 2001. ABA Increases the desiccation tolerance of photosynthesis in the afro-montane understory moss *Atrichum androgynum*. *Annals of Botany* 88: 1093-1100.

Melgarejo L.M. 2010. Experimentos en Fisiología Vegetal. Editora. Universidad Nacional de Colombia.

Maxwell K. y G. Johnson. 2000. Chlorophyll fluorescence a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.

Migaszewski Z., A. Gauszka, J. Crock, P. Lamothe y S. Doegowska. 2009. Interspecies and interregional comparisons of the chemistry of PAHs and trace elements in mosses *Hylocomium splendens* (Hedw.) B.S.G. and *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. from Poland and Alaska. *Atmospheric Environment* 43: 1464–1473.

Minami A., M. Nagao, K. Arakawa, S. Fujikawa, y D. Takezawa. 2003. Abscisic acid-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens* is accompanied by increased expression of stress-related genes. *Journal Plant Physiology* 160: 475–483.

Minibayeva F. y R. Beckett. 2001. High rates of extracellular superoxide production in bryophytes and lichens, and an oxidative burst in response to rehydration following desiccation. *New Phytologist* 152 : 333–341.

Montenegro, L.C., M. Chaparro, y A. Barón. 2005. Regulación hídrica en cinco musgos del páramo de Chingaza. En: Estrategias adaptativas de plantas de páramo y del bosque altoandino en la cordillera Oriental de Colombia. Editora María Argenis Bonilla. Universidad Nacional de Colombia, pp: 3 – 24.

Nabe, H., R. Funabiki, Y. Kashino, H. Koike y K. Satoh. 2007. Responses to desiccation stress in bryophytes and an important role of dithiothreitol-insensitive non-photochemical quenching against photoinhibition in dehydrated states. *Plant Cell Physiology* 48(11): 1548–1557.

Nagao M, K. Oku, A. Minami, K. Mizuno, M. Sakurai, K. Arakawa, S. Fujikawa, D. Takezawa. 2006. Accumulation of theandrose in association with development of freezing tolerance in the moss *physcomitrella patens*. *Phytochemistry* 67: 702–709.

Nagaoa M., A. Minamib, K. Arakawaa, S. Fujikawaa y D. Takezawac. 2005. Rapid degradation of starch in chloroplasts and concomitant accumulation of soluble sugars associated with ABA-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens* *Journal of Plant Physiology* 162: 169—180.

Nayyar H. y D. Gupta. 2006. Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: association with oxidative stress and antioxidants. *Environmental and Experimental Botany* 58: 106–113.

Nelson N. 1944. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* 153: 257-262.

Nelson D. y M. Cox. 2005. *Lehninger. Principles of Biochemistry*. Fourth edition. Worth Publisher

Newton, A. y R. Tangney. 2007. *Pleurocarpous Mosses Systematics and Evolution*. CRC Press. New York. p: 287-306.

Noailles, M. C. 1978. Etude ultrastructurale de la recuperation hydrique apres une periode de secheresse une Hypnobryale: *Pleurozium schreberi* (Willd.). *Annales des Sciences Naturelles Botanique* 19: 249–265.

Oliver M. 2009. Biochemical and molecular mechanisms of desiccation tolerance in bryophytes. En: *Bryophyte Biology*. Ed: Goffinet B. y J. Shaw. Second Edition pp: 269-298.

Oliver M., J. Velten y B. Mishler. 2005. Desiccation tolerance in bryophytes: a reflection of the primitive strategy for plant survival in dehydrating habitats? *Integration. Comp. Biology* 45: 788–799.

Oliver M., Mishler, Jerrye y Quisenberry. 1993. Comparative measures of desiccation-tolerance in the *Tortula ruralis* complex I variation in damage control and repair. *American Journal of Botany* 80(2): 127-136.

Oliver M. 1991. Influence of protoplasmic water loss on the control of protein synthesis in the desiccation-tolerant moss *Tortula ruralis*. Ramifications for a repair-based mechanism of desiccation tolerance. *Plant Physiology* 97: 1501–1511.

- Oliver M., J. Velten y A. Wood. 2000. Bryophytes as experimental models for the study of environmental stress tolerance: *Tortula ruralis* and desiccation-tolerance in mosses. *Plant Ecology* 151: 73–84.
- Oliver M. y J. Bewley. 1984. Plant desiccation and protein synthesis.V. Stability of poly(a)- and poly(a)+ rna during desiccation and their synthesis upon rehydration in the desiccation-tolerant moss *Tortula ruralis* and the intolerant moss *Cratoneuron filicinum*. *Plant Physiology* 74, 917-922.
- Ötvös, E., T. Pázmándi y Z. Tuba. 2003. First national survey of atmospheric heavy metal deposition in Hungary by the analysis of mosses. *The Science of the Total Environment* 309: 151–160.
- Öztürk L. y Y. Demir. 2002. *In vivo* and *in vitro* protective role of proline. *Plant Growth Regulation* 38: 259–264.
- Palma J., L. M. Sandalio, F. J. Corpas, M.C. Romero-Puertas, I. McCarthy y L. A. Del Río. 2002. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology Biochemistry* 40: 521–530.
- Passardi F., D. Longet, C. Penel y C. Dunand. 2004. The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry* 65: 1879–1893.
- Price, A., K. Dunham, T. Carleton y L. Band. 1997. Variability of water fluxes through the black spruce (*Picea mariana*) canopy and feather moss (*Pleurozium schreberi*) carpet in the boreal forest of Northern Manitoba. *Journal of Hydrology* 196: 310-323
- Proctor M. 2009. Physiological ecology. En: *Bryophyte Biology*. Ed: Goffinet B. y J. Shaw. Second Edition pp: 237 269.
- Proctor M. 1982. Physiological Ecology: Water Relations, Light and Temperature Responses. En *Bryophyte Ecology*. Ed A. Smith. Chapman and Hall. London
- Proctor M. y V. C. Pence. 2002. Vegetative Tissues: Bryophytes, vascular resurrection plants, and vegetative propogules. En: *Desiccation and survival in plants: Drying without dying*. Ed M. Black y H.W. Pritchard. Pp: 207–237.

Proctor M. 2000. The bryophyte paradox: tolerance of desiccation, evasion of drought. *Plant Ecology* 151: 41–49.

Proctor M. y N. Smirnov. 2000. Rapid recovery of photosystems on rewetting desiccation-tolerant mosses: chlorophyll fluorescence and inhibitor experiments. *Journal of Experimental Botany* 51(351): 1695-1704.

Proctor M. y Z. Tuba. 2002. Poikilohydry and homoihydry: antithesis or spectrum of possibilities? *New Phytologist* 156: 327–349.

Proctor M., R. Ligrone y J. Duckett. 2007. Desiccation tolerance in the moss *Polytrichum formosum*: physiological and fine-structural changes during desiccation and recovery. *Annals of Botany* 99: 75-93.

Proctor M., 2000. The bryophyte paradox: tolerance of desiccation, evasion of drought. *Plant Ecology* 151: 41-49.

Quatrano R., S. F. Mcdaniel, A. Khandelwal, P. Perroud y D. J. Cove. 2007. *Physcomitrella patens*: mosses enter the genomic age. *Current Opinion in Plant Biology*. 10: 182–189.

Ramanjulu S. y D. Bartels. 2002. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, Cell and Environment* 25: 141–151.

Rau S., J. Miersch, D. Neumannc, E. Weber, G. J. Krauss. 2007. Biochemical responses of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* to Cd, Cu, Pb and Zn determined by chlorophyll fluorescence and protein levels. *Environmental and Experimental Botany* 59: 299–306.

Reimann, C., P. De Caritat, J. H. Halleraker, T. Finne, R. Boyd, O. Jager, T. Volden, G. Kashulina, I. Bogatyrev, V. Chekushin, V. Pavlov, M. Yrs, M. Liisa, I. Nen y H. Niskavaara. 1997. Regional atmospheric deposition patterns of Ag, As, Bi, Cd, Hg, Mo, Sb in a 188,000 km² area in the European arctic as displayed by terrestrial moss samples long-range atmospheric transport vs local impact. *Atmospheric Environment* 31 (23): 3887 3901.

Ritchie, G. A. 2006. Chlorophyll fluorescence: What is it and what do the numbers mean?. In: Riley, L.E.; Dumroese, R.K.; Landis, T.D., tech. coords. 2006. National Proceedings: Forest and Conservation Nursery Associations - 2005. Proc. RMRS-P-43. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. p. 34-42.

Robinson, S. A., J. Wasley, M. Popp y C.E. Lovelock. 2000. Desiccation tolerance of three moss species from continental Antarctica. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 379-388.

Salema, M., J. Deromeb, H. Helmisaaria, T. Nieminena y I. Vanha-Majama. 2004. Element accumulation in boreal bryophytes, lichens and vascular plants exposed to heavy metal and sulfur deposition in Finland. *Science of the Total Environment* 324: 141–160.

Scagel R. 1980. *El Reino Vegetal: los grupos de plantas y sus relaciones evolutivas*. Ediciones Omega. Barcelona.

Scandrett E. y C. H. Gimingham. 1989. Experimental investigation of bryophyte interactions on a dry heathland. *Journal of Ecology* 77 (3): 838-852.

Schlenzog, M., S. Pannewitz, T. Green y B. Schroeter. 2004. Metabolic recovery of continental antarctic cryptogams after winter. *Polar Biology* 27: 399–408.

Scott, P. 2000. Resurrection plants and the secrets of eternal leaf. *Annals of Botany* 85: 159-166.

Seel, W., G. Hendry y J. Lee. 1992a. Effects on desiccation on some activated oxygen processing enzymes and anti-oxidants in mosses. *Journal of Experimental Botany* 43: 1031-1037.

Seel W., G. Hendry y J. Lee. 1992b. The combined effects of desiccation and irradiance on mosses from xeric and hydric habitats. *Journal of Experimental Botany*. 43: 1023-1030.

Seel W., N. Baker and J. Lee. 1992c. Analysis of the decrease in photosynthesis on desiccation of mosses from xeric and hydric environments. *Physiologia Plantarum*. 86: 451-458.

- Seel, W., G. Hendry y J. Lee. 1992. Effects of desiccation on some activated oxygen processing enzymes and anti-oxidants in moss. *Journal of Experimental Botany*. 43(253): 1031-1037.
- Smirnoff N. 1992. The carbohydrates of bryophytes in relation to desiccation tolerance. *Journal of Bryology* 17: 185–191.
- Smirnoff N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* 125(1): 27-58.
- Smirnoff N. 2005. Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Blackwell Publishing Ltd. pp: 97- 130.
- Solga, A., J. Burkhardt, H.G. Zechmeister y J.-P. Frahma. 2005. Nitrogen content, ¹⁵N natural abundance and biomass of the two pleurocarpous mosses *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. and *Scleropodium purum* (Hedw.) Limpr. in relation to atmospheric nitrogen deposition. *Environmental Pollution* 134: 465–473.
- Somogyi M. 1952. Notes of sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195: 19-23.
- Stark L., M. Oliver, B. Mishler y D. Mcletchie. 2007. Generational differences in response to desiccation stress in the desert moss *Tortula inermis*. *Annals of Botany* 99: 53–60.
- Szczepaniak, K. y M. Biziuk. 2003. Aspects of the biomonitoring studies using mosses and lichens as indicators of metal pollution. *Environmental Research* 93: 221–230.
- Takács Z., Z. Csintalan, I. Sass, E. Laitat, I.vass y Z. Tuba. 1999. UV-B tolerance of bryophyte species with different degrees of desiccation tolerance. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 48: 210-215.
- Takezawa D. y A. Minami. 2004. Calmodulin-binding proteins in bryophytes: identification of abscisic acid-, cold-, and osmotic stress-induced genes encoding novel membrane-bound transporter-like proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317: 428–436.

Thöni L., N. Schnyder y F. Krieg. 1996. Comparison of metal concentrations in three species of mosses and metal freights in bulk precipitations. *Fresenius Journal Anal Chemistry* 354: 703–708.

Tobias M. y Ü. Niinemets. 2010. Acclimation of photosynthetic characteristics of the moss *Pleurozium schreberi* to among-habitat and within-canopy light gradients. *Plant Biology* 12: 743–754.

Tuba Z., Z. Csintalan y M. C. F. Proctor. 1996. Photosynthetic responses of a moss, *Tortula ruralis* ssp. *ruralis*, and the lichens *Cladonia convoluta* and *C. furcata* to water deficit and short periods of desiccation, and their ecophysiological significance: a baseline study at present-day concentration. *New Phytology* 133(2): 353-361.

Wappelhorst O., I. Kühn, J. Oehlmann y B. Markert. 2000. Deposition and disease: a moss monitoring project as an approach to ascertaining potential connections. *The Science of the Total Environment* 249: 243-256.

Wood A. and M. Oliver. 1999. Translational control in plant stress: the formation of messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs) in response to desiccation of *Turtula ruralis* gametophytes. *The Plant Journal* 18: 359-370.

Wood A., J. Duff and M. Oliver. 2000. The translational apparatus of *Turtula ruralis*: polysomal retention of transcripts encoding the ribosomal proteins RPS14, RPS16 y RPL23 in desiccated and rehydrated gametophytes. *Journal Experimental Botany* 51: 1655-1662.

Wood A. 2007. The nature and distribution of vegetative desiccation-tolerance in hornworts, liverworts and mosses. *The Bryologist* 110(2): 163–177.

Xiong L. y J. Zhu. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 131–139.

Zor T. y Z. Selinger. 1996. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Analytical Biochemistry* 236: 302-308.